

Данный файл представлен исключительно в ознакомительных целях.

Уважаемый читатель!

Если вы скопируете данный файл,
Вы должны незамедлительно удалить его сразу после ознакомления с содержанием.
Копируя и сохраняя его Вы принимаете на себя всю ответственность, согласно действующему международному законодательству .
Все авторские права на данный файл сохраняются за правообладателем.
Любое коммерческое и иное использование кроме предварительного ознакомления запрещено.

Публикация данного документа не преследует никакой коммерческой выгоды. Но такие документы способствуют быстрейшему профессиональному и духовному росту читателей и являются рекламой бумажных изданий таких документов.

МИКРОБИОЛОГИЯ



МИКРОБИОЛОГИЯ

Высшее профессиональное образование

А. И. Нетрусов
И. Б. Котова

МИКРОБИОЛОГИЯ

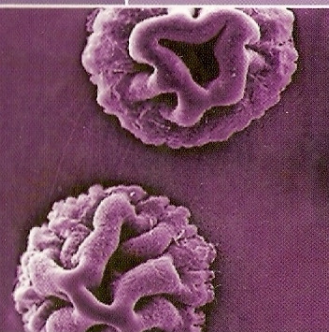
ISBN 5-7695-2583-5



9 785769 525834

Учебник

Учебник



Естественные
науки

Издательский центр «Академия»
www.academia-moscow.ru



УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73
Н573

Рецензенты:

профессор Н. Б. Градова (кафедра биотехнологии МХТУ им. Д. И. Менделеева);
профессор Ю. Д. Цыганков (ФГУП «ГосНИИгенетика»)

Нетрусов А. И.

Н573 Микробиология : учебник для студ. высш. учеб. заведений /
А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М.: Издательский центр «Ака-
демия», 2006. — 352 с.

ISBN 5-7695-2583-5

В учебнике приведены современные сведения о систематике прокари-
от, их строении, регуляции метаболизма, освещены вопросы наследствен-
ности, изменчивости, экологии микроорганизмов, определения их чис-
ленности и изучения активности в природе с помощью радиоизотопных
методов. Представлены методы отбора проб почвы, воды, воздуха, биоло-
гических образцов, затронуты проблемы загрязнения природных экосис-
тем и возможности самоочищения, рассмотрена роль микроорганизмов в
эволюции биосферы, даны рекомендации по их практическому приме-
нению.

Для студентов биологических специальностей университетов.

УДК 579(075.8)
ББК 28.4я73

*Оригинал-макет данного издания является собственностью
Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом
без согласия правообладателя запрещается*

© Нетрусов А. И., Котова И. Б., 2006
© Образовательно-издательский центр «Академия», 2006
© Оформление. Издательский центр «Академия», 2006

ISBN 5-7695-2583-5

ПРЕДИСЛОВИЕ

Цель авторов учебника — изложить современные сведения о
мире микроорганизмов с использованием большого количества
рисунков и схем, позволяющих быстрее и лучше понять суть изу-
чаемых понятий. Наряду с традиционным материалом, излагае-
мым в курсе микробиологии по биохимии, физиологии и генети-
ке микроорганизмов, в учебнике даны современные представле-
ния о систематике прокариот, основанные на анализе последова-
тельности гена, кодирующего синтез 16S рРНК, о методах эко-
логии микроорганизмов, морфологии и цитологии прокариот,
базирующихся на последних научных достижениях.

Учебник включает 13 глав по истории микробиологии, систе-
матике, морфологии, культивированию и росту клеток, действию
физико-химических факторов на микроорганизмы, метаболизму
и его регуляции, биосинтезу и генетике. В нем рассмотрены мето-
ды, используемые при изучении экологических аспектов деятель-
ности и практического применения микроорганизмов. Книгу за-
вершает систематический обзор филогенетических и физиологи-
ческих групп прокариот, удовлетворяющий современному уров-
ню знаний в этой области.

Авторы учебника благодарны рецензентам книги — профессо-
ру Н. Б. Градовой (кафедра биотехнологии МХТУ им. Д. И. Менде-
леева) и профессору Ю. Д. Цыганкову (ФГУП «ГосНИИгенети-
ка») за внимательное прочтение рукописи и высказанные заме-
чания, которые были учтены при подготовке рукописи к изда-
нию.

Авторы будут признательны читателям за присланные замеча-
ния и пожелания.

Необходимость появления данной книги продиктована интересом, возникшим в последнее время к миру микроорганизмов и биотехнологическим процессам, разрабатываемым на основе их активностей.

Микроорганизмы представляют собой, по определению, невидимые человеческому глазу без увеличения существа, которые вездесущи и проводят в природе колоссальную работу, заключающуюся прежде всего в минерализации отмершего биологического материала (микробный цикл углерода и связанный с ним цикл кислорода). Без микробов было бы невозможно существование глобальных циклов азота и серы. Микроорганизмы, несмотря на их малые размеры и массу, составляют в целом биомассу, больше чем вся остальная биомасса на Земле (растения и животные вместе взятые).

Основными объектами изучения микробиологии являются прокариоты, которые на основании определения последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, отнесены к двум доменам живого на Земле, в третий домен помещены все растения, животные и все эукариотические микроорганизмы — водоросли, грибы и простейшие.

Микроорганизмы населяют все экологические ниши и живут там, где развиваются животные и растения, а также во многих других ареалах, в которых не могут развиваться другие живые организмы — при высоких (до 113 °С) и низких (до -36 °С) температурах, высоких (до 1 400 атм) давлениях, при полном отсутствии кислорода, в условиях высокой солености (в насыщенных растворах NaCl), при высокой кислотности (рН 0—1) и щелочности (рН до 11). Микроорганизмы-прокариоты могут развиваться в скальных породах на глубине до 6 км, на вершинах высоких гор (6—7 км), в безводных пустынях, на поверхности зданий, сооружений и памятников. Споры микробов чрезвычайно устойчивы, они могут выдерживать условия космического пространства и выживать в течение 20—30 млн лет (например, в кишечнике пчелы, замурованной в кусочке янтаря).

Общая микробиология. Занимается изучением неболлезнетворных (непатогенных) микроорганизмов, их распространением, систематикой, метаболизмом, экологией и т.д. Поэтому в общей микробиологии выделяют следующие направления:

■ **промышленная микробиология** (часть общей науки биотехнологии) — исследует микроорганизмы и процессы, приводящие к образованию полезных веществ или продуктов. В этой области зна-

ний, объединяющей фундаментальную науку (получение новых генно-инженерных штаммов высокой производительности) и технологию (крупномасштабное выращивание микроорганизмов), можно отдельно выделить производства антибиотиков для медицины и ветеринарии, ферментов, спиртов, органических и аминокислот, витаминов и гормонов — все эти производства основаны на применении микроорганизмов. Частью промышленной микробиологии можно считать *пищевую микробиологию* с производством молочнокислых, алкогольных, заквашенных продуктов и хлеба;

■ **сельскохозяйственная микробиология** имеет дело с проблемами, связанными с повышением плодородия почвы и урожайности растений. В последнее время активно развивается отрасль этой науки — получение *трансгенных растений*;

■ **экология микроорганизмов**, бурно развиваясь в последнее время, вобрала в себя многие проблемы, которые раньше решали *водная микробиология* и *геологическая микробиология*;

■ **космическая микробиология** решает задачи поиска жизни на других планетах, проблемы возможного загрязнения космоса земными микробами (спорами), развития микроорганизмов на космических кораблях и привнесения «космических пришельцев-микробов» на Землю;

Медицинская микробиология. Имеет дело с патогенными микроорганизмами, вызывающими болезни человека;

■ **санитарная микробиология** является частью медицинской микробиологии, объекты исследования которой — *эпидемиология* и *санитарный контроль* окружающей среды (вода, воздух, почва) и пищевых продуктов;

■ **ветеринарная микробиология** изучает проблемы эпидемиологии и здоровья сельскохозяйственных и диких животных.

Некоторые исследователи считают разделом микробиологии и вирусологию, однако в нашей стране традиционно проблемы разнообразия вирусов и изучения вирусных инфекций рассматривает наука *вирусология*.

Мир микроорганизмов во всем его разнообразии еще далеко не познан. Данные, полученные с помощью методов молекулярной биологии (амплификация, разделение и секвенирование генов, кодирующих 16S рРНК) в изучении распространения микроорганизмов, позволяют утверждать, что человек способен культивировать лишь менее 1 % всех микроорганизмов, живущих на Земле. Если скорость идентификации новых видов будет оставаться на современном уровне, то для описания и классификации всех животных понадобится 30 лет, всех растений — 50 лет, а всех микроорганизмов — 10 тыс. лет! В связи с этим перед микробиологами стоит задача ускорения выделения, идентификации и классификации новых, еще не открытых микроорганизмов, для скорейшего завершения познания биологического разнообразия микробов на Земле.

МИКРОБИОЛОГИЯ КАК НАУКА. ИСТОРИЯ МИКРОБИОЛОГИИ

Микробиология как наука

Микробиология — наука о живых организмах, не видимых невооруженным человеческим глазом, размерами менее 1 мм. Объектами микробиологии являются прокариотические организмы — бактерии и археи, а также эукариоты — простейшие, микроскопические водоросли, низшие грибы.

Место микробиологии в системе биологических наук определяется спецификой ее объектов: во-первых, микробиология — это наука об определенном классе объектов, и в этом смысле она аналогична таким дисциплинам, как ботаника и зоология; во-вторых, микробиология изучает на своих объектах общие фундаментальные законы развития всего живого и таким образом относится к физиолого-биохимической ветви биологических дисциплин.

И наконец, микробиология — это наука, исследующая объекты и явления на стыке одно- и многоклеточности.

Роль микробиологии определяется значением микроорганизмов в природных процессах и в человеческой деятельности:

- микроорганизмы участвуют в глобальном круговороте элементов, причем ряд стадий был бы невозможен без них, например фиксация молекулярного азота, денитрификация или минерализация сложных органических веществ;

- на деятельности микроорганизмов основан целый ряд необходимых человеку производств (хлебопечение, пивоварение, виноделие, получение молочнокислых продуктов, производство различных индивидуальных химических веществ, антибиотиков, гормонов, ферментов и т.д.);

- микроорганизмы используются для очистки окружающей среды от различных природных и антропогенных загрязнений;

- многие микроорганизмы являются возбудителями заболеваний человека, животных, растений, а также вызывают порчу продуктов питания и различных промышленных материалов;

- микроорганизмы могут служить инструментами и модельными системами для других дисциплин, например генной инженерии.

Исходя из выполняемых задач, сама микробиология подразделяется на общую, частную (отдельных групп микроорганизмов) и медицинскую.

История развития микробиологии

История развития микробиологии исчисляется примерно с 1661 г., когда голландский торговец сукном Антони ван Левенгук впервые описал микроскопические существа, наблюдаемые им в микроскоп собственного изготовления. А. Левенгук в свободное время конструировал микроскопы с короткофокусными, почти сферическими линзами, дававшими увеличение в 50—300 раз, и изучал самый широкий спектр объектов — микроструктуру растительных и животных клеток, сперматозоиды и эритроциты, различные субстраты естественного и искусственного происхождения, поэтому следует отметить его вклад и в развитие других наук. Для микробиологии же важно, что он впервые увидел микробов и описал их основные группы, а также сделал вывод о том, что они повсюду. Описания своих наблюдений, сопровождаемые тщательными зарисовками, А. Левенгук посылал в Английское Королевское общество, где они были переведены со староголландского на английский язык. Этот период истории микробиологии можно условно назвать *описательным*.

Физиологический этап развития микробиологии начался приблизительно с середины XIX в. и связан с именами французского химика-кристаллографа Луи Пастера и немецкого сельского врача Роберта Коха. Эти ученые положили начало экспериментальной микробиологии и существенно обогатили методологический арсенал этой науки.

Л. Пастер доказал, что причиной химических изменений субстратов являются микроорганизмы, и опроверг теорию самозарождения. Исследования природы брожений стали продолжением работы по выяснению причины прокисания вина. Л. Пастер показал, что каждое брожение имеет главный конечный продукт и вызывается микроорганизмами определенного типа. Эти исследования привели к открытию неизвестного ранее образа жизни — анаэробного метаболизма. Изучая на примере дрожжей возможность переключения с одного типа обмена веществ на другой, Л. Пастер показал, что анаэробный метаболизм энергетически менее выгоден. Работы по изучению возбудителей «болезней» пива и вина позволили Л. Пастеру предложить способ тепловой обработки этих продуктов, предохраняющий их от порчи, который получил название «пастеризация». Они же навели ученого на мысль о том, что микроорганизмы, возможно, являются возбудителями и инфекционных болезней человека. Исследования микробной

природы многих заболеваний человека в дальнейшем велись институтами Л. Пастера (в Париже) и Р. Коха (в Берлине) параллельно.

Роберт Кох, начав с доказательства бактериальной этиологии сибирской язвы, затем выделил возбудителей многих болезней в чистой культуре (среди них *Mycobacterium tuberculosis*, или «палочка Коха»). Р. Кох окончательно сформулировал триаду, получившую его имя, для доказательства микробной этиологии заболевания: 1) микроорганизм должен присутствовать в материале больного; 2) выделенный в чистой культуре, он должен вызывать ту же болезнь; 3) возбудитель при экспериментально вызванном повторном заболевании должен снова быть выделен в чистую культуру, и две эти чистые культуры должны быть идентичными. В лаборатории Р. Коха введены в практику эксперимента методы получения чистых культур, а также использование в микробиологических исследованиях твердых сред на основе сначала желатины, а затем и агара. Знаменитая чашка Петри и бактериальные фарфоровые фильтры Шамберлана также были введены в практику сотрудниками института Р. Коха.

Признание огромной роли микроорганизмов в биологически важных круговоротах элементов на Земле связано с именами Сергея Николаевича Виноградского и Мартинуса Бейеринка. С. Н. Виноградскому принадлежит открытие уникального образа жизни — хемолитоавтотрофии и изучение серных и нитрифицирующих бактерий. С. Н. Виноградский и М. Бейеринк независимо друг от друга показали, что фиксацию молекулярного азота способны проводить только микроорганизмы, и выделили свободноживущих и симбиотических азотфиксаторов. С. Н. Виноградским разработан метод накопительных культур.

На рубеже XIX и XX вв. Дмитрий Иванович Ивановский открыл вирус табачной мозаики, тем самым обнаружив особую группу биологических объектов, не имеющих клеточного строения.

В XX в. микробиология развивалась, опираясь в том числе и на открытия, сделанные в других областях биологии.

Здесь названо лишь несколько великих имен, однако не надо забывать, что их открытия были подготовлены работами многих известных и рядовых исследователей, имена некоторых из них будут приведены в других подразделах этого курса.

Развитие отечественной микробиологии в XX в. представлено различными направлениями и деятельностью многих ученых с мировым именем. Перечислим лишь некоторые из них. Большой вклад в геносистематику микроорганизмов внесли А. Н. Белозерский и А. С. Спирин. М. Н. Мейсель с коллегами подробно изучил клеточные структуры и их функции у микроорганизмов. В. Н. Шапошников создал теорию физиологической двухфазности брожений, что позволило управлять процессами получения

важных продуктов в микробиологических производствах. Физиология и биохимия многих фототрофных и хемолитотрофных микроорганизмов была подробно изучена Е. Н. Кондратьевой и ее коллегами. Изучением биохимии процесса азотфиксации занимались А. А. Имшенецкий, В. Л. Кретович, В. А. Яковлев. Экологическое направление представлено работами В. Л. Омелянского, который разработал схемы круговорота веществ в природе и изучил жизнедеятельность микроорганизмов, участвующих в глобальных циклах азота (нитрификаторов и азотфиксаторов), серы (гнилостных, сульфатредуцирующих и тионовых бактерий) и железа (железобактерий). Методы прижизненного наблюдения микроорганизмов, внедренные в микробиологическую практику, — капилляры Перфильева, стекла обрастания Росси — Холодного, почвенная камера и метод проращивания почвенной пыли по Холодному, — активно используются и в настоящее время.

Микробные сообщества, а также их роль в разных природных и искусственных местообитаниях изучаются М. В. Ивановым и Г. А. Заварзиным с коллегами. В области управляемого культивирования микроорганизмов Н. Д. Иерусалимским была разработана теория роста и развития микробов, И. Л. Работновой изучены реакции окисления — восстановления. Основы управляемого культивирования грибов и водорослей заложили Е. Е. Успенский и С. И. Кузнецов. Микробиологический путь получения аминокислот предложен Н. А. Красильниковым, витамина B₁₂ с помощью метаногенных микроорганизмов — В. Н. Букиным и В. Я. Быховским. Всестороннее изучение процесса микробиологической трансформации стероидов и внедрение его в производство было проведено Г. К. Скрыбиным с коллегами.

Современная микробиология

В развитии современной микробиологии необходимо выделить следующие основные направления:

- фундаментальные исследования (выяснение путей метаболизма, выделение, очистка ферментов, регуляция обмена веществ и т. д.);
- систематика микроорганизмов (построение филогенетического древа);
- экологическая микробиология (роль микроорганизмов в природных экосистемах и пищевых цепях);
- популяционная микробиология (выяснение природы межклеточных контактов и взаимосвязь клеток в популяции);
- медицинская, ветеринарная и сельскохозяйственная микробиология;

■ техническая (промышленная) микробиология (включает все практические аспекты).

Необходимо помнить о том, что многие исследования проводятся на стыке дисциплин (например, молекулярная микробиология, генная инженерия).

Основными методами микробиологических исследований являются:

■ микроскопия (световая, люминесцентная, электронная, лазерная);

■ выделение чистых культур и контролируемое культивирование;

■ аналитические методы (физиолого-биохимические, генетические, молекулярно-биологические и т.д.).

Контрольные вопросы

1. Назовите группы организмов, относящихся к объектам микробиологии.

2. Какое место занимает микробиология в системе биологических дисциплин?

3. Какова роль микроорганизмов в природе и деятельности человека?

4. Назовите наиболее важные открытия в истории микробиологии.

5. По каким основным направлениям развивается микробиология в настоящее время?

Глава 2

СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗМОВ

Основные понятия. Критерии определения микроорганизмов

Мир микроорганизмов включает любой организм микроскопических размеров, поэтому понятно, что термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла. Микроорганизмы встречаются в самых разных таксономических группах, причем другие члены этой группы могут быть и макроорганизмами (например, водоросли и грибы).

Микроорганизмы — это самая обширная по количеству представителей группа, члены которой повсеместно распространены. У микроорганизмов встречаются все известные типы обмена веществ. Именно микроорганизмы были первыми живыми существами на нашей планете, которые и сформировали ее облик.

Накопление огромного фактического материала потребовало классифицировать изучаемые в микробиологии объекты для удобства работы с ними.

Под *классификацией* понимают отнесение конкретного биологического объекта к определенной группе однородности (*таксону*) по совокупности присущих ему признаков. Отношения между таксонами организмов изучает *систематика*. В современной классификации микроорганизмов принята следующая иерархия таксонов: домен, филум, класс, порядок, семейство, род, вид. Вид является основной таксономической единицей. Микробиологи пользуются биномиальной системой обозначения объекта (*номенклатуры*), включающей родовое и видовое названия, например *Escherichia coli*.

В настоящее время определение микроорганизмов (*идентификация*) базируется на следующих критериях:

■ морфология клеток и колоний (на определенных средах и при определенных условиях);

■ цитология клеток (про- или эукариоты);

■ культуральные признаки (характер роста на твердых и жидких средах);

■ физиологические свойства (использование различных субстратов, отношение к температуре, аэрации, pH и т.д.);

■ биохимические свойства (метаболические пути);

- молекулярно-биологические свойства (содержание ГЦ — АТ-пар в мол. %, гибридизация нуклеиновых кислот, анализ нуклеотидной последовательности 16S рРНК);

- хемотаксономия (химический состав различных соединений и структур, например спектр жирных и тейхоевых кислот у актиномицетов, миколовых кислот у нокардий, микобактерий, коринебактерий);

- серодиагностика (реакция антиген-антитело, особенно для патогенных микроорганизмов);

- фаготипирование (использование специфических фагов).

Иногда у микроорганизма отмечают наличие внехромосомных элементов. Правда, следует помнить, что бывают плазмиды молчащие (криптические) или кодирующие необязательные для вида признаки, к тому же плазмиды могут легко утрачиваться.

В настоящее время для идентификации микроорганизмов-прокариот исследователи пользуются *определителем Берджи*.

Современная классификация микроорганизмов

Представление о месте микроорганизмов среди других живых существ эволюционировало с течением времени от отнесения их к животным или растениям до выделения в три отдельных *домена* (надцарства, империи). По современным представлениям, микроорганизмы делятся на прокариот и эукариот в зависимости от строения их клеток. Из-за того, что большинство микроорганизмов устроено крайне просто и для их классификации простого описания было недостаточно, исследователи привлекали функциональные характеристики. Как правило, микробиологический объект невозможно классифицировать, не применив совокупность морфологических, биохимических и молекулярно-биологических данных. При этом перечисленные признаки могут иметь неодинаковую значимость.

Существует также более формальная *нумерическая таксономия*, где все признаки альтернативны и имеют «одинаковый вес». Это позволяет дать количественную оценку степени сходства и различия организмов путем вычисления коэффициентов сходства или соответствия. Для использования нумерической классификации необходимо как можно полнее изучить фенотипические признаки микроорганизма, так как от этого зависит точность помещения его в данную группу.

В настоящее время основным является *филогенетический подход* к систематике микроорганизмов, который учитывает родственные связи и пути эволюции организмов. В такой классификации иерархия таксонов отражает генеалогическое древо. Однако при отсутствии в большинстве случаев ископаемых остатков микроор-

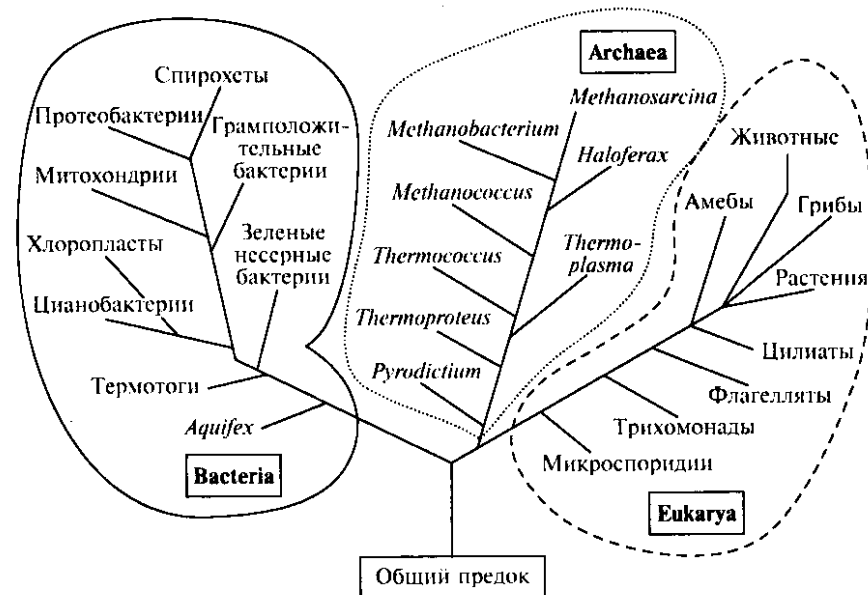


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное на основании анализа 16S рРНК

ганизмов невозможно напрямую установить исторический путь эволюции.

На основании исследований профессора Иллинойского университета К. Вёза (С. Woese) сделана попытка перехода к филогенетической классификации микроорганизмов. При этом сравнивают нуклеотидные последовательности 16S рРНК, состоящей из 1 500 нуклеотидов, из которых 900 — консервативны. Эта молекула обладает достаточно большой, но не чрезмерной информацией и считается своеобразным биологическим генетическим «хронометром». На основе множества сравнений с помощью компьютера было построено филогенетическое древо (рис. 1). Одновременно было доказано, что митохондрии и хлоропласты имеют бактериальное симбиотическое происхождение. Анализ 16S рРНК позволяет определить место микроорганизма на филогенетическом древе, а нахождение видового названия ведется традиционными микробиологическими методами. При этом 90 % совпадений указывает на принадлежность к определенному роду, 97 % — к определенному виду. Более точный метод — ДНК — ДНК-гибридизация, который дает более 30 % совпадений в пределах рода и более 70 % — в пределах вида.

В последнее время для более четкой дифференцировки микроорганизмов на уровне рода и вида, когда подходы, основанные на молекулярно-биологических приемах, недостаточны, предлага-

гают использовать *полифилетическую таксономию* и наряду с определением последовательностей нуклеотидов применять для анализа и другие источники информации многокоординатной таксономии. Термин «полифазная таксономия» был предложен в 1970 г. американским профессором-микробиологом Ритой Колвелл для обозначения таксономии, которая включает и объединяет много уровней информации, от молекулярного до экологического, и учитывает несколько определенных, различающихся порций информации, происходящих из негомогенных систем, для создания полифазной таксономии. В настоящее время полифазной таксономией обозначают *консенсусную таксономию*, которая старается использовать всю имеющуюся информацию для выделения консенсусных таксономических групп.

Минимальные требования для получения полезной полифилетической информации включают:

- предварительный поиск групп схожих штаммов;
- определение филогенетических позиций этих групп;
- измерения различий между группами и их ближайшими соседями;
- сбор различных данных, дифференцирующих группы, предпочтительно на разных уровнях клеточной организации.

Предлагались и другие подходы для выявления родственных связей микроорганизмов, например определение последовательности аминокислот в белке цитохрома *c*, который есть не у всех, и определение полной последовательности ДНК. Такие подходы позволяют сопоставить эволюционные пути развития в более узких таксономических группах.

В настоящее время разрабатывается классификация всех живых существ, в которой выделены три *домена* (надцарства): Bacteria, Archaea и Eukarya на основании анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

В домен Eukarya вошли все эукариотические организмы как одноклеточные, так и многоклеточные, включая человека. Группы, содержащие микроскопические объекты:

- водоросли («растущие в воде»), являющиеся одноклеточными, колониальными или многоклеточными фототрофами, осуществляющими окислительный фотосинтез. Микробиологическими объектами традиционно считаются представители красных, золотистых, диатомовых, эвгленовых и, конечно, зеленых водорослей, а также их лейкоформы, растущие в темноте и потерявшие пигменты;

- грибы, микробиологическими объектами среди которых являются низшие грибы из родов *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* и т.д., а также дрожжевые анаморфы грибов;

- простейшие, которым до недавнего времени уделяли внимание в связи с их патогенностью для человека (малярийный плазмодий, трипаномы и т.д.), но сейчас показано, что при выращивании некоторых почвенных и водных простейших микробиологическим способом в виде чистых культур можно получать ценные продукты. Например, *Astasia longa* при культивировании в ферментере на синтетической среде дает до 20 % от общего количества липидов полиненасыщенной жирной кислоты — арахидоновой.

Домен Bacteria включает прокариотические микроорганизмы, имеющие типичные признаки бактерий, в частности клеточные оболочки, содержащие *пептидогликан*.

К сравнительно новому домену Archaea относятся микроорганизмы, разделенные на три филума: Euryarchaeota, Crenarchaeota и Korarchaeota. Первый филум объединяет повсеместно распространенные микроорганизмы. Это *метаногены* — строгие анаэробы, обитающие в донных осадках пресноводных зон, богатых органикой, или в рубце жвачных. Широко распространены также *экстремальные галофилы*, растущие при высоких концентрациях соли и способные осуществлять особый тип фотосинтеза с помощью бактериородопсина, который на свету работает как протонная помпа. Ко второму филуму относятся микроорганизмы, имеющие очень узкие и специфические места обитания. Это *экстремофилы, зависящие от серных соединений*, оптимумы pH и температуры роста которых отличаются экстремальными значениями. Третий филум зарезервирован за представителями до настоящего времени некультивируемых прокариот, для которых, однако, известны последовательности генов, кодирующих молекулу 16S рРНК.

Кроме нуклеотидной последовательности 16S рРНК, археи отличаются от бактерий и эукарий рядом существенных признаков:

- **строением мембран и липидов мембран.** В обычных липидах глицерол связан сложноэфирной связью с жирными кислотами, а у архей — простой эфирной связью с C₂₀-спиртом — *фитанолом*. Такие эфиры могут образовывать тетрамеры (C₄₀), а цепи фитанола могут содержать пятичленные кольца. Мембрана, образованная из тетрамеров, более ригидна, так как у нее нет внутреннего пространства (рис. 2). Археи могут иметь как обычные бислойные, так и ригидные монослойные мембраны, но чем экстремальнее условия, тем больше монослойных областей находится в мембране.

Археи содержат в мембранах 7—30 % изопреноидов (в частности, сквалена). Такие же соединения находят в нефтяных отложениях, что свидетельствует о древности этих микроорганизмов;

- **строением клеточных стенок.** У архей не найдены типичные для бактерий пептидогликановые (муреиновые) клеточные стенки. Они представлены либо псевдомуреином (нет N-ацетилмуреамовой кислоты), либо белковым S-слоем (структурированным

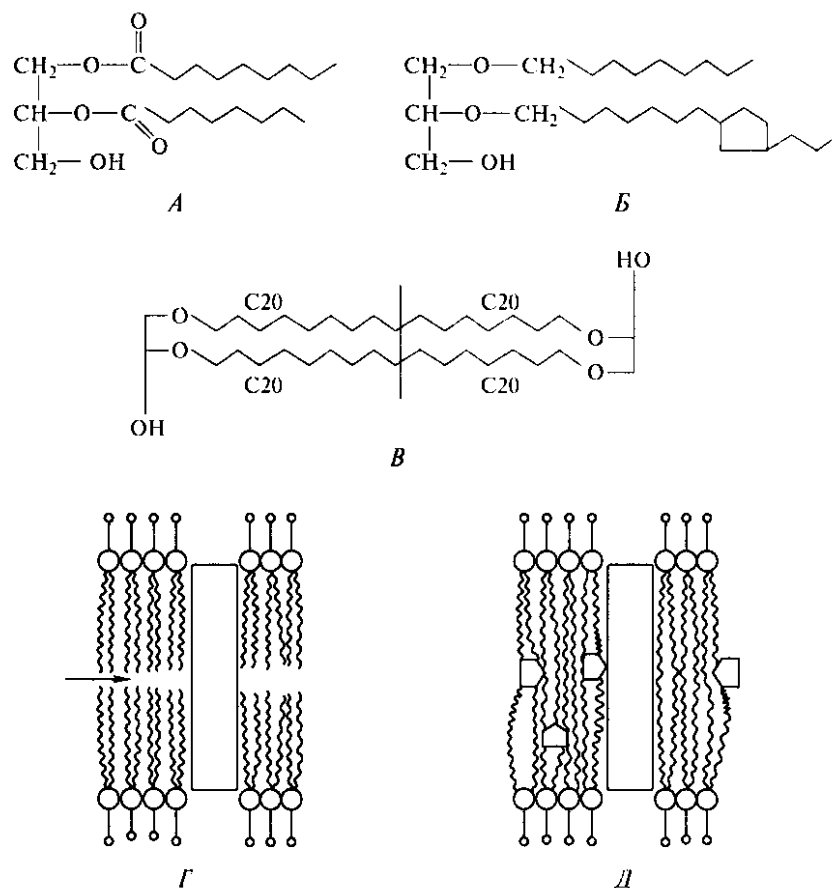


Рис. 2. Особенности строения мембран и липидов мембран у архей:
 А — строение обычных липидов; Б — строение липидов архей; В — тетрамеры фитанола; Г — обычный бислой; Д — ригидный монослой

белком, содержащим «кислые» аминокислоты, за счет чего на поверхности клетки создается тонкий слой воды, отталкивающий ионы солей). Еще один вариант организации архей — отсутствие клеточной стенки, когда мембрана почти полностью представлена ригидным монослоем из тетрамеров, усиленным большим количеством пятичленных колец, например, как у *Thermoplasma*;

■ **особенностями метаболизма.** У архей ДНК связана с гистонами и имеет интронные участки, подобно эукариотам. В тРНК архей не найдено риботимина. РНК-полимеразы этих организмов больше похожи на эукариотические по субъединичному составу. Трансляция белка не чувствительна к хлорамфениколу (как у бактерий), зато чувствительна к дифтерийному токсину (как у эука-

риот). У архей найдены уникальные коферменты — метаноптерин, метанофуран, F₄₂₀, F₄₃₀ (правда, метаноптерин обнаружен и у факультативных метилотрофов). Автотрофная фиксация углекислоты у архей происходит нециклическим путем (*ацетил-КоА-путь*). Галофильные археи осуществляют фотосинтез, связанный с функционированием особого белка, бактериородопсина, с ретиналем в качестве простетической группы, по многим свойствам схожего с родопсином сетчатки зрительного органа животных.

Археи обычно существуют в экстремальных условиях и дают скудный рост. Однако в таких местообитаниях у них мало конкурентов, что позволило им сохраниться до настоящего времени.

Контрольные вопросы

1. Объясните, почему термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла.
2. Что понимают под классификацией и систематикой биологических объектов?
3. Почему микроорганизмы не удается классифицировать только по их морфологическим характеристикам?
4. Проанализируйте достоинства и недостатки применяемых в настоящее время способов классификации и систематики микроорганизмов.
5. Какие группы микроорганизмов входят в состав домена Eukarya?
6. В какие домены объединены прокариотические микроорганизмы? Чем отличаются прокариоты, включенные в разные домены?
7. Назовите черты сходства и различия архей и бактерий, архей и эукарий.

МОРФОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Общие сведения

Материал этой главы тесно связан с применением и развитием микроскопических методов исследования, которые подробно изучаются на практических занятиях.

Для большинства бактерий и архей можно считать справедливым утверждение о том, что это маленькие, просто устроенные организмы, имеющие универсальное строение. С другой стороны, мир микробов, населяющих нашу планету, чрезвычайно разнообразен. Его представители различаются морфологически, а также физиологическими и биохимическими свойствами. По принципу клеточной организации все микроорганизмы могут быть разделены на два типа — прокариоты и эукариоты. У прокариот ядерный аппарат, называемый часто нуклеоидом, представлен, в большинстве случаев, кольцевой молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. У эукариот ядро содержит набор хромосом и отделено от цитоплазмы мембраной. Различия в организации ядерного аппарата коррелируют с рядом других особенностей эу- и прокариот (табл. 1). Первоначально к микроорганизмам относили и вирусы, однако в настоящее время их чаще рассматривают как особые формы жизни, не имеющие клеточного строения и содержащие, в отличие от про- и эукариот, лишь один тип нуклеиновых кислот (ДНК или РНК).

Среди прокариот различают бактерии и археи. Основанием для выделения этих групп, рассматриваемых в настоящее время как отдельные домены, послужили, прежде всего, результаты сравнения олигонуклеотидных последовательностей 16S рибосомальных РНК, а также выявление различий в составах клеточных стенок, липидов и ряда других особенностей. Большинство известных прокариот составляют различные группы бактерий. Известные археи включают группы метаногенов, отдельных сульфатредукторов, экстремальных галофилов, термоплазм, лишенных клеточных стенок, а также экстремально термофильных микроорганизмов, окисляющих и восстанавливающих элементарную серу. За последние годы обнаружено значительное число новых представителей архей и их количество продолжает пополняться.

Некоторые отличительные признаки эукариот и прокариот

Характеристика	Прокариоты	Эукариоты
<i>Цитологические признаки:</i> наименьший размер клетки 0,05 мкм наличие оформленного ядра наличие автономных органелл (митохондрии, хлоропласты)	+ - -	- + +
<i>Локализация рибосом:</i> распределены в цитоплазме прикреплены к эндоплазматическому ретикулуму	+ -	- +
<i>Жгутики (если присутствуют):</i> диаметр 0,01 — 0,02 мкм диаметр около 0,2 мкм	+ -	- +
<i>Молекулярно-биологические особенности:</i> число хромосом кольцевая хромосома линейные хромосомы константы седиментации рибосом: 70S 80S константы седиментации рибосомной РНК: 5S, 16S, 23S 5S, 5,8S, 18S, 28S	1 — 2 + -(+) + + - + + - -	> 1 - + - + - +
<i>Признаки, основанные на химических анализах:</i> присутствие пептидогликана	+(-)	-
<i>Особенности размножения:</i> клеточное деление происходит в результате митоза возможность мейоза	- -	+ +
<i>Перенос генов и рекомбинация включают:</i> гаметогенез и образование зиготы латеральный (горизонтальный) перенос генов	- -(-)	+ -
<i>Питание:</i> диффузия или транспорт через мембрану эндоцитоз	+ -	+ +
<i>Метаболические особенности:</i> дыхательный и фотосинтезирующий аппарат ассоциирован с плазматической мембраной или ее выростами возможность хемолитотрофного метаболизма способность к фиксации молекулярного азота способность к метаногенезу способность к анаэробному фотосинтезу	+ + + + +	- - - - -

Размеры, форма и группирование клеток

Несмотря на то, что термин «микроорганизм» подразумевает малые размеры, этот признак варьирует в довольно широких пределах (табл. 2).

Размеры клеток большинства прокариот находятся в пределах 0,2—10,0 мкм (рис. 3). Однако среди них есть «карлики» (трепоне-мы, микоплазмы и нанобактерии размерами примерно 0,05—0,1 мкм) и «гиганты» (*Achromatium*, *Macromonas* длиной до 100 мкм). Самыми крупными из выделенных до настоящего времени прокариот являются клетки *Epulopiscium fishelsoni* (рис. 4), обитающие в кишечнике глубоководной рыбы-хирурга, длиной до 600 мкм и диаметром до 100 мкм, и *Thiomargarita namibiensis*, найденные в прибрежных водах Чили и Намибии, диаметром 400—600 мкм. В то же время необходимо отметить, что морская водоросль *Nanochlorum eukaryotum*, несмотря на очень малые размеры (см. табл. 2), имеет настоящее ядро, хлоропласты и митохондрии. Резюмируя данные табл. 2, можно сделать вывод о том, что размеры известных в настоящее время прокариотических микроорганизмов находятся в пределах от 0,05 до 600 мкм.

Формы клеток бактерий не отличаются большим разнообразием. Обычно это палочки разной длины, сферические клетки (кокки), а также извитые формы — вибрионы и спириллы. Клетки бактерий могут образовывать довольно устойчивые сочетания — пары палочек и кокков (диплококки), короткие и длинные цепочки палочек и кокков (стрептококки), тетрады и пакеты из 4, 8

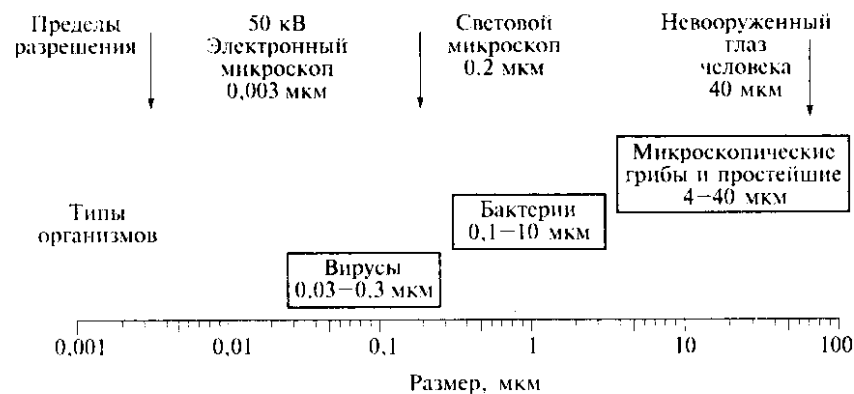


Рис. 3. Шкала относительных размеров микроорганизмов

Рис. 4. Темнопольная световая микроскопия гигантского прокариота, симбионта кишечника рыбы-хирурга *Epulopiscium fishelsoni*. Палочковидные клетки *E. fishelsoni* с закругленными концами размером около 0,6 мм на снимке приведены рядом с тремя клетками простейших *Paramecium*, длина каждой из которых около 150 мкм



Таблица 2

Размеры отдельных представителей живого мира

Организм	Размер, мкм
Нанобактерии	$d < 0,05$
Поксвирусы	$d \sim 0,3$
Микоплазмы	$d = 0,3$
<i>Nanochlorum eukaryotum</i>	$d \sim 1,0-2,0$
<i>E. coli</i>	$1,1-1,5 \times 2,0-6,0$
Спирохеты	$1,5 \times 50,0$
<i>Oscillatoria</i> sp.	$d \sim 7,0$
Эритроциты	$d = 7,0$
<i>Epulopiscium fishelsoni</i>	$100,0 \times 600,0$
<i>Thiomargarita namibiensis</i>	$d \sim 600,0$

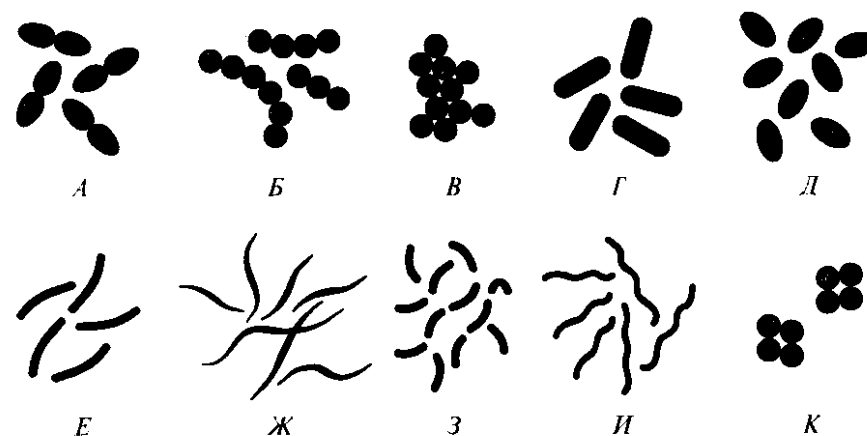


Рис. 5. Формы и сочетания бактериальных клеток:

А — диплококки; Б — стрептококки; В — стафилококки; Г — бациллы; Д — коккобациллы; Е — палочки; Ж — тонкие палочки; З — вибрионы; И — спириллы; К — тетрады

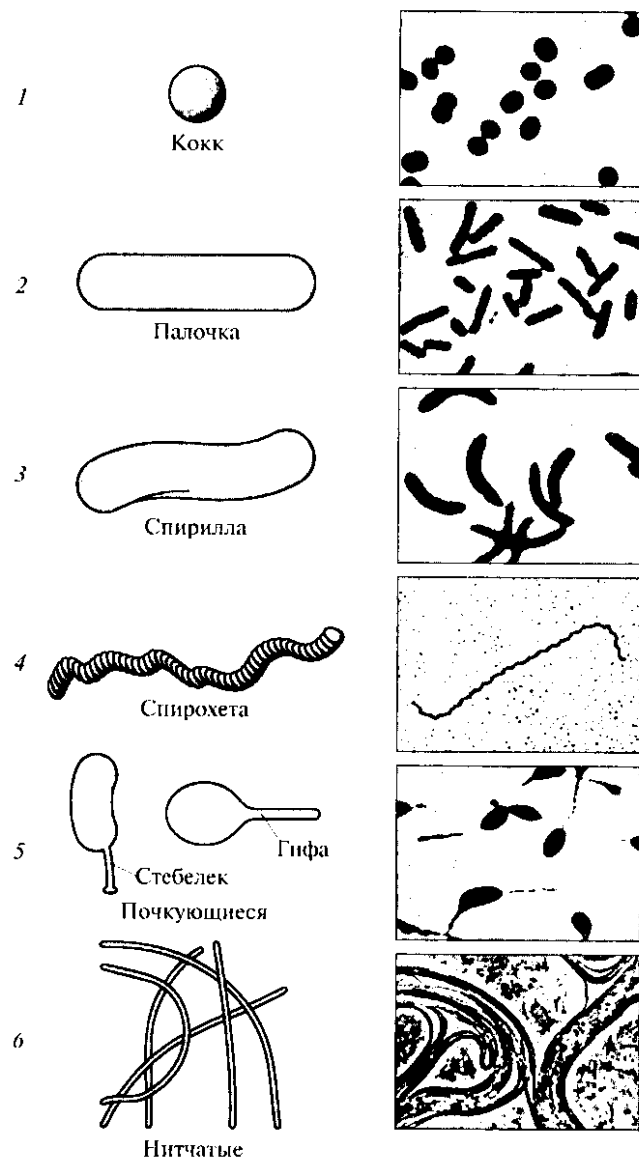


Рис. 6. Представители наиболее распространенных морфотипов бактерий (микрофотографии в фазово-контрастном микроскопе):

1 — кокки (*Thiocapsa roseopersicina*, диаметр отдельных клеток ~ 1,5 мкм); 2 — палочки (*Desulfuromonas acetoxidans*, диаметр ~ 1 мкм); 3 — спириллы (*Rhodospirillum rubrum*, диаметр ~ 1 мкм); 4 — спирохеты (*Spirochaeta stenostrepta*, диаметр ~ 0,25 мкм); 5 — почкующиеся клетки с выростами (гифы и отростки, *Rhodomicrobium vannielii*, диаметр ~ 1,2 мкм); 6 — нитевидные клетки (*Chloroflexus aurantiacus*, диаметр ~ 0,8 мкм)

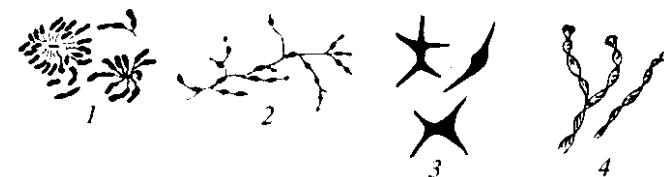


Рис. 7. Бактерии с различными выростами:

1 — *Caulobacter* sp.; 2 — *Hyphomicrobium* sp.; 3 — *Ancalomicrobium* sp.; 4 — *Gallionella* sp.

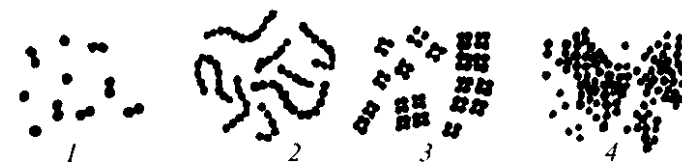


Рис. 8. Типы группирования сферических клеток:

1 — диплококки; 2 — стрептококки; 3 — тетракокки и сарцины; 4 — стафилококки и микрококки

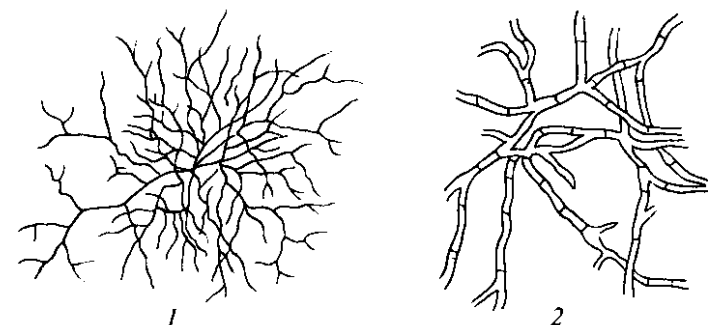


Рис. 9. Мицелиальные организмы при одинаковом увеличении:

1 — почвенный актиномицет; 2 — почвенные грибы

и более кокковидных клеток (сарцины), гроздья (стафилококки), розетки, плоские таблички, сети и трихомы (цепочки клеток, тесно примыкающие друг к другу, прямые и ветвящиеся).

В то же время существуют микроорганизмы необычной формы (квадратные, прямоугольные, бобовидные, звездчатые, тарелкообразные), ветвящиеся и образующие мицелий (актинобактерии), имеющие гифы с почками (*Hyphomicrobium*), стебельки

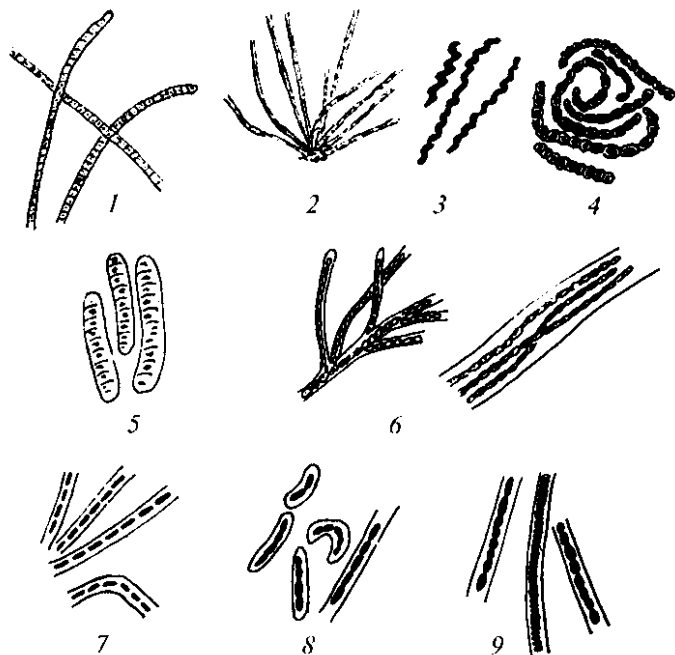


Рис. 10. Различные формы нитчатых бактерий:

1 — *Beggiatoa*; 2 — *Thiothrix*; 3 — *Saprospira*; 4 — *Simonsiella*; 5 — *Caryophanon*; 6 — цианобактерии рода *Microcoleus*; 7 — *Leptothrix*; 8 — *Sphaerotilus*; 9 — *Crenothrix*

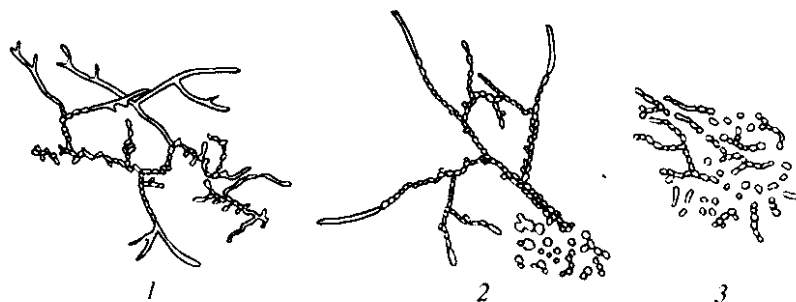


Рис. 11. Клетки нокардии на разных фазах роста культуры:

1 — 2-суточная; 2 — 4—5-суточная; 3 — 7—8-суточная

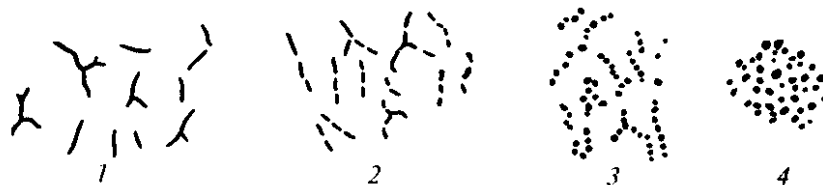


Рис. 12. Формы клеток микобактерий:

1 — суточная культура; 2 — 2-суточная; 3 — 3—4-суточная; 4 — 10-суточная

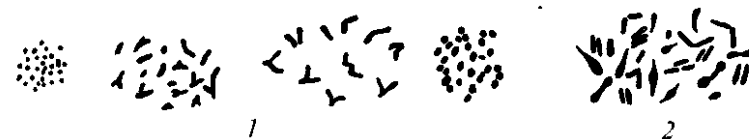


Рис. 13. Изменение формы клеток *Arthrobacter* (1) и клетки *Corynebacterium* (2)

(*Galionella*), простеки (*Campylobacter*). Существуют также бактерии, меняющие свою морфологию в течение жизненного цикла (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) и обладающие плейоморфизмом (рис. 5—13).

Строение прокариотических клеток

Схема строения типичной прокариотической клетки приведена на рис. 14.

Ядерная зона и генетический аппарат клеток прокариот. Бактериальные хромосомы были открыты много позднее, чем эукариотические, так как они не обладают свойством конденсироваться в метафазе, что делает хромосомы эукариот столь видимыми. В 40-х годах XX в. были получены первые доказательства спонтанного мутагенеза у бактерий, и это послужило основанием для предположения о наличии у прокариот мутлирующих генов — функциональных элементов хромосомы. Почти в то же время А. Эвери с коллегами раскрыл химическую природу генетического материала в экспериментах по трансформации авирулентного штамма

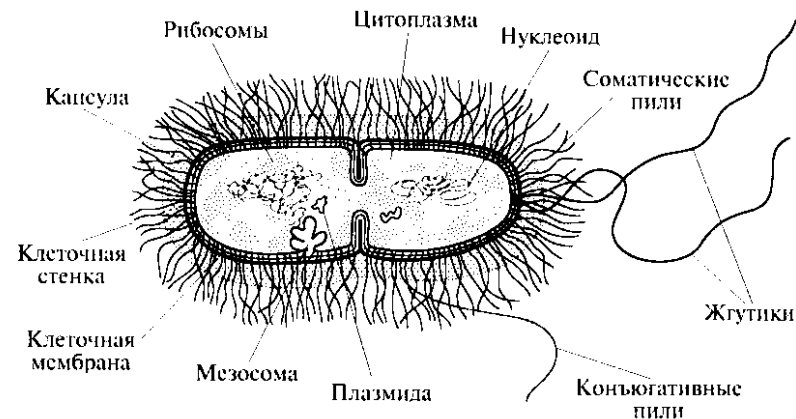


Рис. 14. Схема делящейся бактериальной клетки

пневмококка препаратом ДНК, выделенным из вирулентного штамма, с получением вирулентных клеток. Но в то время эти данные не были восприняты безоговорочно. Потребовались годы до открытия в 1952 г. того факта, что ДНК, а не белок входит в клетку бактерии при фаговой инфекции (А. Д. Херши и М. Чейз), и до расшифровки структуры ДНК в 1953 г. (Дж. Уотсон и Ф. Крик), чтобы факт передачи наследственной информации через ДНК был наконец признан. В 1956 г. внутри бактериальных клеток была обнаружена «ядерная зона», или нуклеоид, где размещена бактериальная хромосома (рис. 15). В 70-х годах стало возможным выделение компактной формы тотальной ДНК из клеток бактерий (рис. 16), что положило начало интенсивным биохимическим исследованиям нуклеиновых кислот прокариот. Состояние суперскрученности бактериальной ДНК было обнаружено в середине 60-х годов, в течение 10 лет после этого были обнаружены ферменты, которые отвечают за сверхспирализацию и раскручивание ДНК (топоизомеразы, гиразы). В целом, по представлениям молекулярной биологии, хромосома содержит: большие молекулы ДНК как носители генетической информации; молекулы РНК, копирующие и передающие информацию с определенных генов; белки, которые репарируют повреждения ДНК, удваивают ДНК и контролируют модели экспрессии генов. Белки также скручивают и складывают ДНК внутри клетки. Бактериальная ДНК обнаружена

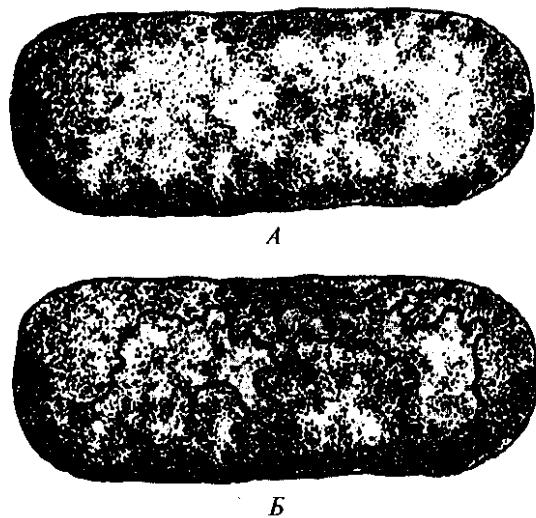


Рис. 15. Электронные микрофотографии клетки *E. coli*. А идентична Б за исключением того, что границы нуклеоидов клетки обведены жирной чертой. Зоны нуклеоида содержат меньшую концентрацию рибосом (черные точки)

в кольцевой и линейной формах. Для клеток *Escherichia coli* доказано, что ДНК существует в виде кольцевой молекулы, в то время как для *Borrelia burgdorferi* в 1989 г. показано, что клетки содержат ДНК в линейной форме. Затем линейные ДНК были обнаружены у *Streptomyces* spp., *Rhodococcus fascies* и *Agrobacterium tumefaciens*. В клетках стрептомицетов концы молекулы ДНК содержат повторяющиеся последовательности, а в *B. burgdorferi* на концах имеются шпильки, которые облегчают полную репликацию. Таким образом, эти бактерии имеют хромосомные концы, которые функционируют подобно теломерам линейных хромосом эукариот. Индивидуальная клетка прокариот может

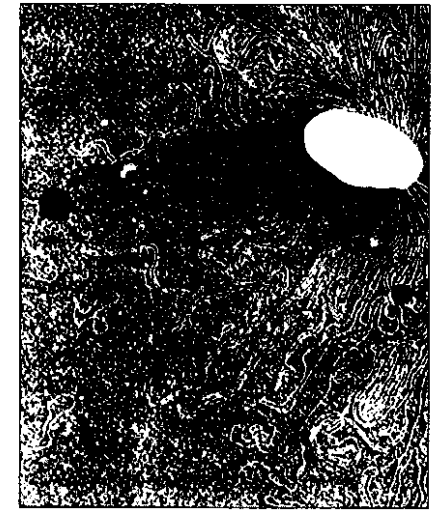


Рис. 16. Электронная микрофотография кольцевой нити ДНК, выделенной из клетки *E. coli*

содержать несколько идентичных копий одной хромосомы. У некоторых видов в клетке обнаружены две и даже три неидентичные хромосомы. Когда клетка содержит одну очень большую плазмиду, трудно определить разницу между плазмидой и хромосомой, так как обе молекулы могут нести гены, необходимые для роста.

Большинство бактерий несет все гены в одной группе сцепления, т.е. на одной хромосоме. Однако появляются свидетельства того, что разные гены могут располагаться и на разных хромосомах. У видов *Vibrio* spp., *Leptospira interrogans*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Brucella* spp. обнаружены две кольцевые хромосомы, у *Rhizobium meliloti* — три и среди различных изолятов *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* — от двух до четырех. Некоторые виды *Agrobacterium* содержат одну кольцевую и одну линейную хромосомы. От идеи о том, что прокариоты имеют лишь одну кольцевую хромосому, уже отказались. Более того, число видов с более чем одной группой сцепления генов (одной хромосомой) может оказаться гораздо больше, чем мы представляем на сегодняшний момент, поскольку значительное количество существующих в мире микроорганизмов не выделено и не изучено.

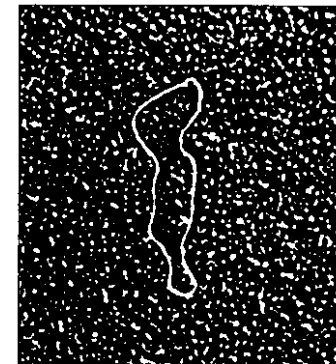
Наличие множественных копий некоторых частей хромосомы, а также всей хромосомы (полиплоидия) хорошо известно у эукариот. В дополнение к этому, клетки эукариот могут содержать тысячи копий митохондриальных и хлоропластных геномов. Мультикопийные гены и хромосомы находят также и у бактерий. На-

пример, *E. coli* содержит примерно 11 геномных эквивалентов на клетку, если быстро растет в богатой среде, в то время как количество хромосом в медленно растущих клетках равно 1—2. В этом организме большое число копий генома может ускорять клеточное деление. У *Deinococcus radiodurans* плоидность может достигать 10 в клетках из экспоненциальной фазы роста и 4 — в клетках стационарной фазы. Даже медленно растущие клетки (например, *Borrelia hermsii* со временем удвоения 8 ч) могут быть полиплоидными. У этой бактерии число копий генома достигает 8—11, когда клетки растут *in vitro*, и до 16 копий — при развитии в организме мыши. Клетки *Azotobacter vinelandii* при росте в богатой среде достигают плоидности 4—40 геномов и 100 в стационарной фазе. Затем плоидность сокращается и начинается новый цикл. Такая яркая картина увеличения плоидности не наблюдается в случае, если клетки развиваются в минимальной среде. Однако «чемпионом» к настоящему времени считается *Epulopiscium fishelsoni*, содержание ДНК в клетках которого может различаться на 4—5 порядков на разных стадиях жизненного цикла. Возможно, клетки используют ДНК как запасное вещество, подобно крахмалу, жиру или гликогену для других организмов. В связи с вышеизложенным, бактериальные и эукариотические хромосомы нельзя больше рассматривать как совершенно разнородные в отношении формы (оба типа могут быть линейными), уровня плоидности (оба типа могут быть полиплоидными) и количества групп сцепления (бактерии, которые часто имеют одну, могут иметь несколько групп; эукариоты, которые обычно имеют несколько, могут иметь только одну группу, как в случае *Myrmecia pilosula*).

Остается самое большое различие между эу- и прокариотами в организации наследственного аппарата — окруженное ядерной мембраной оформленное ядро у эукариот, наличие гистонов и упаковка ДНК в нуклеосомы. У бактерий не найдены пока гистоны и нуклеосомы, поэтому упаковка ДНК у них происходит иначе. С другой стороны, некоторые археи имеют гистоноподобные белки и стабильные нуклеосомы, в то время как некоторые одноклеточные эукариоты лишены и того и другого! Таким образом, на уровне организации хромосом различия между прокариотами и эукариотами могут быть не столь явными, как это ранее предполагалось.

Плазмиды. У значительного количества микроорганизмов обнаружены плазмиды вдобавок к основной хромосоме (рис. 17). Это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, которые могут существовать и реплицироваться как независимо от бактериальной хромосомы, так и быть интегрированными в нее. Плазмиды не являются обязательным для клетки элементом, хотя могут давать определенные преимущества. Известно, что плазмиды могут нести гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам, различ-

Рис. 17. Электронная микрофотография Р-плазмиды, выделенной из клетки *E. coli*. Размер плазмиды — около 64 МДа, она содержит около 40 тпн



ным лекарственным препаратам, гены факторов патогенности, гены, определяющие дополнительную метаболическую активность. Например, плазмиды кодируют некоторые ферменты деградации ароматических соединений. Способность к конъюгации определяется наличием F-плазмиды.

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ). Цитоплазма каждой клетки окружена мембраной, которая ограничивает клетку от клетки и от окружающей среды. Клетки эукариот имеют, кроме того, многочисленные внутриклеточные мембраны, которые отделяют внутренний объем органелл, обеспечивающих специализированные метаболические функции. Бактерии и археи обычно лишены внутрицитоплазматических мембран (исключением являются метанотрофы, фототрофы и нитрифицирующие бактерии) и содержат только ЦПМ, которая состоит из простых фосфолипидов, образующих мембранный бислой, куда погружены многочисленные белки. Этот бислой обладает свойством избирательной проницаемости, препятствуя свободному продвижению большинства веществ внутрь клетки и из нее. В матрикс ЦПМ заключены также некоторые мембранные белки, имеющие ряд важных функций, включая преобразование и запасание метаболической энергии, регуляцию поглощения и выброса всех питательных веществ

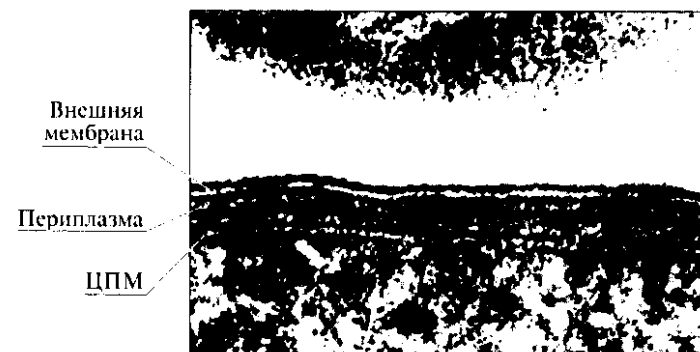


Рис. 18. Электронная микрофотография тонкого среза клетки патогена рыб *Aeromonas salmonicida*. Четко видна трехслойная мембрана, ограничивающая цитоплазму



Рис. 19. Электронная микрофотография сколов поверхности замороженных клеток *Aeromonas salmonicida*. Видна поверхность клеточной мембраны с многочисленными впячиваниями мембранных белков

и продуктов метаболизма. Мембранные белки, кроме того, узнают и передают многие сигналы, отражающие изменения в окружающей среде, и запускают соответствующий каскад реакций, приводящий к клеточному ответу. ЦПМ играет значительную роль в росте и делении клеток, движении, экспорте поверхностных и внеклеточных белков и углеводов (экзополисахаридов).

Клеточные мембраны хорошо различимы в просвечивающем электронном микроскопе (рис. 18) при соответствующем увеличении и контрастировании тяжелыми металлами. Они имеют вид характерных трехслойных образований с двумя внешними темными электронно-плотными слоями, показывающими положение полярных (головных) групп липидов, и сравнительно более светлым средним слоем, отражающим гидрофобное внутреннее пространство. Все клеточные мембраны, просматриваемые на препаратах, полученных с помощью техники контрастирования, похожи друг на друга, независимо от источника мембран и содержания в них белков. Большинство биологических мембран имеют толщину 4—7 нм.

Другой метод исследования мембран заключается в получении сколов замороженных при температуре жидкого азота клеток и контрастировании образующихся поверхностей с помощью напыления тяжелых металлов (платина, золото, серебро). Полученные препараты просматривают в сканирующем электронном микроскопе. При этом можно увидеть поверхность мембраны и включенные в нее мозаично мембранные белки (рис. 19). Такая организация мембран хорошо объясняется жидкокристаллической моделью с мозаичным вкраплением мембранных белков, в которой мембранные липиды образуют бислой, где неполярные области их молекул обращены друг к другу в центральной части мембраны, а их полярные группы смотрят наружу (рис. 20). Мембранные белки пронизывают бислой мембраны и могут диффундировать в

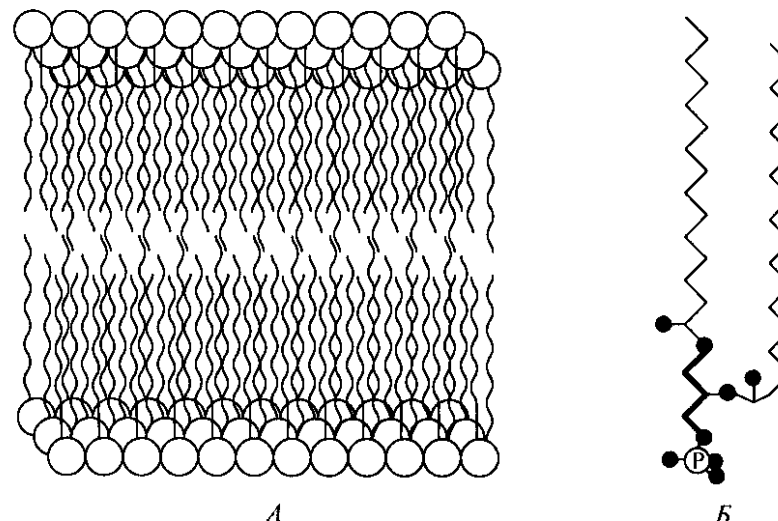


Рис. 20. Строение мембран и липидов мембран:

А — схема устройства липидного бислоя мембраны. Полярные группы липидов обращены наружу в водную среду, тогда как ацильные углеводородные цепочки образуют гидрофобное пространство внутри бислоя; Б — пространственная ориентация ацильных цепей и головной группы фосфолипидов в бислой мембраны. Темные кружки — атомы кислорода, жирными линиями показан остов глицерола, тонкими линиями — этанолами, ломаными линиями обозначены цепочки двух жирных кислот

жидком матриксе, образуя иногда большие сложные комплексы. Многие периферические мембранные белки не простираются сквозь мембрану, а связаны специальными гидрофобными якорными областями с гидрофобной областью бислоя.

ЦПМ представляет собой осмотический барьер клетки, предотвращая свободный обмен веществами с окружающей средой. Если клетку поместить в среду с более высоким или более низким осмотическим давлением, чем внутри цитоплазмы, то произойдет выход воды из клетки или вход воды в нее, что отражает свойство воды уравнивать градиенты растворов. Цитоплазма при этом сжимается или расширяется (явление плазмолиза/деплазмолиза). Большинство бактерий, однако, не меняет свою форму в таких экспериментах вследствие наличия ригидной клеточной стенки.

ЦПМ является естественным барьером проницаемости и поэтому регулирует потоки питательных веществ и метаболитов. Наличие гидрофобного слоя, образованного мембранными липидами, препятствует прохождению через нее любых полярных молекул и макромолекул. Это свойство позволяет клеткам, существующим в большинстве случаев в разбавленных растворах, удерживать полезные макромолекулы и метаболитические предшественники.

Мембрана клетки призвана осуществлять и транспортную функцию, регулируя потоки питательных веществ внутрь клетки и продуктов метаболизма из клетки. Обычно бактерии имеют большое количество специфических транспортных систем. Транспорт — интегральная часть общей биоэнергетики клетки, которая создает и использует различные ионные градиенты через ЦПМ для переноса веществ и формирования других необходимых клетке градиентов.

Поскольку клетки бактерий чаще всего делятся с помощью бинарного деления, ЦПМ должна вовремя реагировать на процесс увеличения размеров клетки. Клеточное деление — тщательно регулируемый процесс, при котором мембрана родительской клетки впячивается с двух сторон (см. рис. 14), обычно посередине клетки, сливается и разделяется, образуя две дочерние клетки без потери внутреннего содержимого. Для переноса структурных компонентов клеточной поверхности и других секретируемых факторов мембрана содержит экспортную систему (рис. 21). Другие мембранные белковые комплексы регулируют процессы инициации репликации ДНК, разделения хромосом в делящихся бактериальных клетках и нарастания клеточной поверхности при росте и делении.

Ключевыми компонентами биологических мембран являются полярные липиды (см. рис. 20, Б), в основном фосфолипиды. У большинства бактерий в их состав входят две жирные кислоты обычно с 16—18 атомами углерода в цепочке и с насыщенными или одной ненасыщенной связями. Состав жирных кислот бактерий может варьировать в ответ на изменения окружающей среды, особенно температуры. При понижении температуры в составе фосфолипидов увеличивается количество ненасыщенных жирных кислот, что в значительной степени отражается на текучести мембраны при низких температурах. Некоторые жирные кислоты могут

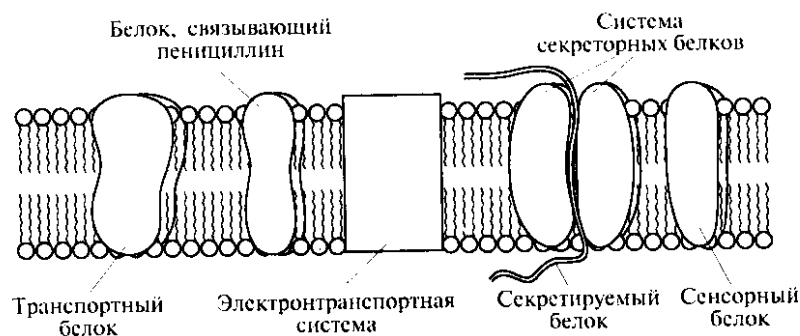


Рис. 21. Схема устройства цитоплазматической мембраны бактерий с различными мембранными белками

быть разветвленными или содержать циклопропановое кольцо. Жирные кислоты соединены сложной эфирной связью с двумя гидроксильными группами глицерола, а третья группа глицерола связана с остатком фосфата и через него — с головной группой фосфолипида. Головные группы фосфолипидов, например у *E. coli*, состоят из 75 % фосфатидилэтаноламина и 20 % фосфатидилглицерола, остальные — из кардиолипина (дифосфатидилглицерола), фосфатидилсерина и следовых количеств иных соединений. Другие бактерии имеют более сложные типы мембранных липидов, хотя они и проще устроены по сравнению с липидами плазматической мембраны животной клетки. Ряд бактерий содержит фосфатидилхолин, или лецитин, характерный для высших организмов. Некоторые клетки образуют гликолипиды, такие как моногалактозилдиглицерид. Мембранные липиды архей совершенно отличны от эукариотических и бактериальных. Их углеводородная часть состоит из высших изопrenoидных спиртов, прикрепленных к глицеролу простой, а не сложной эфирной связью (см. рис. 2).

Включения и запасные вещества. Прокариоты характеризуются сравнительно простой внутриклеточной организацией и не содержат автономных органелл, хотя многие бактерии имеют включения. Среди них в первую очередь следует отметить различного рода мембранные пузырьки, образованные в результате инвагинаций ЦПМ. Общей структурой, встречающейся как у грамположительных, так и у грамотрицательных организмов, является мезосома (см. рис. 14). Это инвагинация ЦПМ в форме везикул, трубочек или ламелл. Точные функции ее до настоящего времени неясны. Считается, что она может играть роль в делении клетки, образуя септу, а затем и поперечную перегородку, а также служить местом прикрепления микробной хромосомы, участвуя в репликации и последующем расхождении дочерних клеток. Мезосомы могут также принимать участие в процессах секреции. Однако некоторые исследователи считают, что мезосома — это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии.

Многие прокариоты имеют внутренние мембранные системы, совершенно отличные от мезосом. Развитая сеть внутрицитоплазматических мембран характерна только для фототрофных прокариот, нитрифицирующих и метанооксиляющих бактерий. Некоторые клетки образуют газовые вакуоли (аэросомы), окруженные белковой мембраной и выполняющие у водных организмов роль регуляторов плавучей плотности.

Многие микроорганизмы откладывают внутриклеточно *запасные вещества*, называемые также тельцами включения (полисахариды, поли-β-гидроксibuтират, полифосфаты, сера и др.). Все запасные вещества присутствуют в клетке в химически инертной форме. Такое состояние препятствует нарушению осмостаза кле-

точного содержимого. Некоторые из включений просто лежат в цитоплазме, другие окружены тонкой мембраной толщиной 2—4 нм. Мембрана обычно белковой природы, но иногда может содержать и липиды. Такими мембранами окружены гранулы *поли-β-гидроксibuтирата*, иногда гранулы *гликогена* и *серы*, а также *карбоксисомы*. Карбоксисомы у некоторых автотрофных микроорганизмов являются местами концентрирования рибулезобисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы (РубисКО) — ключевого фермента цикла Кальвина. Отдельные виды спорообразующих бактерий (например, *Bacillus thuringiensis*) могут содержать *параспоральные тельца* белковой природы, в которых откладываются токсины, смертельные для личинок некоторых насекомых. Многие бактерии откладывают гранулы *волютина* (полифосфатов), которые являются запасным резервуаром фосфата, важного предшественника в синтезе АТФ и ДНК. Гранулы волютина иногда называют также метакроматическими гранулами за их свойство изменять цвет красителя после окраски метиленовой синью. Элементарная сера содержится в клетках микроорганизмов, использующих соединения серы в своем метаболизме, в виде гранул, окруженных однослойной белковой мембраной. Специфическим запасным веществом цианобактерий является цианофицин, расходуемый организмом в условиях голодания по азоту. Таким образом, основной функцией большинства включений можно считать обеспечение клеток энергией и необходимыми элементами в неблагоприятных условиях.

Клеточная стенка. Большинство прокариот имеет ригидную клеточную стенку, под которой расположена ЦПМ. Состав и строение клеточной стенки — важный систематический признак, по которому все прокариоты подразделяются на следующие группы: грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки. Своеобразным строением и составом клеточной стенки характеризуются археи, которые не синтезируют пептидогликан, но некоторые из них образуют псевдомуреин.

Структура клеточных оболочек грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов схематически изображена на рис. 22. Грамположительные бактерии отличаются от грамотрицательных большим (до 40 раз) содержанием муреина (пептидогликана) в клеточной стенке и отсутствием внешней мембраны. Клеточная стенка — сложная многослойная структура (рис. 23, 24), которая выполняет в клетке множество функций. Эта высокоорганизованная клеточная органелла является механически стабилизированной и противостоит высокому осмотическому (тургорному) давлению, которое составляет от 2 до 25 атм. Бактерии обычно имеют ригидную клеточную стенку, основным опорным элементом которой является *муреин* (рис. 25, 26) — поперечносшитый биополимер, гетерополисахарид, формирующий замкнутый мешок, полностью покрывающий клетку снаружи. Муреиновый мешок не

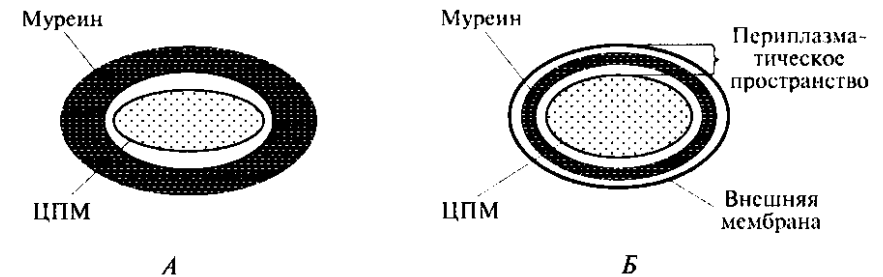


Рис. 22. Клеточные стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий

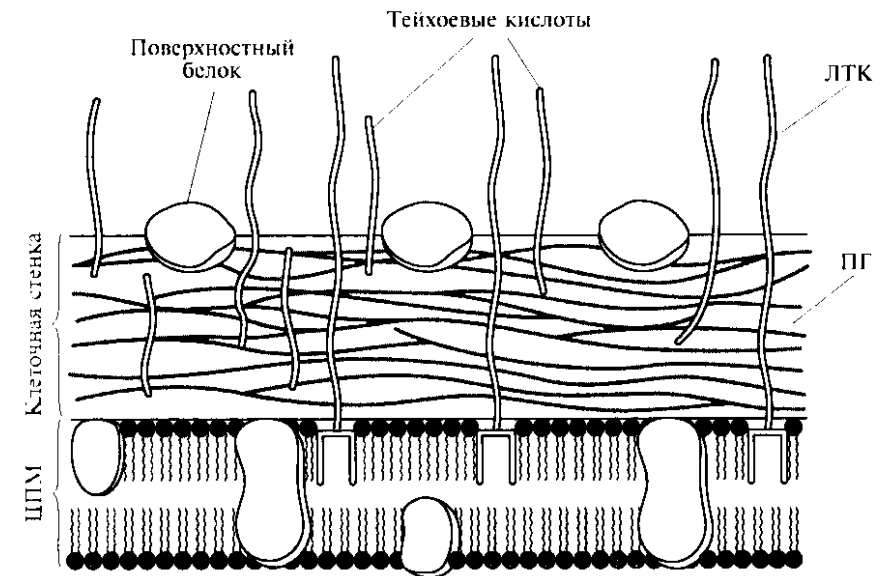


Рис. 23. Структура грамположительной клеточной стенки. Клеточная стенка содержит до 40 слоев пептидогликана. Молекулы тейхоевых кислот ковалентно связаны с пептидогликаном. Липотейхоевые кислоты — тейхоевые кислоты, содержащие липидные «хвостики», которые закреплены в гидрофобной области ЦПМ. Клеточные стенки могут иметь белковые слои на поверхности. Белковые структуры могут быть расположены островками, как показано на схеме, или быть тесно упакованными и образовывать S-слой (ЦПМ — цитоплазматическая мембрана; ПГ — пептидогликан; ЛТК — липотейхоевые кислоты)

только стабилизирует клеточную мембрану, но и сохраняет неизменной форму клетки. В основе химической структуры пептидогликана заложена периодическая последовательность двух аминокислот — N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой

кислоты (NAM), сшитых между собой β -1,4-гликозидными связями. Поперечные связи представлены пептидными мостиками. Интересно, что такая биологическая структура, как муреин, возникла в ходе эволюции дважды, так как некоторые археи содержат аналогичный по архитектуре биополимер, состоящий из других исходных материалов (*псевдомуреин*). Вследствие разницы в химической структуре и, следовательно, в составе ферментов путей биосинтеза образование псевдомуреина не подвержено действию таких типичных для подавления синтеза муреина антибиотиков, как D-циклосерин, ванкомицин или пенициллин.

Муреин достаточно эластичен и может под действием внешних факторов растягиваться и сжиматься до четырех раз. Пептидогли-

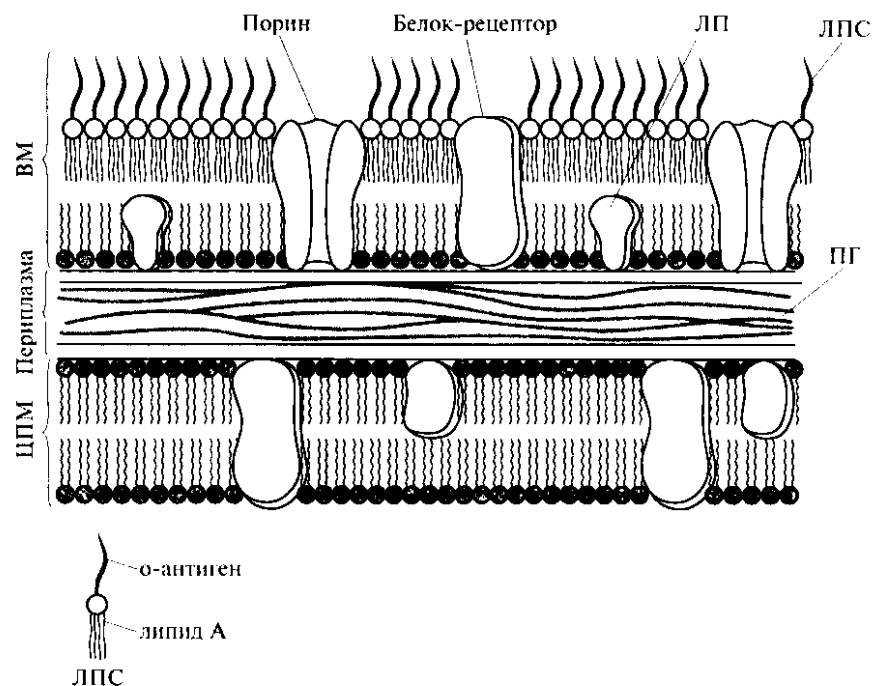


Рис. 24. Структура граммотрицательной клеточной стенки. Тонкий слой пептидогликана покрыт внешней мембраной (ВМ), которая прикреплена к пептидогликану липопротеидами. Между двумя мембранами расположено периплазматическое пространство (со слоем пептидогликана внутри него). Внешняя мембрана содержит фосфолипиды на внутренней поверхности и липополисахариды — на внешней. ЛПС состоит из липидной части, которая обращена внутрь внешней мембраны и формирует ее гидрофобную область, и полисахаридной части, которая обращена во внешнюю среду (ЛП — липопротеиды; ЛПС — липополисахариды)

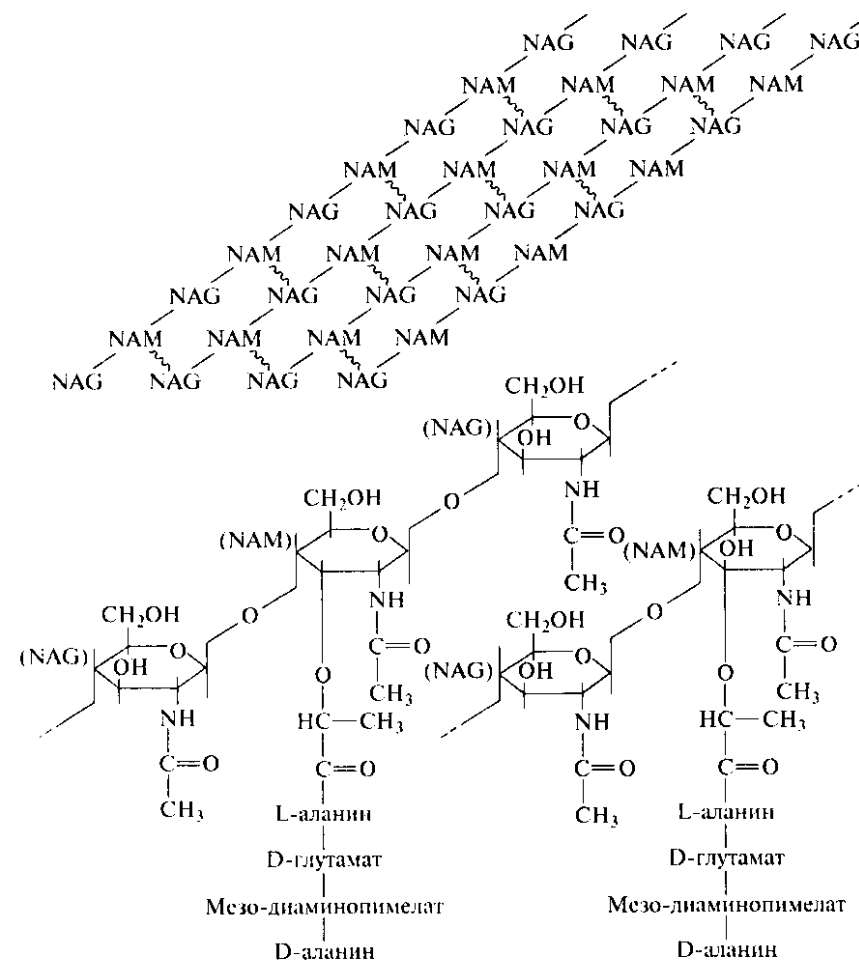


Рис. 25. Схема строения пептидогликана (муреина). (NAG — N-ацетилглюкозамин; NAM — N-ацетилмурамовая кислота)

кановый слой обладает селективностью по отношению к молекулам с большой молекулярной массой. Подсчитано, что наибольший размер отверстия в мешке может достигать $1-4 \times 4-5$ нм, что позволяет проникать молекулам сравнительно невысокой молекулярной массы (50—60 кДа), причем размер проникающих молекул не зависит от толщины пептидогликанового слоя (разного у грамположительных и граммотрицательных бактерий). Следовательно, макромолекулы с большими молекулярными массами не могут преодолеть барьер проницаемости муреина, поэтому для сборки внеклеточных структур (жгутики, пили) или для переноса ЦНК при конъюгации необходимо действие специфических гид-

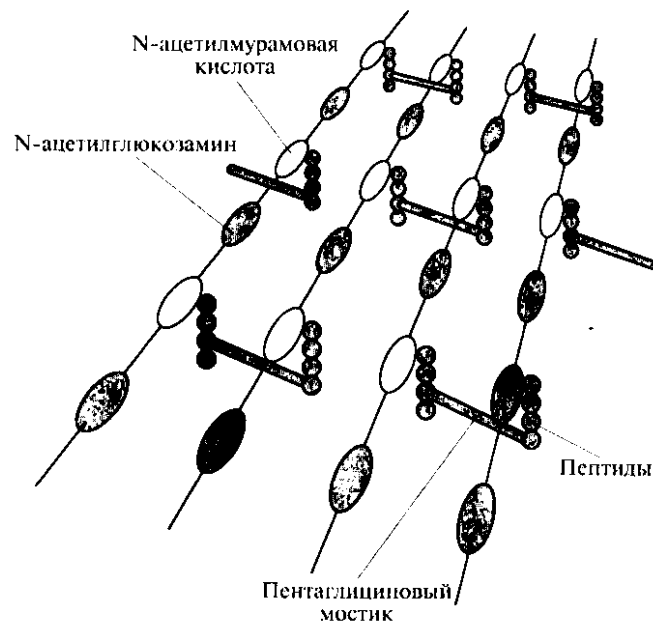


Рис. 26. Пространственная схема строения пептидогликана (муреина)

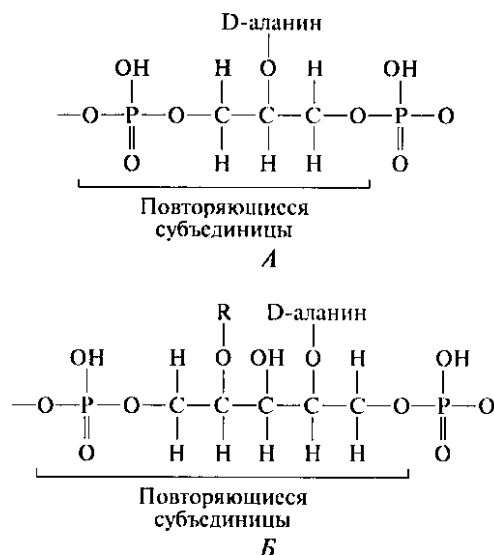


Рис. 27. Схема строения тейхоевых кислот:

А — тейхоевая кислота, основанная на глицероле; *Б* — тейхоевая кислота, основанная на рибитоле, в которой в качестве R-заместителя в разных видах может выступать глюкоза или сукцинат

ролаз муреина, которые локально расширяют отверстия для прохода больших молекул.

Пептидогликановый слой клетки прошит в поперечном направлении еще одним полимером — тейхоевыми кислотами (рис. 27), полиолфосфатами, образованными на основе глицерола или рибитола с большим количеством разнообразных заместителей (D-аланин, L-серин, глицин, глюкоза, N-ацетилглюкозамин). Через фосфорный диэфир тейхоевые кислоты связаны с C₆-атомом муравовой кислоты в муреине. Считают, что тейхоевые кислоты придают муреиновому мешку определенную степень свободы при растяжении и сжатии и действуют наподобие пружин. Тейхоевые кислоты благодаря своей анионной полиолфосфатной природе прочно связывают ионы Mg²⁺. Высказано предположение о том, что они могут выполнять в клетке роль своеобразного ионообменника. В условиях фосфорного голодания синтез тейхоевых кислот в клетке прекращается, они заменяются на тейхуроновые кислоты. В последнее время тейхоевые кислоты стали рассматривать в качестве таксономического маркера, особенно у грамположительных бактерий филума Actinobacteria. Оказалось, что в сочетании с определением последовательностей молекул 16S рРНК определение состава тейхоевых кислот клеточных стенок актиномицетов — незаменимый метод для дифференцировки на видовом уровне.

Типичные грамположительные микроорганизмы имеют толстый, многослойный муреиновый мешок (толщина 20—50 нм), содержащий до 40 слоев пептидогликана (см. рис. 23). Грамотрицательные бактерии обладают более сложной клеточной оболочкой, имеющей внешнюю мембрану (см. рис. 24). По сравнению с ЦПМ внешняя мембрана (ВМ) является сильно асимметричным липидным бислоем, в котором внутренний слой состоит из фосфолипидов, а внешний — из липополисахаридов. Между цитоплазматической и внешней мембранами возникает уникальное образование, называемое *периплазматическим пространством* (*периплазмой*). Муреиновый мешок таких бактерий встроен в периплазму и состоит всего лишь из одного слоя (толщина ~3 нм). ВМ и муреиновый слой соединены липопroteinом, который своим N-концом с замещенными жирными кислотами погружен во внешнюю мембрану, а его карбоксильный конец связан с муреином. ВМ содержит *белки-порины*, формирующие поры.

Наличие дополнительного барьера проницаемости в виде внешней мембраны приводит к тому, что для грамотрицательных бактерий необходимо применять более высокие минимальные концентрации действующих на них антибиотиков по сравнению с грамположительными бактериями. Помимо существенного препятствия на пути поглощения гидрофильных субстанций, наличие дополнительного барьера проницаемости позволяет уменьшить толщину муреинового слоя и дает возможность эффективно использовать цен-

ные продукты метаболизма муреина, которые накапливаются в периплазматическом пространстве клетки при ее росте. ВМ обеспечивает контакт клеток между собой, с поверхностью субстрата, а также с клетками организма-хозяина при патогенезе. Она удерживает ряд внешних структурных образований, например пили.

По сравнению с ЦПМ внешняя мембрана более инертна метаболически и содержит ограниченное число основных видов белка. Это вышеупомянутые порины, а также ряд белковых молекул, обеспечивающих обмен клетки с окружающей средой, сборку поверхностных структур, конъюгацию и секрецию белков.

ВМ содержит в качестве основного компонента липополисахариды (ЛПС), О-цепи которых являются антигенами (рис. 28). ЛПС образуют на поверхности клетки отрицательный заряд и часто являются токсичными. ЛПС внешней мембраны энтеробактерий, например, содержит три структурные части: 2-кето-3-дезоксиктулозонат-липид А (Kdo-липид А) — уникальный гликолипид, заякоривающий молекулу во внешней мембране; центральный олигосахаридный регион (подразделяемый на основную и внешнюю части); периферийные цепи О-антигенов, которые и ответственны, в основном, за иммунологические особенности интактного организма (рис. 29). Структура Kdo-липид А высоко консервативна среди грамотрицательных микроорганизмов. Центральная олигосахаридная область также до некоторой степени консервативна, а у представителей энтеробактерий — похожа, хотя и не идентична. О-антигены содержат длинные полисахариды, состоящие из повторяющихся олигосахаридных единиц. Характерные структуры могут содержать дезокси-, дидезокси- и аминсахара. Состав, структура и иммуноспецифичность широко варьирует внутри родов и между родами и составляет основу для серологическо-

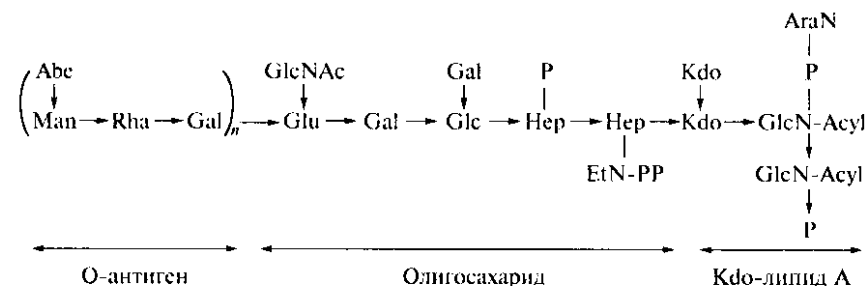


Рис. 28. Структура липополисахарида *Salmonella typhimurium*:

Abc — абектоза; AraN — 4-аминоарабиноза; EtN — этаноламин; Gal — галактоза; Glc — глюкоза; GlcN-Acyl — N,O-ди-3-гидроксимирисциноилглюкозамин и N,O-ди-3-гидрокс(3-О-лароил или миристиноил)глюкозамин; GlcNAc — N-ацетилглюкозамин; Hep — L-глицеро-D-манногептоза; Kdo — 2-кето-3-дезоксиктулозонат; Man — манноза; Rha — рамноза

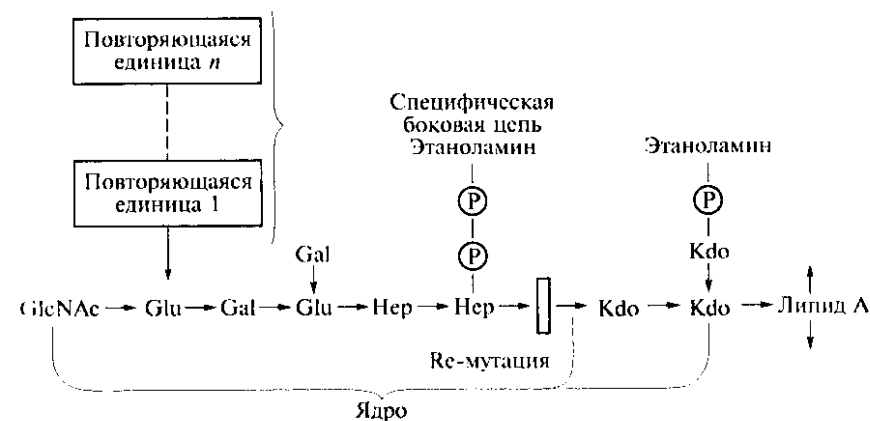


Рис. 29. Схема структуры ядра липополисахарида *Salmonella*. Hep, L-глицеро-D-манногептоза. Сахара прикреплены их редуцирующими концами к липиду А (1 → 4 и т.д.), поэтому структура не содержит редуцирующих групп. При биосинтезе ядра, справа налево, специфические ферменты добавляют следующую единицу

го типирования штаммов. Штаммы дикого типа с полным О-антигенным ЛПС формируют гладкие колонии, тогда как мутанты или диссоцианты, лишенные О-антигенов, образуют шероховатые колонии. В некоторых шероховатых мутантах О-антиген у энтеробактерий заменен на другой полисахарид, общий антиген энтеробактерий (ОАЭ), широко распространенный в этой группе микроорганизмов. ОАЭ является гетерополисахаридом, состоящим из N,O-диацетилглюкозамина, N-ацетиламиноманнуриновой кислоты и N-ацетилфруктозамина, он консервативен среди энтеробактерий. ОАЭ может существовать в двух формах — первая прикреплена к наружному слою внешней мембраны редуцирующим концом через остаток фосфатидила и присутствует постоянно, вторая замещает О-цепи ЛПС у мутантных штаммов.

Наряду с ЛПС внешняя мембрана содержит обычные фосфолипиды, состав которых почти неизменен и включает до 90 % фосфатидилэтаноламина.

Следствием существенных различий структуры клеточной оболочки у грамположительных и грамотрицательных бактерий является получение разных образований под действием агентов, нарушающих синтез пептидогликана. Например, под действием пенициллина из грамположительных клеток образуется протопласт, не несущий оболочки, а из грамотрицательных — сферопласт, имеющий остатки оболочки на поверхности клетки. Клетки, потерявшие клеточную стенку в результате мутации или разрушающего воздействия, называются также L-формами и могут существовать только в изотонических растворах.

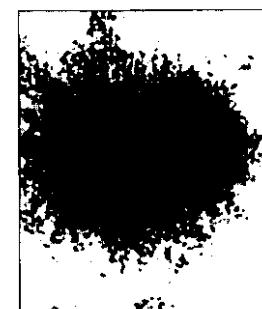
Пили. У многих бактерий находят ворсинки (фимбрии, пили, рис. 30). *Пили* — нитеобразные полимерные органеллы белковой природы, локализованные на поверхности клеток (рис. 31). Их вначале (1955 г.) называли *фимбриями* (мн. ч. от лат. «нити»), затем (в 1965 г.) появился термин «пилус» (ед. ч. от лат. «волос») для описания фибриллярной структуры, возникающей при конъюгации клеток *E. coli* (F-pilus) (рис. 32). С тех пор термином «пили» обозначают все типы нежгутиковых образований на поверхности клетки, синонимом этого слова является термин «фимбрии». Размер пилей варьирует от долей микрометров до более 20 мкм в длину и от 2 до 11 нм в диаметре. Пили состоят из одного или нескольких типов белковых субъединиц, называемых *пилины* или *фимбрины*, которые обычно организованы в спиральные структуры. Архитектура пилей варьирует от тонких нитевидных до толстых прочных палочкообразных образований с осевыми отверстиями. Тонкие пили, диаметр которых не превышает 2—3 нм (например, K88 и K99), часто относят к *фибриллам*. Еще более тонкие пили (диаметром менее 2 нм), называемые «кудряшками», имеют тенденцию сваливаться в пушистую липкую массу на поверхности бактерий и ответственны за агрегацию клеток. Электронная микроскопия высокого разрешения показала, что пили типа I, P и S у *E. coli* и *Haemophilus influenzae* представляют собой сложные структуры, состоящие из толстой палочки с прикрепленной к ней тонкой фибриллой. Пили часто расположены перитрихально по поверх-



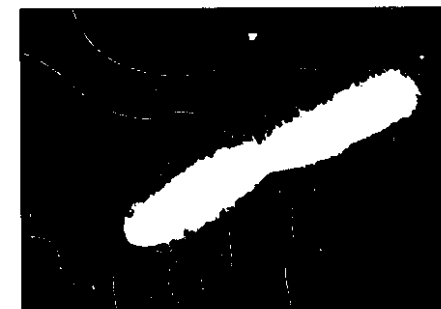
Рис. 30. Электронная микрофотография (напыление платиной) клетки штамма *E. coli*, образующего пили, выращенной в жидкой среде без аэрации. Каждая клетка несет сотни пилей (диаметром 7 нм), и их наличие способствует агрегации клеток. Видны также отломившиеся пили. Несколько жгутиков, гораздо большей длины и толщины (диаметр 14 нм), простираются от поверхности клетки за пределы фотографии. Ширина клетки около 1 мкм



A



Б



В



Г

Рис. 31. Фотомонтаж клеток с разными пилиями:

А — Р-пили *E. coli* (толщина 2 нм) — прототип структур, сборка которых происходит с помощью белков-шаперонов и швейцаров. Справа представлена типичная негативно окрашенная клетка *E. coli*, образующая Р-пили; Б — CS2-пили *E. coli* (толщина 2 нм), собираемые с помощью альтернативного белка-шаперона; В — полярные пили энтеропатогенного штамма *E. coli* типа 4В, образующие узлы; Г — сканирующая электронная микрофотография клеток энтеропатогенного штамма *E. coli*, образующих связки пилей толщиной около 50 нм. Отдельные пили толщиной 6—8 нм при таком разрешении фотоснимка не просматриваются

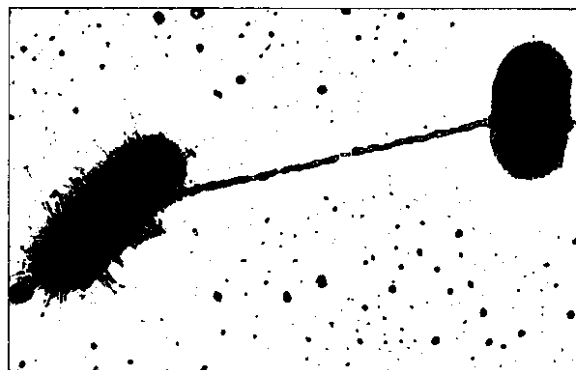


Рис. 32. «Мужская» клетка *E. coli* (слева) с большим количеством обычных (соматических) пилей и одной конъюгативной пилей, посредством которой она связана с «женской» клеткой, лишенной плазмид, кодирующих синтез полового фактора F. На данном препарате конъюгативная пилия искусственно помечена специфическим бактериофагом

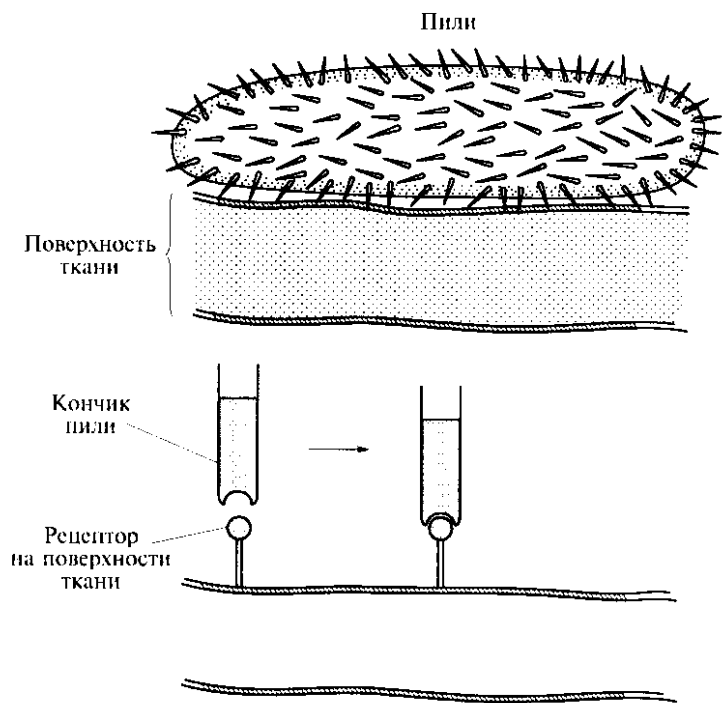
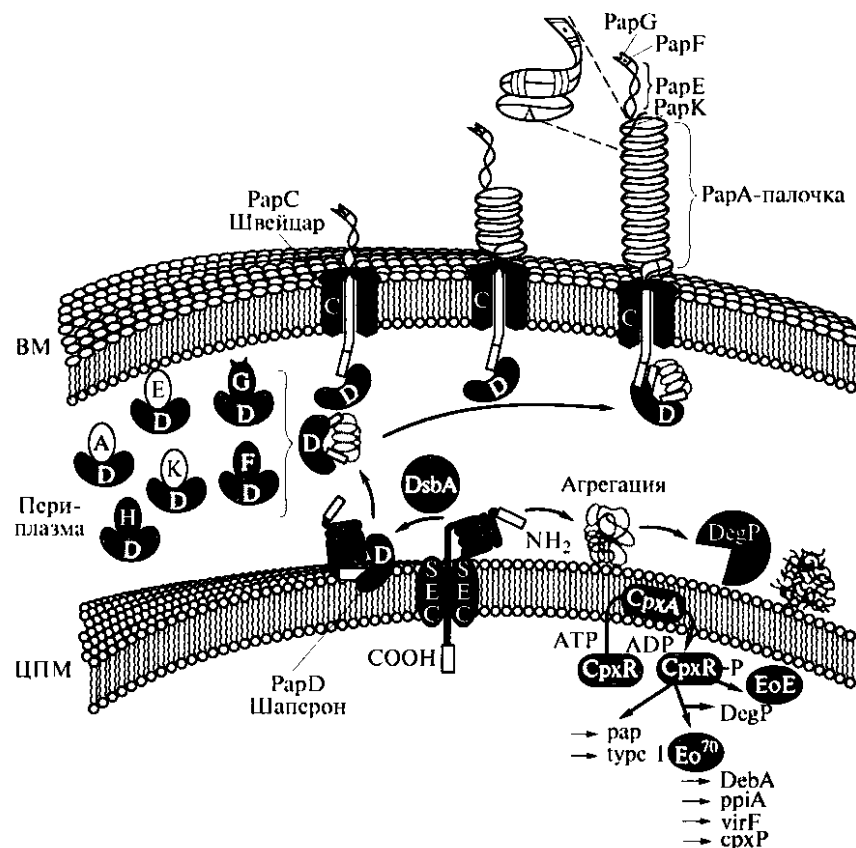


Рис. 33. Связывание бактериальной клетки с поверхностью тканей хозяина с помощью пилей

ности клеток, однако пили 4-го типа могут быть локализованы только на одном конце клетки.

Пили граммотрицательных бактерий изучены достаточно подробно, известно также о существовании пилей у грамположительных организмов. Многочисленные типы пилей у бактерий отвечают за адаптацию организмов, их выживаемость и распространены не только у патогенных, но и у сапротрофных видов. Пили выступают как акцепторы бактериофагов, помогают клеткам принимать и передавать ДНК при конъюгации и, по крайней мере для пилей 4-го типа, принимать участие в движении клетки. Основное же предназначение пилей — поддерживать специфические прикрепительные структуры клетки. Прикрепительные субъединицы пилей (*адгезины*) часто в качестве минорных компонентов присутствуют на концах пилей, однако основная структура пилей также может выступать в роли адгезина. Адгезины являются посредниками при бактериальных контактах, при контактах с неживыми объектами, тканями и клетками в восприимчивых организмах. Колонизация тканей хозяина бактериальными патогенами обычно зависит от стереохимического подобия между архитектурой адгезина и соответствующего рецептора клетки хозяина (рис. 33). Взаимоотношения, медируемые адгезивными пиллями, могут помогать формированию бактериальных сообществ, таких, как биопленки, и часто являются основным фактором успешной колонизации организма-хозяина патогенными и сапротрофными микроорганизмами.

Экспрессия пилей вносит существенный вклад в колонизацию и персистенцию патогенных микроорганизмов в организме хозяина. У многих бактериальных инфекционных агентов ключевую роль в колонизации тканей хозяина играют адгезивные пили. Например уропатогенные *E. coli* для эффективного заселения эпителия мочевого пузыря должны иметь пили 1-го типа. Эти пили прикрепляются к консервативным рецепторам клеток эпителия мочевого пузыря, содержащим маннозу, и предотвращают вымывание бактерий с мочой. Р-пили осуществляют ту же функцию в почках, препятствуя удалению пиелонефритных *E. coli* из почек и мочевыводящих каналов. Кишечные патогены образуют многочисленные и разнообразные адгезивные пили, которые помогают бактериям колонизировать кишечник. К этой группе принадлежат пили K88, K99897P, длинные полярные фимбрии, плазмидные пили *Salmonella enterica* и агрегирующие фимбрии энтеропатогенных *E. coli*. TCP-пили ответственны за прикрепление *V. cholerae* к эпителию тонкого кишечника. Эти же пили действуют как рецепторы для фага холерного токсина (СТХФ), лизогенного фага, копирующего две субъединицы холерного токсина. Этот фаг переносится между клетками холерного вибриона через взаимодействие с TCP в тонком кишечнике. Другие пили также помогают в приобретении факторов вирулентности. Поглощение ДНК проис-



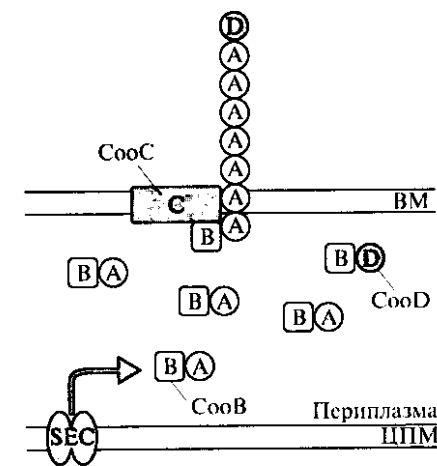
ходит с помощью пилей 4-го типа, а перенос ДНК осуществляется при посредстве конъюгативных пилей (см. рис. 32), которые помогают патогенному организму приобрести гены, позволяющие синтезировать широкий спектр факторов вирулентности и придающие им устойчивость ко многим антибиотикам. Образование биопленок, требующее во многих случаях участия пилей 1-го и 4-го типов или «кудряшек», также предохраняет патогены от действия лекарственных препаратов и может способствовать колонизации тканей и медицинских имплантантов.

При инфекционном процессе прикрепительные пили часто располагаются в промежутке между клетками хозяина и патогена, где они могут участвовать в «разговоре» между двумя организмами. Имеется ряд примеров, когда прикрепление пилей вызывало появление сигналов в клетках хозяина. Прикрепление пилей типа 4A *Neisseria* к рецепторам хозяина на эпителиальных клетках вызывает высвобождение запасенного внутриклеточного Ca^{2+} , известного как сигнал, регулирующий ответы эукариотических клеток.

Рис. 34. Схематическое изображение сборки пилей на поверхности бактериальной клетки с помощью механизма шаперона-швейцара. Структурные субъединицы кончика (PapG, PapE, PapF и PapK) и палочки стержня (PapA) пили переносятся через ЦПМ *E. coli* посредством SEC-системы переноса. На периплазматической стороне ЦПМ субъединицы контактируют с шапероном PapD, который помогает субъединицам в складывании и высвобождении с внешней стороны ЦПМ. Белок DsbA необходим для правильного складывания как субъединиц, так и самого шаперона PapD. В отсутствие шаперона субъединицы агрегируют и расщепляются периплазматической протеазой DegP. Накопление не связавшихся с шапероном субъединиц и их агрегация ведут к активации Cpx-системы, приводящей к увеличению синтеза периплазматических систем деградации белков (DegP-протеазы). Комплекс субъединица-шаперон (PapD) связывается с белком-швейцаром внешней мембраны (PapC), после чего шаперон отщепляется, а полипептид субъединицы в линейной форме транспортируется через поры внешней мембраны шириной 2 нм, которые образует швейцар внешней мембраны, расположенный трансмембранно. Проходя через такие поры, субъединицы будущих пилей вновь сворачиваются в правозакрученную спираль на внешней стороне мембраны, образуя толстую палочку из связанных друг с другом субъединиц, которая уже не может соскользнуть назад, в пору швейцара. Образование скрученной палочки пили PapE помогает ее дальнейшему нарастанию

Присоединение Р-пили к уроэпителиальным клеткам может вызвать выход из них керамидов, важных вторичных мессенджеров, способных активировать целый ряд протеинкиназ и фосфатаз, вовлеченных в процесс передачи сигнала. Эти сигналы приводят в конце концов к выделению клетками цитокинов. Пили могут также передавать сигнал внутрь клетки хозяина. В 1996 г. показано, что прикрепление Р-пили к рецепторам клосток хозяина стимулирует активацию железомобилизующих механизмов у уропатогенных *E. coli*. Это, вероятно, увеличивает возможности получе-

Рис. 35. Формирование CS1-пили *E. coli* по альтернативному шапероновому пути. Шаперон CooB образует периплазматические комплексы с основными компонентами пилей CooA и CooD. Он помогает также стабилизации белка внешней мембраны CooC, который действует как канал для передачи наружу белковой фибриллы, образующей пиллю (ВМ — внешняя мембрана)



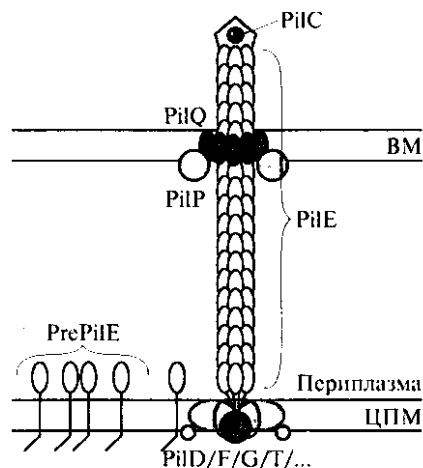


Рис. 36. Схема образования пили типа 4 у *N. gonorrhoeae*. Белок-препилин PrePilE переносится в периплазматическое пространство с помощью SEC-механизма переноса. Затем PrePilE подвергается процессингу с помощью пептидазы PilD, отщепляющей положительно заряженный сигнальный пептид с N-конца субъединицы пили. Сборочный комплекс PilE ЦПМ затем осуществляет встраивание зрелой субъединицы PilE в линейную фибриллу. Белок PilQ помогает передвижению пили через внешнюю мембрану, возможно с помощью таких факторов, как PilP. Адгезин PilC, находящийся на лидирующем конце растущей пили, также, по-видимому, требуется для транслокации пили через внешнюю мембрану

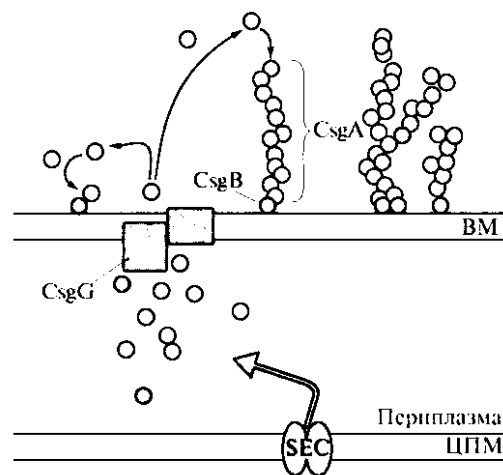


Рис. 37. Модель формирования «пилей-кудряшек» по пути внеклеточной нуклеации-осаждения. Основной компонент «пили-кудряшки» *E. coli*, CsgA, переносится в периплазму с помощью секреторного SEC-механизма, расположенного в ЦПМ, и далее во внешнюю среду через внешнюю мембрану с помощью расположенного в ней липопротеина CsgG. Расположенный на поверхности внешней мембраны белок CsgB помогает субъединицам локализоваться в ядро растущей пили. Белки CsgB располагаются по всей длине растущей пили, где они инициируют ветвление «пилей-кудряшек». Основную функцию по переносу субъединиц CsgA и CsgB несет белок-переносчик CsgG, хотя его функции изучены не полностью

ния железа и выживания клеток патогена в дефицитном по железу окружении мочевой системы.

Таким образом, изучение функционирования пилей позволит не только глубже понять механизмы колонизации и передачи сигналов, но и вести разработку новых поколений антимикробных агентов для борьбы с патогенными микроорганизмами.

Для сборки пилей на поверхности клетки все пилины должны быть перенесены через внутреннюю мембрану, периплазму и внешнюю мембрану (рис. 34—37). Для этого процесса у всех бактерий задействовано два специализированных сборочных белка — периплазматический шаперон и швейцар внешней мембраны. Ансамбль шаперона и швейцара вовлечен в биогенез более чем 30 различных структур, включая сложные пили, тонкие фибриллы и нефибриллярные адгезины.

Жгутики. Часто подвижность микроорганизмов обусловлена наличием жгутиков. У прокариот характер жгутикования является диагностическим признаком (рис. 38, 39). Жгутики у них построе-

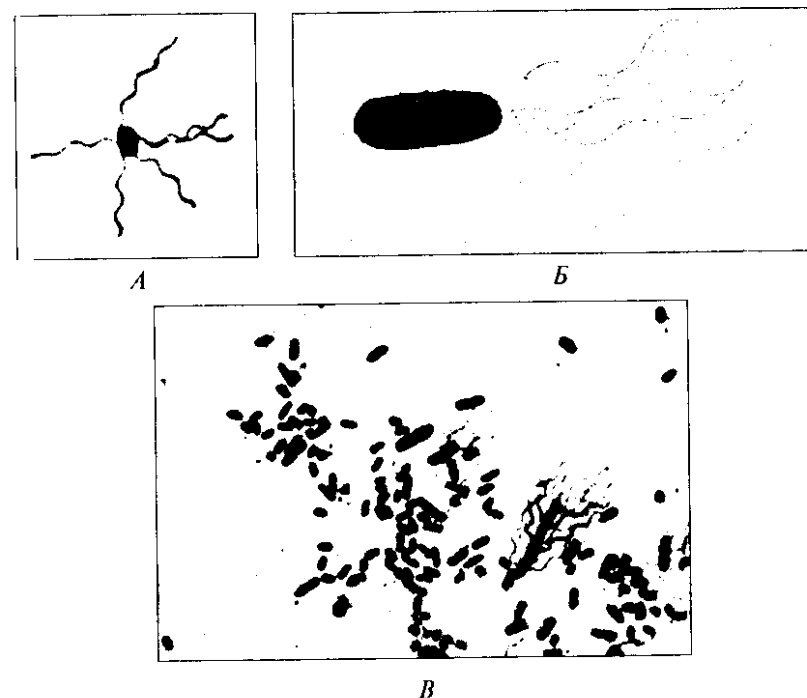


Рис. 38. Жгутики, формирующиеся у разных бактерий:

А — окраска жгутиков бактерий специальным способом (танниновая кислота/щелочной фуксин в модификации Лейфсона); Б — электронная микрофотография жгутиков бактерий (напыление платиной); В — подвижные клетки *Proteus mirabilis* в стадии «роения» с многочисленными перитрихальными жгутиками

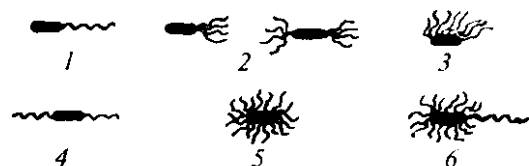


Рис. 39. Типы жгутикования у бактерий:

1 — монотрихальное; 2 — лофотрихальное; 3 — латеральное; 4 — амфитрихальное; 5 — перитрихальное; 6 — «смешанное» полярно-перитрихальное

ны иначе (рис. 40), чем типичные жгутики эукариот, имеющие формулу $(9 + 2)$. У бактерий жгутики правовращающие, у архей — левовращающие.

Жгутик (рис. 41) состоит из базального тела, включающего четыре (у грамотрицательных) или два (у грамположительных бактерий) кольца, стержень и моторные белки, а также из крючка и филамента. Базальное тело закреплено в ЦПМ двумя кольцами М и S, которые часто рассматривают как одно целое. MS-кольцо окружено несколькими белками, которые называют моторными и от которых вращающий момент передается на филament. В пептидогликановом слое периплазмы у грамотрицательных бактерий находится кольцо Р, а во внешней мембране — кольцо L. Оба эти кольца выполняют роль втулки, дополнительно удерживающей механизм жгутика. Все кольца пронизаны жестким стержнем, который передает крутящий момент. На наружной стороне ВМ механизм жгутика имеет крючок, переходящий затем в филament, который заканчивается «шапочкой». Филament пред-

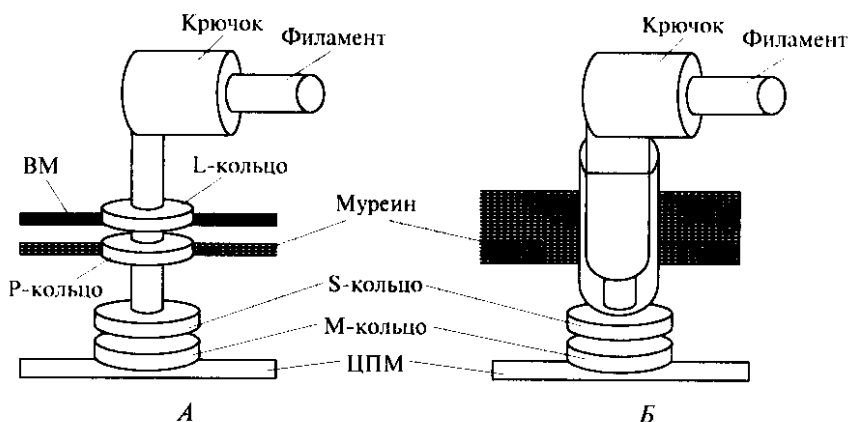


Рис. 40. Строение жгутика грамотрицательных (А) и грамположительных (Б) бактерий

ставляет собой ригидный цилиндр, состоящий из простого белка флагеллина.

Синтез жгутика (рис. 42) начинается с появления MS-кольца в ЦПМ, с последующим прикреплением к нему моторных белков.

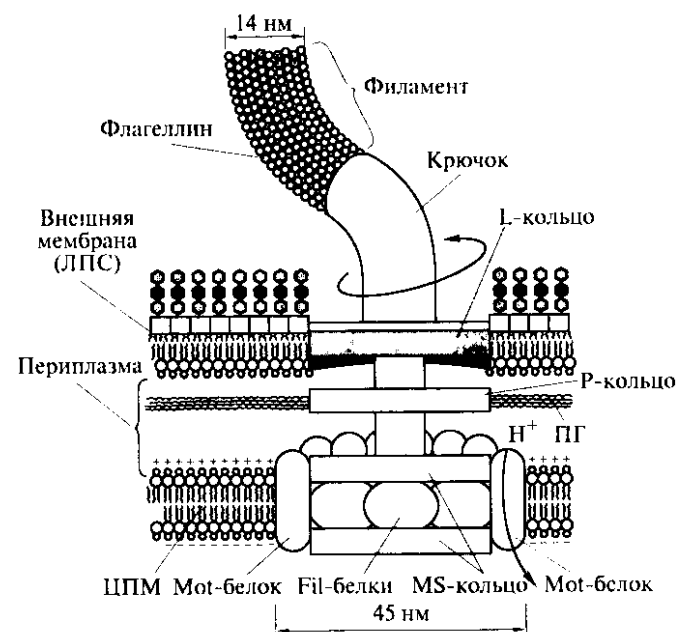


Рис. 41. Схема структуры жгутика прокариот на примере грамотрицательных бактерий. Молекулы флагеллина переносятся к месту удлинения филамента через узкий канал внутри него. Mot-белки действуют как «мотор» жгутика, вращая жесткий стержень жгутика, который передает крутящий момент на внешнюю часть жгутика через крючок, двигая клетку во внешней среде, тогда как Fil-белки выполняют роль «выключателя двигателя»

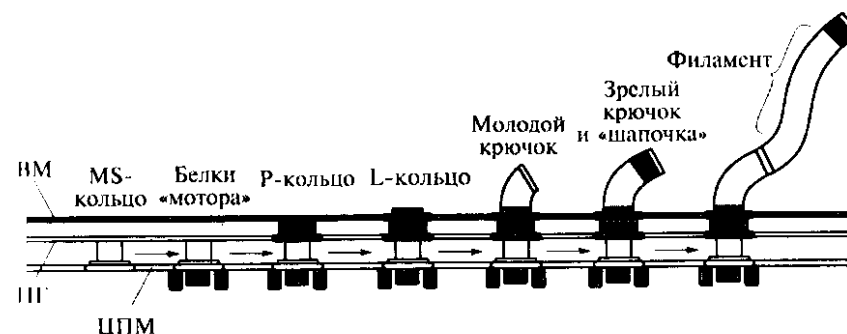


Рис. 42. Последовательность событий при биосинтезе жгутиков

Р- и L-кольца (у грамотрицательных бактерий), крючка и «шапочки», которая прикрывает полый цилиндр начавшего строиться филамента с верхнего конца. Если бы этой структуры не существовало, то синтезируемые на рибосоме субъединицы белка-флагеллина, подающиеся к вершине филамента через полое внутреннее пространство базального тела и самоорганизующиеся по спирали, пропадали бы в окружающей среде. Таким образом, при синтезе и удлинении филамента белки «шапочки», действуя наподобие своеобразных шаперонов, помогают собираться флагел-

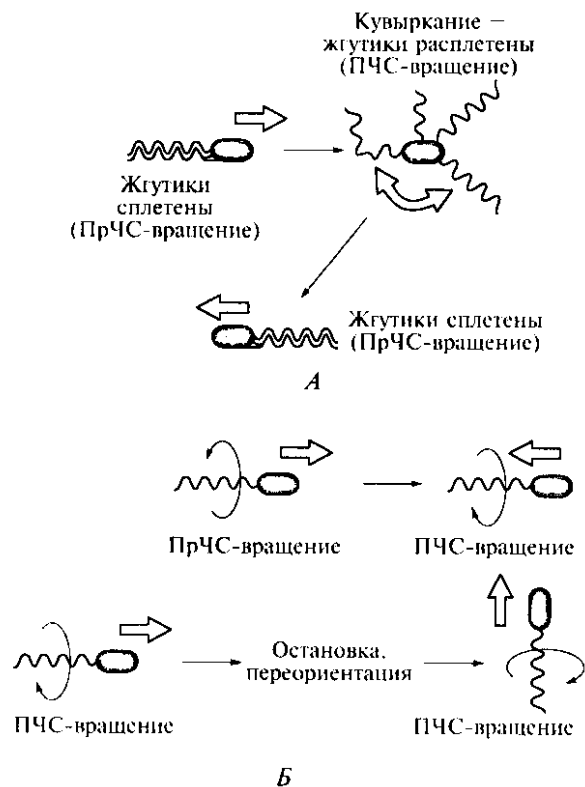


Рис. 43. Способы движения клеток с полярным и перитрихальным жгутикованием:

А — перитрихи: движение вперед осуществляется координированным вращением пучка жгутиков против часовой стрелки (ПрЧС). Вращение отдельных жгутиков по часовой стрелке (ПЧС) вызывает «дрожание» или «кувыркание» бактерии, а новое координированное движение пучка жгутиков (ПрЧС) заставляет клетку двигаться в другом направлении; *Б* — полярное жгутикование: клетки изменяют направление движения сменой направления вращения жгутика (ПрЧС — клетка движется вперед, толкаемая жгутиком; ПЧС — клетка движется, увлекаемая жгутиком). Стрелками показано направление движения клеток

лину в равномерно растущую структуру. Для сборки одного филамента необходимо около 20 тыс. молекул флагеллина. Синтез жгутика кодируется более чем 30 генами, при этом неизвестно, каким образом определяется точное местоположение закладки жгутика.

Движение клетки осуществляется (рис. 43) путем вращения жгутика по или против часовой стрелки (у монотрихов), одновременно сама клетка медленно вращается в обратную сторону. При вращении жгутика по часовой стрелке клетка тянется за жгутиком (жгутик — вперед). При вращении жгутика против часовой стрелки клетка выпалкивается жгутиком вперед (жгутик — сзади). Некоторые монотрихи вращают жгутик только по часовой стрелке, и для смены направления им надо остановиться и пересориентироваться. Перитрихи вращают жгутики (пучок жгутиков) против часовой стрелки (жгутики остаются сзади клетки по направлению движения). Если надо поменять направление движения, то клетка останавливается и совершает кувырок.

Тонкий механизм вращения прокариотического жгутика неясен. Есть несколько гипотез, где важную роль играют кольца S и M базального тела, плазматическая мембрана, а также центральный стержень. Выяснено только, что к вращению приводит поток протонов через оба кольца или между базальным телом и близлежащим участком цитоплазматической мембраны.

Капсулы. На поверхности клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы разной толщины (рис. 44). Они чаще всего полисахаридной, но бывают и гликопротеидной и полипептидной природы. Поэтому поверхность колоний клеток с капсулами выглядит гладкой, влажной и блестящей. Основная роль капсул для патогенных видов — предохранение клетки от одного из самых эффективных средств защиты макроорганизма, фагоцитирующих клеток. Фагоциты постоянно контролируют кровь и ткани на наличие бактерий. При столкновении с бактерией они пытаются поглотить и растворить ее. Некоторые бактерии, однако, подобно *Neisseria*

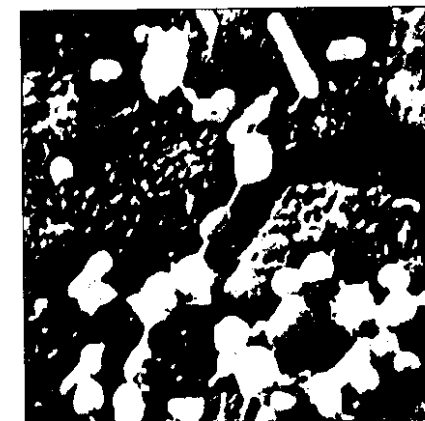


Рис. 44. Сканирующая электронная микрофотография кокков, погруженных в полисахаридный матрикс, который превращается в фибриллы при высушивании. Образец взят с поверхности катетера, введенного в брюшную полость

meningitidis, используют свойственную им способность к образованию капсул, чтобы предотвратить узнавание и поглощение фагоцитами, преодолевая таким образом иммунный барьер человеческого организма.

От капсулы (диффузного полисахаридного слоя, часто значительной величины) следует отличать *гликокаликс* — сеть тяжелой полисахаридов, помогающих клеткам прикрепляться к твердым субстратам и формировать биопленки на поверхности неподвижных предметов в водных средах или на поверхностях растительных или животных тканей хозяев.

S-слои. У некоторых прокариот обнаружены регулярно структурированные *S-слои* (от англ. surface — поверхность), выстилающие наружную поверхность клеточной оболочки равномерно упакованными белковыми образованиями правильной формы (рис. 45). *S-слои* обычны среди архей, у которых они могут быть единственным слоем клеточной стенки поверх ЦПМ. *S-слои* имеют упаковку и расположение, подобные паркетным досочкам, плотно покрывающим клетку и состоящим из белков или гликопротеинов. У грамотрицательных бактерий *S-слои* прилегают непосредственно к внешней мембране, у грамположительных — ассоциированы с поверхностью пептидогликана. *S-слои* защищают клетку от флуктуаций pH и резких изменений концентраций каких-либо ионов, осмотического стресса, от действия ферментов или бактерий-хищников вроде *Bdellovibrio*. *S-слои* помогают удерживать форму клетки, по крайней мере, у некоторых видов, а также способствуют адгезии клеток к поверхностям. Для патогенных микроорганизмов установлено, что *S-слои* помогают им справиться с атакой комп-

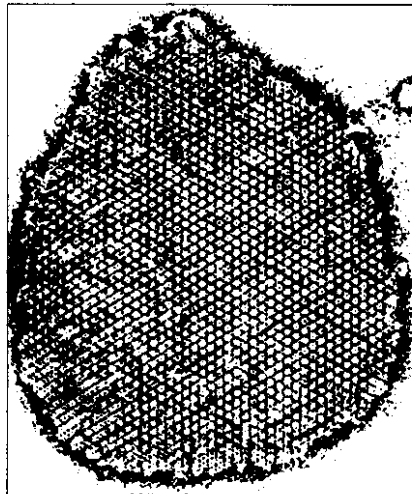


Рис. 45. Правильный слой белковых гексагональных структур на внешней стороне клеточной стенки спирохет. Подобные *S-слои* найдены и у многих грамположительных бактерий, однако они легко теряют регулярную структуру при приготовлении препаратов (негативное контрастирование, увел. 200 000 $\times$)

лемента и избежать фагоцитоза, что повышает вирулентность клеток отдельных болезнетворных бактерий.

Покоящиеся формы прокариот. Целый ряд грамположительных бактерий образует устойчивые к внешним воздействиям покоящиеся структуры, называемые *эндоспорами* (от лат. spora — семя, носев). Эндоспоры (рис. 46) формируются внутри вегетативных клеток бактерий, принадлежащих к родам *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Thermoactinomyces*. Все эти микроорганизмы образуют толстую клеточную стенку грамположительного типа, что, по-видимому, является необходимым для спорообразования. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к таким факторам, как нагревание, УФ-облучение, действие химических дезинфектантов, растворителей и к высушиванию. В природе образование спор помогает клеткам избегать гибели при истощении субстрата или высушивании, воздействии радиации или химических веществ. Обычно спора в клетке закладывается одна, однако известны случаи формирования до пяти спор в одной бактериальной клетке.

Некоторые эндоспоры остаются жизнеспособными в течение 500 лет (например, споры бацилл сибирской язвы в скотомогильниках), споры актиномицетов — до 7 500 лет, но совершенно уникальным является случай прорастания спор *Bacillus cereus*, обнаруженных в кишечнике пчелы, найденной в кусочке янтаря, насчитывающего 25—30 млн лет! Вследствие высокой резистентности, а также факта, что многие спорообразующие бактерии являются опасными патогенами, борьба со спорами играет важную роль в пищевой, медицинской и промышленной микробиологии. Некоторые споры выдерживают кипячение в течение 1 ч и

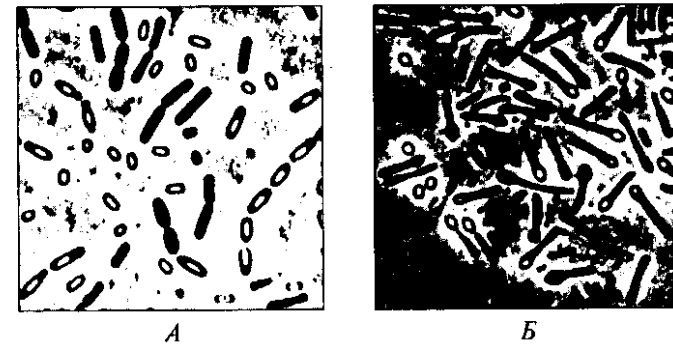


Рис. 46. Споры, обнаруживаемые в световой микроскоп:

А — *B. cereus*: удлиненные субтерминальные споры, окраска нигрозином; Б — *Clostridium pectinovorum*: большие терминальные споры внутри спорангия и отдельные споры без спорангия, окраска йодом на гранулезу (3 600 $\times$)

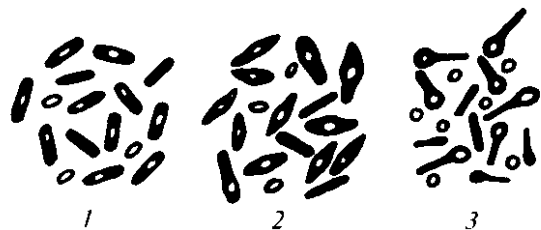


Рис. 47. Типы спорообразования у бактерий:

1 — бациллярный; 2 — клостридиальный; 3 — плектридиальный

более, поэтому для стерилизации растворов и инструмента применяют автоклавы с температурами стерилизации до 121 °С. Помимо борьбы со спорами в практическом смысле, споры привлекают внимание и с точки зрения фундаментальных проблем биологии как простая одноклеточная модель клеточной дифференциации.

Эндоспоры хорошо просматриваются в клетках с помощью светового или электронного микроскопа. Поскольку споры практически непроницаемы для многих видов красителей, они наблюдаются как неокрашенные тельца на фоне прокрашенного остального содержимого клетки. Есть, однако, специальные методы дифференциальной окраски спор, позволяющие отчетливо различить в световой микроскоп окрашенную в синий цвет спору на фоне окрашенной в розовый цвет цитоплазмы. В разных типах материнских клеток (или спорангиях) споры могут залегать по-разному. Тип спорообразования (бациллярный, клостридиальный или плектридиальный) часто помогает в идентификации неизвестной культуры (рис. 47). Иногда образовавшаяся спора столь велика, что расширяет спорангий в середине или с одного конца. В активно спорулирующей культуре почти все клетки образуют споры.

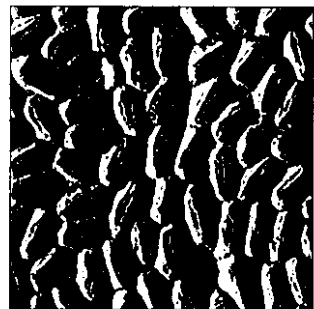


Рис. 48. Характерные особенности поверхности спор *B. cereus*

Электронно-микроскопические исследования спор показали, что их структура довольно сложна. Споры большинства клеток гладкие и овоидные, хотя встречаются и круглые, а также с характерными поверхностями (рис. 48). Спора окружена (рис. 49, 50) тонким *экзоспориумом*, за ним (по направлению к центру споры) лежит *оболочка споры*, состоящая из нескольких белковых слоев и имеющая, как правило, значительную толщину. Оболочка практически не проницаема для химических веществ, вследствие чего спора обладает существенной

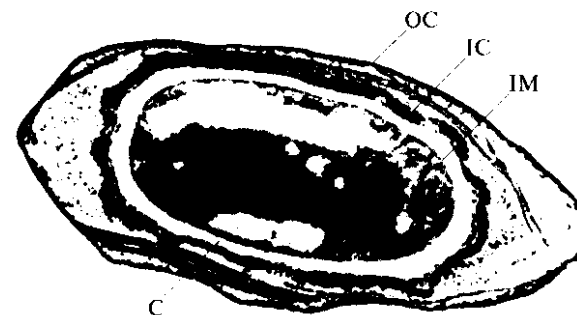


Рис. 49. Электронная микрофотография тонкого среза споры *B. megaterium*. Ядро споры окружено последовательно: внутренней мембраной (ИМ), кортексом (С), внутренней (IC) и внешней (OC) оболочками. При других методах фиксации кортекс выглядит более электронно-плотным и кажется слоистым (11 200 $\times$)

устойчивостью к дезинфектантам. У *Clostridium perfringens* энтеротоксин образуется только при спорообразовании, серологически он близок белкам оболочки споры. За оболочкой располагается *кортекс*, который может занимать до половины объема споры. Кортекс состоит из пептидогликана, менее поперечносшитого, чем пептидогликан вегетативной клетки.

Клеточная стенка споры (или *стенка ядра споры*) расположена внутри кортекса и окружает протопласт (или *ядро споры*). Ядро споры содержит нормальные клеточные структуры, такие как нуклеонд и рибосомы.

Ядро споры несет в себе все необходимое для начала роста, упакованное в стабильной форме. В то же время ядро лишено компонентов вегетативной клетки, которые либо нестойки, либо могут быть легко восполнены при начале прорастания споры (табл. 3).

Ядро споры включает хромосому и небольшие количества каждого компонента белоксинтезирующего механизма: рибосомы, rРНК, ферменты и сопутствующие белки. Два нестабильных компонента клеток — иРНК и нуклеотидтрифосфаты — отсутствуют, однако есть запас более стабильных предшественников АТФ — АДФ и АМФ. Аминокислоты и ферменты их биосинтеза практически отсутствуют, но при прорастании споры они легко воспол-

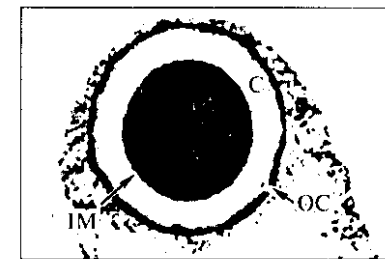


Рис. 50. Зрелая спора *B. megaterium* (через 10,5 ч после начала споруляции). Обозначения см. на рис. 49 (шкала — 0,5 мкм)

Таблица 3

Уровень метаболитов в зрелых спорах и растущих клетках *Bacillus megaterium*

Компонент	Количество, мкмоль/г	
	Споры	Вегетативные клетки
АТФ	3	725
АДФ+АМФ	544	195
ГТФ+ЦТФ+УТФ	<10	680
Сумма нуклеотидов (Г+Ц+У)	530	860
Дезоксирибонуклеотиды	<1,5	181
Фосфоглицериновая кислота	6800	—
Аминокислоты	150	1400

няются путем гидролиза небольших запасных белков, составляющих до 20 % по массе от общей массы белка споры. Эти же запасные белки имеют дополнительную функцию связывания споровой ДНК, повышая таким образом ее устойчивость к облучению. Энергия для восполнения отсутствующих компонентов может быть получена из стабильного 3-фосфоглицерата путем его конвертации в источник энергии и фосфата — фосфоенолпируват.

Термоустойчивость спор, по-видимому, объясняется наличием соответствующих белков, часть которых происходит из ферментов вегетативной клетки в результате ограниченного протеолиза, становясь при этом термостабильными. Другие специфические ферменты, синтез которых индуцируется при споруляции, также термоустойчивы.

До сих пор точно не известно, почему споры столь устойчивы к нагреванию и действию химических веществ. Считают, что в терморезистентности спор главную роль играет Са-дипиколонат — кальциевая соль дипиколоиновой кислоты (рис. 51), содержание которой в спорах может достигать 15 %. Однако недавно были выделены мутанты *B. megaterium*, споры которых не содержали дипиколоиновой кислоты, но также были термоустойчивы. Вегетативные клетки практически не содержат Са²⁺, активный транспорт этого иона начинается с началом спорообразования и созревшая спора содержит высокую концентрацию Са²⁺, который

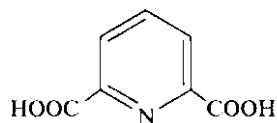


Рис. 51. Структурная формула дипиколоиновой кислоты. В споре при замещении двух карбоксильных групп образуется дипиколонат кальция

хелирован эквивалентными количествами дипиколоиновой кислоты, образуемой в спорангии из диаминопиколоиновой кислоты — предшественника пептидогликана. Са-дипиколонат локализован в ядре споры, что показали опыты с мечеными атомами, и может принимать участие в стабилизации споровых нуклеиновых кислот. Недавно в спорах были обнаружены также небольшие кислоторастворимые белки, связывающие ДНК. Они окружают ДНК споры и защищают ее от нагревания, радиации, воздействия химических веществ и высушивания.

Важную роль в устойчивости спор к высушиванию играет снижение содержания воды в протопласте. В процессе дегидратации может принимать участие кортекс, который осмотически вытягивает воду из протопласта, таким образом защищая его содержимое от нагрева и повреждений, вызванных различного рода облучениями. Процесс дегидратации требует затрат значительного количества энергии. Показано, что действие пенициллина снижает степень дегидратации протопласта споры, нарушая структуру кортекса. Итак, можно заключить, что термоустойчивость спор объясняется, по-видимому, несколькими факторами: стабилизацией ДНК Са-дипиколонатом и кислоторастворимыми белками, дегидратацией протопласта и др.

Споруляция (например, *B. megaterium*) обычно начинается при истощении питательных веществ в среде. Образование споры — сложный процесс, который можно подразделить на 7 стадий (рис. 52). На стадии I в материнской клетке формируется второй полный нуклеоид, отделяющийся от остального содержимого клетки ЦПМ, которая впивается внутрь цитоплазмы, образуя септу преспоры (стадия II). Мембрана продолжает нарастать и окружает незрелую спору двойным слоем (стадия III). Далее между двумя слоями мембраны начинается формирование кортекса, на этой стадии (IV) начинается накопление в споре Са-дипиколоната. На стадии V вокруг кортекса образуются белковые оболочки и экзоспориум. На стадии VI синтез оболочек завершается, спора превращается в зрелую, увеличивается ее светопреомление, термоустойчивость и на стадии VII происходит лизис спорангия и выход споры. Длительность цикла спорообразования составляет обычно от 7 до 10 ч (у *B. subtilis* и *B. megaterium* соответственно).

Прорастание спящей споры в активную вегетативную клетку — не менее сложный процесс, чем спорообразование (рис. 53). Оно проходит в три стадии: 1) активация; 2) созревание и 3) прорастание. Часто споры не прорастают даже в богатой среде без активации, которая может заключаться в слабом нагреве или воздействии ультразвуком. Процесс активации заканчивается созреванием, т.е. нарушением состояния покоя споры. Процесс характеризуется набуханием споры, разрывом или поглощением экзоспориума, потерей устойчивости к нагреву и стрессам, утратой способности пре-

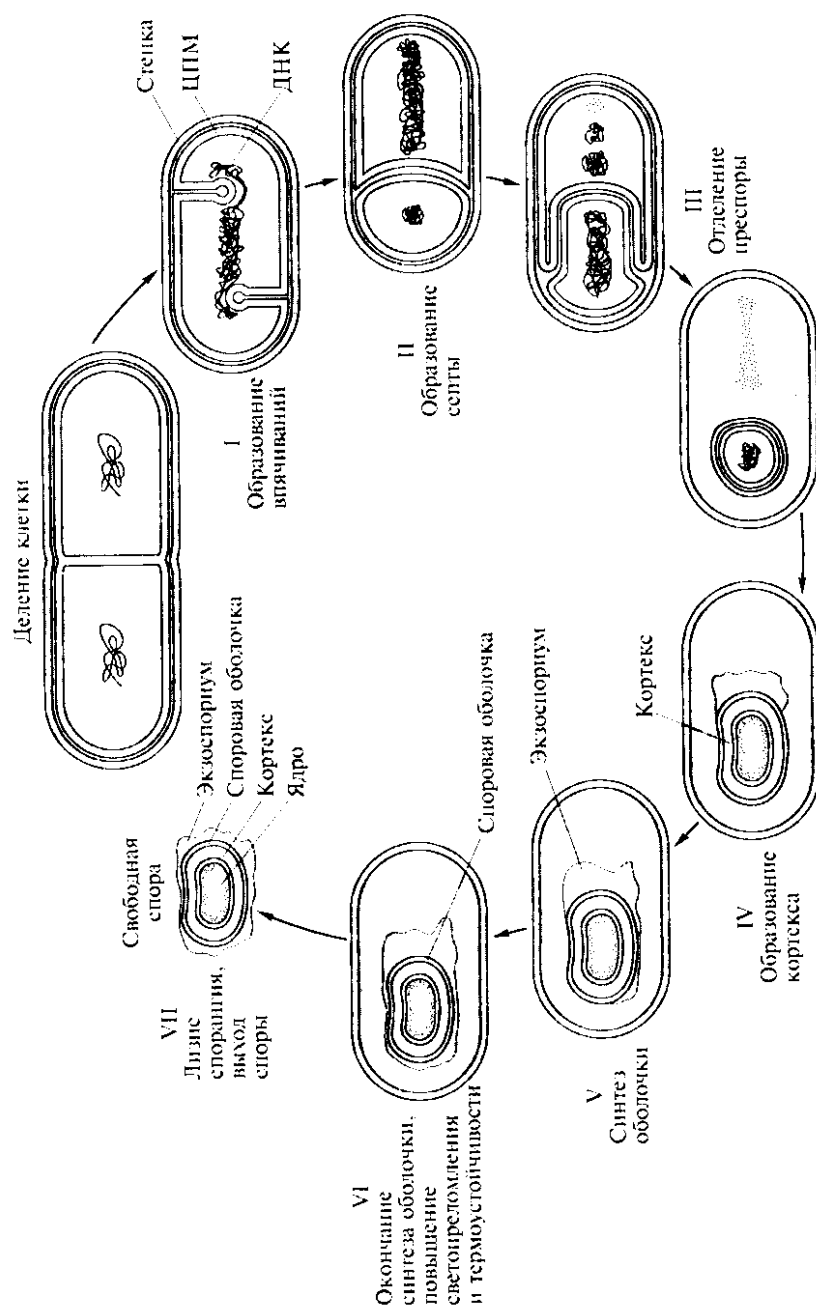


Рис. 52. Цикл образования эндоспоры (I—VII — стадии процесса)

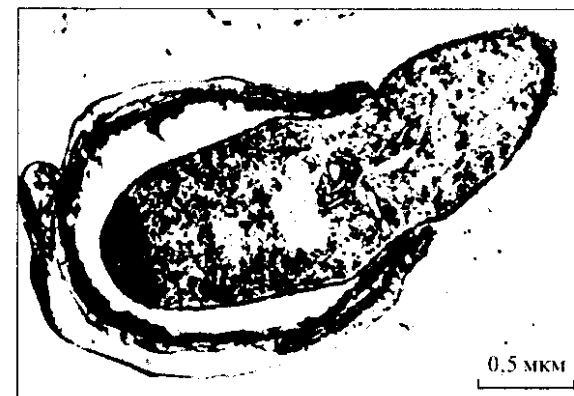


Рис. 53. Прорастание эндоспоры. Вегетативная клетка *C. pectinovorum* выходит из спорных оболочек после их разрыва

ломлять свет, увеличением метаболической активности. Многие обычные метаболиты, такие, как аминокислоты и сахара, могут впускать процесс *прорастания* спор после их созревания. Протопласт споры образует новые компоненты, выходит из остатков спорных оболочек и формирует новую активную клетку бактерии.

Некоторые прокариоты, наряду с эукариотическими организмами типа простейших, образуют другие виды покоящихся форм, называемые *цистами*. Циста — это потерявшая подвижность клетка с утолщенной, ослизненной оболочкой, устойчивая к высушиванию и перепадам температур. Цисты характеризуются состоянием покоя со значительно сниженной метаболической активностью. Образование цист показано для азотфиксирующих свободноживущих микроорганизмов из рода *Azotobacter*, некоторых метанотрофов и олиготрофов. Цисты выполняют три основные функции: 1) защищают популяцию от вредных воздействий окружающей клетки среды, таких, как истощение источника питания, высушивание, неблагоприятный pH или низкое парциальное давление кислорода; 2) служат способом сохранения ДНК; 3) являются способом передачи инфекционного начала от хозяина к хозяину (у патогенов). Обычно прорастание цист стимулируется благоприятными внешними условиями для развития клеток. Некоторые цисты паразитических видов простейших при попадании в ЖКТ хозяина превращаются в активные трофозиготы.

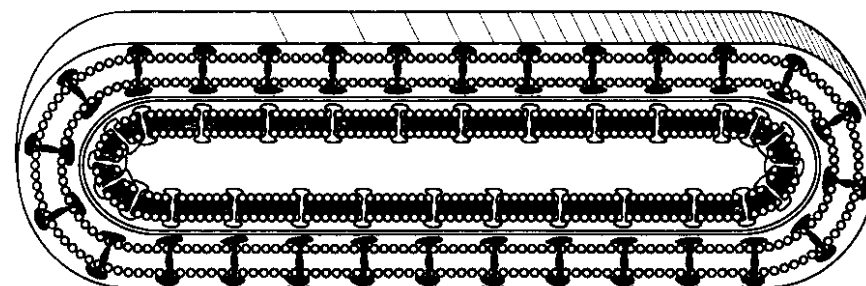
Движение клеток

Среди прокариот есть подвижные и неподвижные виды. Чаще всего движение клеток осуществляется за счет вращения *жгути-*

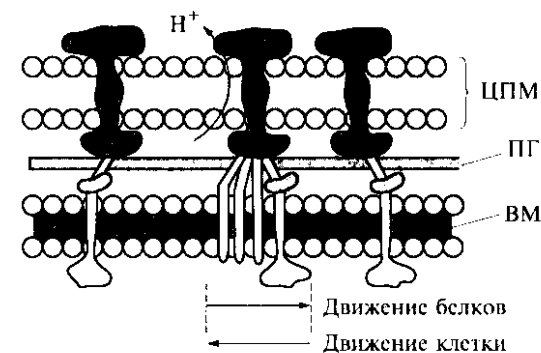
ков (см. рис. 43). Несколько модифицированный тип движения наблюдается у спирохет, которые обладают так называемой *аксиальной нитью*. Аксиальная нить — это комплекс периплазматических эндожгутиков, тянущихся от одного конца клетки до другого, по спирали оборачиваясь вокруг нее. Еще одним способом движения является *скольжение клеток*, механизм которого еще недостаточно изучен.

Скользящие бактерии — представители различных таксономических групп — лишены жгутиков и при перемещении по поверхности твердой среды оставляют слизистый след. Скорость передвижения клеток может составлять от 2 до 60 мкм/мин, причем в молодом возрасте клетки более подвижны. Активно двигающиеся клетки имеют преимущества перед неподвижными: они могут передвигаться по поверхности твердого субстрата, поэтому способны использовать такие сложные нерастворимые соединения, как хитин и целлюлоза; способность к скользящему движению помогает двигаться среди твердых субстратов (почва, осадки и небольшие каналы в гниющей древесине), выбирать оптимальную позицию в отношении градиентов кислорода, света, сероводорода, температуры и других факторов. Скользящее движение варьирует по скорости и по механизму. Так, *Flavobacterium johnsoniae* скользит за счет белков внешней мембраны, на которые передается усилие с белков ЦПМ, и движение вперед по поверхности представляет собой вид отталкивания (рис. 54). Бактерии, относящиеся к родам *Mycobacterium* и *Flexibacter*, скользят в направлении длинной оси клетки, другие передвигаются винтовым движением или даже в направлении, перпендикулярном длинной оси клетки (*Saprospira*, *Simonsiella*). *Beggiatoa*, цианобактерии и некоторые другие бактерии при скользящем движении вращаются вокруг длинной оси клетки. Многие клетки сгибаются или подергиваются при скольжении. Такие различия в движении могут отражать существование разных механизмов скольжения. Хотя при скольжении клетки выделяется слизь, не она толкает клетки. Слизь скорее нужна для смачивания поверхности с целью улучшения скольжения. Клетки некоторых фототрофов (*Oscillatoria*) содержат на поверхности фибриллы или филаменты, при сокращении которых во внешней мембране возникают волны, за счет которых клетка движется. В оболочках некоторых клеток присутствуют кольцеобразные белковые комплексы, которые могут вращаться, что способствует движению клеток. Разница в поверхностном натяжении может двигать клетки *Mycobacterium xanthus*, которые выделяют поверхностно-активные вещества с одного конца клетки. На разных концах клетки возникают различия в величине поверхностного натяжения, которые и толкают ее вперед.

Описано также «прыгающее» движение, природа которого не выяснена.



А



Б

Рис. 54. Схема предполагаемого механизма скользящего движения клеток *Flavobacterium johnsoniae* и других скользящих бактерий:

А — схема среза клетки грамотрицательных бактерий, демонстрирующая специфические белки скольжения, закрепленные в ЦПМ и ВМ; Б — детальная схема расположения белков скольжения. Полагают, что в пептидогликановом слое закреплены частицы «гусеницы», которая соединяет белки ЦПМ с белками ВМ и выталкивает их по твердой поверхности. Обратите внимание на разнонаправленность движения белков ВМ и общего движения клетки

Подвижные бактерии способны осуществлять реакции *таксиса*, которые помогают им ориентироваться в пространстве, узнавать друг друга при конъюгации или поиске симбионта: фототаксис (особенно важен для фототрофных микроорганизмов), хемотаксис (движение к аттрактантам и от репеллентов), магнитотаксис (например, *Aquaspirillum magnetotacticum* имеет внутриклеточные цепочки магнетитовых частиц, или магнетосом, которые помогают ей ориентироваться относительно линий магнитного поля Земли, выбирая оптимальное местоположение), аэротаксис (по градиенту кислорода, важен для микроаэрофильных и анаэробных бактерий). Бактерии могут «узнавать» аттрактанты до концен-

траций 10^{-8} М. В настоящее время обнаружено более 20 различных хеморецепторов на аттрактанты и столько же — на репелленты. Хеморецепторы могут быть локализованы в периплазме или в цитоплазматической мембране.

Размножение и развитие прокариот

Дифференциация у одноклеточных микроорганизмов выражена уже на уровне почкующихся форм (например, у *Hyphomicrobium*). У цианобактерий в трихомах есть специализированные клетки (рис. 55). Это *гетероцисты*, имеющие толстую оболочку, не делящиеся, содержащие много нитрогеназы и без фотосистемы II, и *акинеты* — покоящиеся клетки с плотной оболочкой.

Сложная дифференцировка наблюдается у актинобактерий: имеются различные типы мицелия (субстратный и воздушный) и сложные органы спороношения (конидии и спорангии).

У бактерий наиболее распространено бинарное деление (на две равные части), причем у грамположительных оно происходит септой, а у грамотрицательных — перетяжкой. Другие типы размножения — почкование и множественное деление. При почковании, которое иногда происходит с помощью дополнительных выростов, можно выделить материнскую и дочернюю клетки (неравное деление). Множественное деление отмечено у некоторых цианобактерий (например, рода *Dermocarpa*), когда из одной клетки образуется множество мелких *баеоцитов*, которые иногда еще и подвижны. Нитчатые цианобактерии способны размножаться с помощью *гонидий* и *гормогоний* (рис. 56). Для некоторых метанотрофов характерно образование экзоспор. Сложные формы раз-

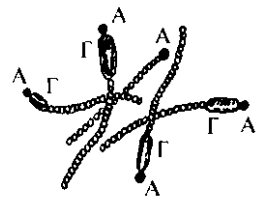


Рис. 55. Акинеты (А) и гетероцисты (Г) нитчатой цианобактерии *Cylindrospermum*

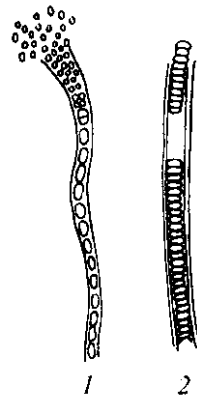


Рис. 56. Гонидии (1) и гормогонии (2) нитчатых бактерий

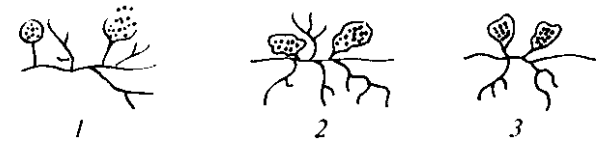


Рис. 57. Спорангии актинобактерий:
1 — *Actinoplanes*; 2 — *Amorphosporangium*; 3 — *Spirillospora*

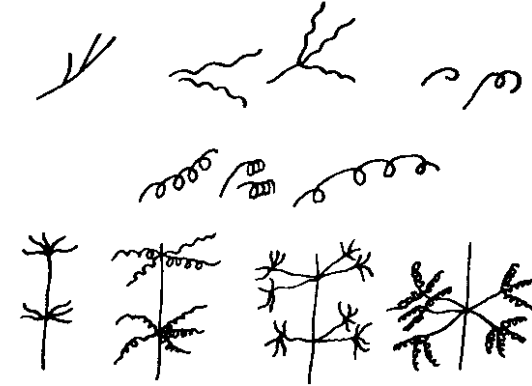


Рис. 58. Формы воздушных спороносцев у актиномицетов

множения встречаются у актиномицетов (рис. 57, 58). Это может быть простая фрагментация мицелия, образование экзоспор на поверхности субстратного мицелия или конидио- и спорангиоспор на специальных гифах.

Для бактерий размножение, как правило, не связано с половым процессом. Однако у некоторых наблюдается особый процесс передачи генетической информации с образованием мероплзоты — конъюгация. Другие типы передачи генетической информации — трансформация (с помощью переноса «голой» ДНК) и трансдукция (с помощью бактериофагов).

У эукариот размножение часто связано с половым процессом или с парасексуальным циклом.

Бактерии со сложным циклом развития. Некоторые прокариоты характеризуются сложным циклом развития, в процессе которого может меняться морфология клеток и образуются различные покоящиеся формы. Известны бактерии, образующие плодовые тела, часто причудливых конфигураций и расцветок (рис. 59). Наиболее яркие представители таких организмов — миксобактерии (рис. 60) — хищники, питающиеся другими микроорганизмами, бактериями и дрожжами, которых они убивают выделяемыми антибиотиками. Миксобактерии образуют целый ряд экзосферментов, с помощью которых лизируют клетки жертв или

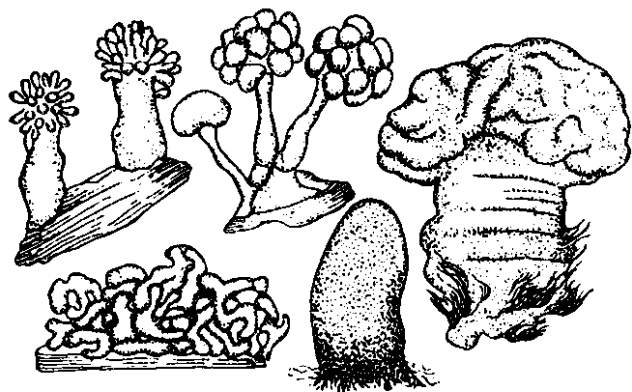


Рис. 59. Плодовые тела миксобактерий

гидролизуют субстрат. Продукты гидролиза, в основном короткие пептиды, всасываются в клетки миксобактерий и служат им питательным веществом.

Большинство миксобактерий использует аминокислоты как источник углерода, азота и энергии. В присутствии пищевого субстрата миксобактерии мигрируют по его поверхности, одновременно питаясь и оставляя слизистый след. На этой стадии развития клетки могут «рониться», т. е. передвигаться координированно, подобно роям насекомых, ищущих новые территории для освоения. Клеточные слои, двигаясь ритмично, образуют волны или рябь на поверхности субстрата (рис. 61). Когда субстрат исчерпывается, миксобактерии агрегируют и дифференцируются в плодовое тело (рис. 62). Этот сложный процесс (рис. 63) запускается голоданием клеток и координируется по крайней мере пятью различными химическими сигналами, ряд из которых идентифицирован.

При образовании плодовых тел экспрессируется не менее 15 новых белков. Размеры плодовых тел варьируют в пределах от 50 до 500 мкм. Плодовые тела содержат 10^4 — 10^6 миксоспор и обычно ярко окрашены пигментами каротиноидной природы в красный, желтый и коричневый цвета. Плодовые тела различаются по сложности строения от простых глобул, окруженных стенками (*Myxococcus*), до разветвленных древовидных структур, несущих несколько спорангиев на стеблях или стволах (*Stigmatella*, *Chondromyces*). Каждый вид образует характерные для него плодовые тела.

Миксоспоры, сформированные из вегетативных клеток и находящиеся в спорангиях плодовых тел, устойчивы к высушиванию, высоким температурам и УФ-радиации. Они могут оставлять-



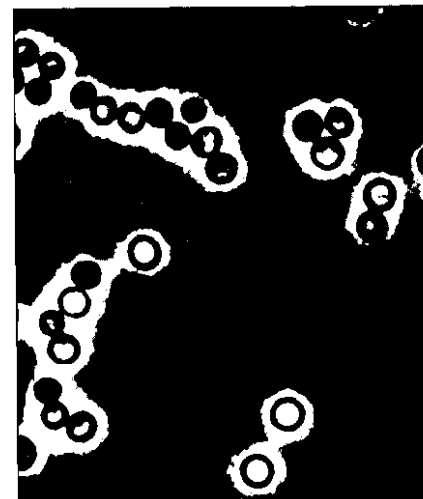
А



Б

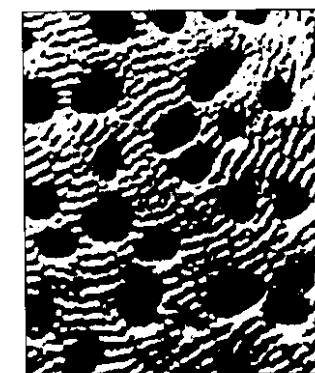
Рис. 60. Различные формы клеток миксобактерий, образующих плодовые тела:

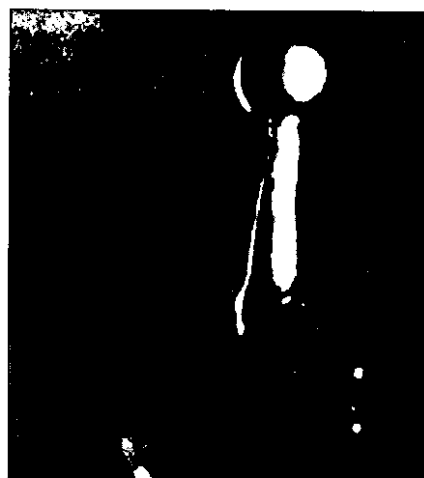
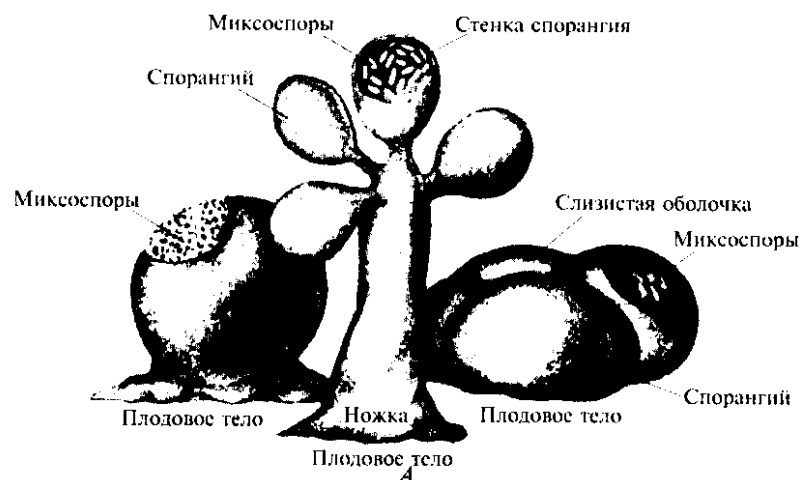
А — палочковидные клетки с заостренными концами *Stigmatella aurantiaca* (1 200 $\times$); Б — бациллярные клетки *Chondromyces crocatus* (950 $\times$); В — миксоспоры *Myxococcus xanthus* (1 100 $\times$). Все фотографии сделаны с помощью фазово-контрастного микроскопа



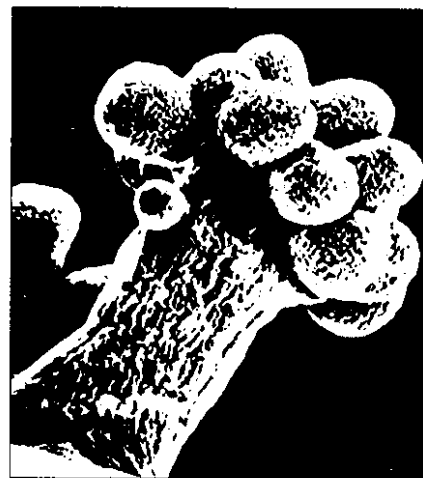
В

Рис. 61. Рябь и волны на поверхности лара, образовавшиеся при скоординированном движении клеток *M. xanthus* в процессе образования плодовых тел. Темные зоны — места начала образования незрелых плодовых тел (шкала — 0,4 мкм)





Б



В



Г

Рис. 62. Плодовые тела, образуемые разными миксобактериями:

А — рисунок, показывающий типичные плодовые тела миксобактерий; Б — микрофотография плодового тела *Мухосoccus stipitatus*. Высота ножки может достигать 0,2 мм; В — вид плодового тела *Chondromyces crocatus* в сканирующем электронном микроскопе. Высота ножки может достигать 0,7 мм; Г — плодовые тела *Мухосoccus fulvus* (0,15—0,40 мм в высоту)

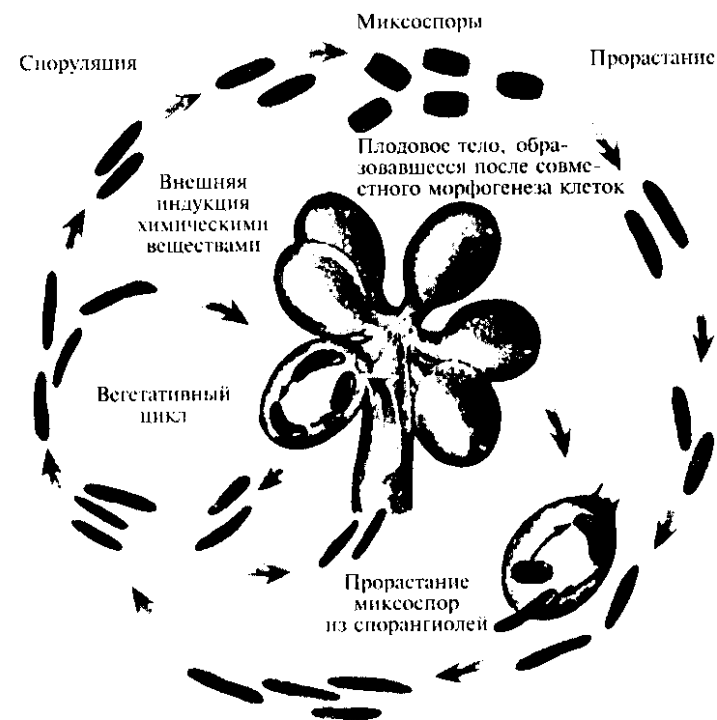


Рис. 63. Схема жизненного цикла миксобактерий. Цикл начинается с образования микоспор после индукции этого процесса различными химическими веществами. Прорастая, микоспоры дают начало новым вегетативным клеткам, и цикл повторяется. Образование плодовых тел запускается химическими сигналами, возникающими при истощении субстрата, и в процессе координированного морфогенеза завершается формированием спорангиолей с микоспорами. Прорастание микоспор из спорангиолей дает начало новым вегетативным клеткам, вступающим в новый жизненный цикл

ся жизнеспособными в условиях лаборатории до 10 лет. Образование плодовых тел с микоспорами, заключенными в спорангии, способствует еще большему выживанию микоспор, так как они находятся компактно в плодовых телах и новая колония миксобактерий развивается автоматически, когда микоспоры высвобождаются из спорангия и прорастают.

Такая социальная организация может иметь преимущества, так как миксобактерии получают питательные вещества при выделении экзоферментов и адсорбции продуктов гидролиза.

Значительная биомасса миксобактерий может обеспечить существенную концентрацию ферментов и растворить клетки жертвы или субстрат более эффективно, чем одиночная клетка.

Контрольные вопросы

1. Назовите принципиальные отличия клеточной организации эу- и прокариот.
2. Назовите самые мелкие и самые крупные микроорганизмы, известные в настоящее время.
3. Что такое плейоморфизм? Насколько это явление распространено среди микроорганизмов?
4. Как с развитием биологии менялись представления о генетическом аппарате прокариот?
5. Проанализируйте различия в строении клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Какие клеточные стенки характерны для архей?
6. В чем сходство и различие в строении и функциях ЦПМ и внешней мембраны грамотрицательных микроорганизмов?
7. Перечислите включения и запасные вещества, присущие микроорганизмам. Назовите их основные функции.
8. Назовите поверхностные структуры клеток микроорганизмов, ответственные за движение и прикрепление к субстрату. Какие еще функции могут выполнять эти структуры?
9. Почему покоящиеся формы прокариот обладают значительной устойчивостью во внешней среде?
10. Перечислите способы размножения у прокариот.
11. Какие преимущества даст миксобактериям наличие социального поведения?

Глава 4

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ И РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ

Питание бактерий

Требования к питательным веществам. Типы сред. Микробная клетка содержит в среднем, % по массе: углерода — 50, азота — 14, фосфора — 3 и другие элементы. Для роста и развития микроорганизмов как в лабораторных условиях, так и в природе необходимо наличие питательных веществ для энергетических и конструктивных реакций. Требования разных групп микроорганизмов к источникам энергии и химическим элементам определяются их метаболическими возможностями.

Основными *биогенными элементами* являются углерод, азот, фосфор, кислород, водород, сера. Это компоненты белков, углеводов и жиров, а также нуклеиновых кислот. Такие элементы требуются в значительных количествах (г/л) и поэтому их называют *макроэлементами*. К макроэлементам относят также калий, магний, натрий, кальций и железо, которые обычно присутствуют в клетках в виде ионов и выполняют разные роли. Например, K^+ необходим для активности большого числа ферментов, в частности ферментов белкового синтеза; Ca^{2+} определяет устойчивость бактериальных эндоспор к нагреванию; Mg^{2+} стабилизирует рибосомы, многие ферменты и клеточные мембраны; Fe^{2+} и Fe^{3+} являются частью цитохромов и кофакторами электронпереносящих белков.

К *микроэлементам*, необходимым в микромолярных количествах, относят ионы таких металлов, как хром, кобальт, медь, молибден, марганец, никель, селен, вольфрам, ванадий, цинк, обычно входящих в состав ферментов и кофакторов. Например, Co^{3+} является компонентом витамина B_{12} , Cu^{2+} входит в состав цитохромоксидазы и купредоксинов, Mn^{2+} активирует ферменты, катализирующие перенос фосфатных групп, Mo^{2+} входит в состав нитрогеназы и нитратредуктазы, Ni^{2+} является компонентом уреазы, гидрогеназы, кофактора F_{430} , Zn^{2+} входит в состав карбоангидразы, ДНК- и РНК-полимераз и т.д. Необходимые для микроорганизмов количества микроэлементов содержатся в обычной водопроводной воде. При работе на дистиллированной воде микроэлементы добавляют специально. Некоторые группы микроорга-

низмов проявляют специфические потребности. Например, для диатомей необходимо присутствие большого количества соединений кремния, из которых они строят свои клеточные стенки.

Часто для обозначения питательных потребностей организма пользуются терминами «прототроф» и «ауксотроф». *Прототроф* не нуждается в факторах роста, *ауксотроф* требует добавления таких факторов в среду. Ауксотрофные формы часто являются мутантными организмами, или патогенами. Фактором роста в принципе может называться любое вещество. Например, молочнокислые бактерии нуждаются в наборе почти всех аминокислот, и в данном случае они и являются факторами роста. Но чаще ауксотрофность проявляется по витаминам (кофакторам ферментов). Обычно источником комплекса витаминов служит дрожжевой автолизат (автолиз дрожжей проводят при температуре 50 °С с небольшим количеством толуола) с добавлением витамина В₁₂, так как в дрожжевом автолизате его мало. Дрожжевой автолизат — это также и источник азота в виде аминокислот и полипептидов.

Витамины играют важную роль в метаболизме. Пара-аминобензойная кислота (ПАБК) является предшественником фолиевой кислоты — кофактора реакций переноса метильных групп. ПАБК должна поступать в организм животных с пищей или в результате деятельности микроорганизмов кишечника. Биотин (витамин Н) участвует в метаболизме жирных кислот, в реакции гетеротрофной фиксации СО₂ на пируват (реакции Вуда — Веркмана). Витамин В₁₂ (кобаламин) принимает участие в переносе С₁-фрагментов и в синтезе дезоксирибозы. Липоевая кислота переносит ацильные группы, например при декарбоксилировании оксоглутарата. Пантотеновая кислота — предшественник кофермента А (КоА), участвующего в переносе ацетила. Рибофлавин (В₂) — предшественник ФМН и ФАД, переносчиков электронов. Тиамин (В₁) является кофактором 2-оксоглутаратдегидрогеназы, а также участвует в переносе альдегидных групп. Витамин В₆ (пиридоксаль) принимает участие в превращениях аминок- и кетокислот. Витамин К (хинон) является переносчиком электронов, участвует в синтезе сфинголипидов, а также активирует систему свертывания крови у животных. Ниацин (никотиновая кислота) важна как предшественник НАД⁺ и НАДФ⁺, переносящих электроны и протоны. Для микроорганизмов, использующих в своем обмене вещества ионы двухвалентного железа, фактором роста могут считаться сидерофоры (в частности, гидроксаматы), транспортирующие Fe²⁺ в клетку в аэробных зонах.

Что касается спектра потребляемых органических веществ, то у некоторых микроорганизмов он очень широк (например, у *Pseudomonas*, *Actinomyces*), у других — достаточно узок (например, у облигатных метилотрофов). В то же время имеются микроорга-

низмы, способные использовать сложные неприродные соединения типа пластиков, красителей, пестицидов. У некоторых микроорганизмов потребности в питании так сложны, что они растут только внутри живого организма (например, внутриклеточные паразиты бделловибрио, риккетсии и хламидии).

Микроорганизмам необходимо разное количество питательного субстрата в среде обитания для их роста и развития. Так, *олиготрофные* микроорганизмы растут только при низких концентрациях питательных веществ (от долей до 100 мг/л), а обычные концентрации (1 — 100 г/л) лимитируют их рост. При этих концентрациях растут микроорганизмы — *копиотрофы*. Истинно олиготрофными считаются организмы, эволюционно приспособленные к эксплуатации экотон с постоянно низкими потоками вещества и энергии. Такой рост обеспечивается высокоэффективными транспортными системами и экономным расходом полученного вещества и энергии.

К особенностям метаболизма олиготрофов относят:

- аэробность;
- высокое соотношение поверхности к объему, образование различных выростов;
- малые размеры;
- отсутствие покоящихся стадий;
- высокое родство к субстрату;
- транспортные системы с широкой субстратной специфичностью, одновременное поглощение всех доступных субстратов;
- способность к накоплению резервных веществ;
- высокая гибкость катаболизма;
- низкие скорости роста в оптимальных условиях;
- регуляция анаболизма скоростью поглощения веществ;
- низкие скорости эндогенного метаболизма.

По способности использовать биологические полимеры, часто нерастворимые в воде, микроорганизмы подразделяются на функциональные группы *гидролитиков* и *диссипотрофов*. Первые обладают мощными литическими ферментами, разрушающими высокомолекулярные соединения, и обеспечивают субстратами себя и микроорганизмы, не имеющие гидролаз, а также способствуют возвращению элементов в глобальные циклы. Диссипотрофы (микрофлора рассеяния) не имеют экзогидролаз и потребляют те вещества, которые по различным причинам остаются неиспользованными гидролитиками и имеются в незначительных количествах.

Разнообразные питательные среды, используемые в микробиологической практике для культивирования микроорганизмов, подразделяются по составу (натуральные, полусинтетические и синтетические), физическому состоянию (жидкие, плотные и сухие) и назначению (элективные и дифференциально-диаг-

ностические). Для успешного культивирования конкретных групп микроорганизмов необходимо выдерживать оптимальные для них значения ряда физико-химических параметров (рН, температура, освещенность, активность воды и т.д.). Концентрации питательных субстратов в средах для лабораторных исследований, как правило, существенно превышают содержание этих веществ в природных местообитаниях.

Широко используемые типы сред, способы культивирования и методы получения различных культур подробно изучаются на практических занятиях. Некоторые специфические приемы культивирования будут рассмотрены в главах, посвященных отдельным группам микроорганизмов (см. гл. 6, 11).

Типы питания микроорганизмов. По типам питания (трофии) все живые существа разделяют на несколько групп в зависимости от природы источников углерода и энергии, а также донора электронов (табл. 4). Организмы, использующие в качестве источника углерода в конструктивном метаболизме углекислоту, называют автотрофами, а использующие готовые органические вещества — гетеротрофами. Если для энергетического метаболизма источником служит свет, то организм называют фототрофом. Хемотрофия характеризуется использованием энергии химических реакций. При этом органотрофы в качестве донора электронов применяют органическое вещество, а литотрофы — неорганическое.

Таблица 4

Типы питания микроорганизмов

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	
		Органические вещества	CO ₂
Свет	Органические вещества	Фотоорганогетеротрофы (пурпурные несерные бактерии)	Фотоорганоавтотрофы (окисление неусваиваемых веществ)
	Неорганические вещества	Фотолитогетеротрофы (некоторые зеленые бактерии, гелиобактерии)	Фотолитоавтотрофы (водоросли, цианобактерии)
Энергия химических связей	Органические вещества	Хемоорганогетеротрофы (микроорганизмы-деструкторы)	Хемоорганоавтотрофы (трудноусваиваемые вещества)
	Неорганические вещества	Хемолитогетеротрофы (некоторые сульфатредукторы)	Хемолитоавтотрофы (серуокисляющие, водородные, нитрифицирующие, железобактерии)

Высшие животные и растения способны только к хемоорганогетеротрофии и фотолитоавтотрофии соответственно, тогда как у микроорганизмов представлены все типы метаболизма, к тому же они могут переключаться с одного типа питания на другой в зависимости от условий. Типы питания можно считать «пробами» эволюции. Следует заметить, что и гетеротрофы могут использовать CO₂, но в отсутствие органических веществ они расти не могут.

Рост и развитие микроорганизмов

У одноклеточных форм понятия «рост» и «развитие» почти равнозначны. Различают *сбалансированный рост*, когда увеличение всех веществ и структур происходит пропорционально. Если в среде есть нехватка или избыток чего-нибудь, то рост становится *несбалансированным*, т.е. какие-то продукты метаболизма могут преобладать. Этим приемом пользуются для направленного синтеза необходимых соединений.

Количественная оценка роста микроорганизмов. Из-за малых размеров микроорганизмов оценка роста происходит не для индивидуального организма, а для популяции. Графическое отражение процесса называется *кривой роста*.

Чтобы правильно оценивать рост культуры, необходимы следующие простейшие параметры:

- концентрация клеток, клеток/мл;
- время генерации — промежуток времени, за который число клеток удваивается;
- константа скорости деления — число удвоений в час;
- константа скорости роста.

Количественная оценка роста микроорганизмов требует определения числа клеток в конкретный момент. Все эти методы подразделяют на прямые и косвенные. Прямые методы предполагают непосредственный подсчет клеток под микроскопом — в счетных камерах или на фиксированных мазках. При этом подсчитываются и живые, и мертвые клетки, к тому же такой подсчет возможен только для достаточно крупных микроорганизмов, не образующих агрегаты. К косвенным методам относятся высевы на твердые питательные среды, осаждение на мембранных фильтрах, определение параметров, пропорционально зависящих от количества клеток (биомасса, высушенная на фильтрах постоянной массы, мутность суспензии, общий азот, белок, поглощение кислорода и выделение углекислоты). Следует помнить, что нет универсального метода, лишенного недостатков. Любой метод имеет свои ограничения. Например, не все клетки способны дать колонии на твердой среде, нет питательной среды, подходящей для всех без исключения микроорганизмов, и т.д.

Культивирование микроорганизмов

Накопительные и чистые культуры микроорганизмов. Из-за малых размеров микроорганизмов работа в лаборатории проводится не с одной особью, а с популяцией организмов, или культурой. Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, носит название *чистой культуры*. Если число видов два или больше, то говорят о *смешанной культуре*. При выделении чистой культуры из природных местообитаний, где микроорганизмы в большинстве случаев растут в виде смешанных популяций, на первом этапе обычно пользуются предложенным С. Н. Виноградским методом получения *накопительных культур*, в которых преобладают организмы определенной группы. Накопление желаемых микроорганизмов происходит за счет создания *элективных условий* культивирования, благоприятных для данной группы. Другие организмы, также присутствующие в пробе, в этих условиях либо не размножаются, либо характеризуются незначительным ростом.

Периодическое культивирование. Обычно при росте в жидких средах в закрытых сосудах определенного объема микроорганизмы находятся в закрытой системе. Такое культивирование называют периодическим, при этом популяция проходит разные фазы своей жизни (рис. 64). Каждая фаза характеризуется определенными физиологическими параметрами.

Лag-фаза — фаза «привыкания» клеток к среде, при этом происходит индукция соответствующих ферментов, увеличение количества ДНК и РНК. Лag-фаза удлиняется, если использовать старый посевной материал и переносить клетки в совершенно новую по составу среду. Лag-фаза сокращается (или может совсем отсутствовать), если активные молодые клетки из экспоненциальной фазы роста перенести в свежую среду того же состава и той же температуры. На средах, содержащих смесь субстратов, наблюдается *диауксия* (рис. 65).

В *экспоненциальной (логарифмической) фазе* клетки растут и делятся с максимальной скоростью, их рост не ограничен. Обычно такие клетки используют в биохимических и физиологических исследованиях.

По мере истощения субстратов и накопления продуктов обмена скорость роста снижается (*фаза замедления роста*) и культура переходит в *стационарную фазу*, в течение которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии. Для бактерий эта фаза достигается при концентрации в среднем 10^9 клеток/мл, для водорослей и простейших — 10^6 клеток/мл.

Когда истощение питательных веществ и накопление продуктов метаболизма преодолеют некие пороговые концентрации,

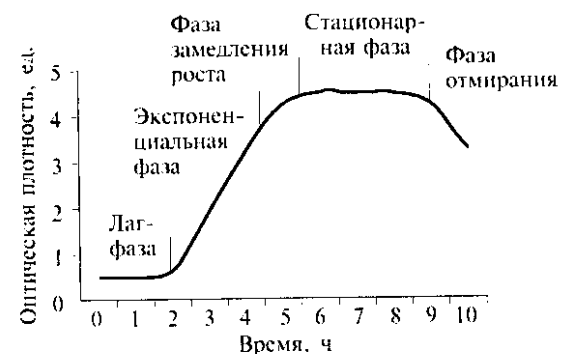


Рис. 64. Рост культуры при периодическом культивировании

начинается *фаза отмирания*, которая иногда также имеет логарифмический характер.

При росте в экспоненциальной фазе увеличение количества клеток N_t происходит в геометрической прогрессии: $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$ и через некоторое время t определяется по формуле

$$N_t = N_0 \cdot 2^n,$$

где N_0 — начальное количество клеток; n — число делений.

Прологарифмировав это выражение, получим

$$\lg N_t = \lg N_0 + n \lg 2.$$

Откуда

$$n = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg 2.$$

Тогда константа скорости деления

$$v = n / t = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg 2(t - t_0),$$

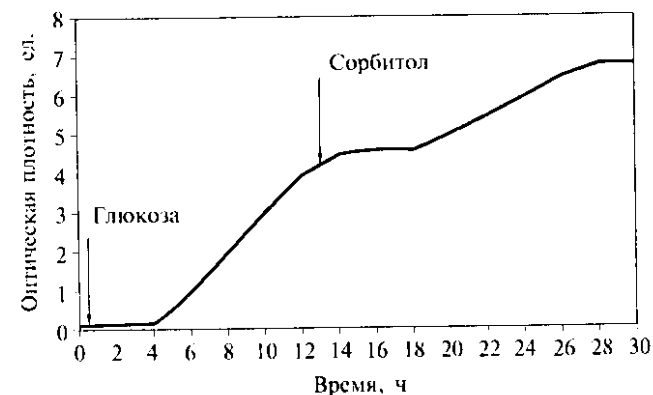


Рис. 65. Двухфазный рост *E. coli* на среде, содержащей глюкозу и сорбитол

время генерации

$$g = t/n = 1/\nu.$$

Самые быстрорастущие организмы — фотобактерии — удваиваются каждые 8 мин. *E. coli* в оптимальных условиях делится через 20 мин. Если массу одной клетки принять равной $2 \cdot 10^{-13}$ г, то при неограниченном росте через 48 ч клеток станет $2,2 \cdot 10^{43}$, т.е. образуется 10^{30} г биомассы, что в 130 раз больше массы Земли.

Например, сравним продуктивность 500 кг биомассы разных организмов за 1 сут (привес):

корова — 0,5 кг (масса морской свинки);

соя — 5 кг (масса кошки);

дрожжи — 50 000 кг (масса 10 слонов).

Экспоненциальный микробный рост изображается на полугарифмическом графике в виде прямой линии. Важной характеристикой культуры является *константа скорости роста* — μ , которая зависит от условий выращивания (если условия стандартные, то для данной культуры она совершенно определенная).

Если рассматривать популяцию не как набор индивидуальных особей, а как саморазмножающуюся систему, то скорость изменения плотности такой системы пропорциональна самой плотности, т.е. изменение следует кинетике реакций первого порядка. Тогда имеем

$$\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt},$$

или, проинтегрировав, $N = N_0 \cdot e^{\mu t}$.

После удвоения количества клеток

$$2N_0 = N_0 \cdot e^{\mu t},$$

или

$$2 = e^{\mu t},$$

или (после логарифмирования)

$$\ln 2 = \mu t_d.$$

Откуда время удвоения (время генерации)

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = g = \frac{1}{\nu} \text{ и } \mu = \nu \ln 2.$$

Подставив ν , выраженное через количество клеток, и перейдя к десятичным логарифмам, получаем

$$\mu = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg e (t - t_0) = (\lg N_t - \lg N_0) / 0.4343(t - t_0).$$

Считается, что в экспоненциальной фазе роста все клетки живые и рост клеточной массы строго пропорционален увеличению количества клеток.

Под *урожаем* (или выходом) биомассы понимают разность между максимальной $X_{\max}$ и исходной X_0 массой бактерий:

$$X = X_{\max} - X_0 \text{ (г сухого вещества).}$$

Важное значение имеет *экономический коэффициент*, т.е. отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата, г:

$$Y = X/S.$$

Применяют также *энергетический коэффициент*, г/моль:

$$Y_{\text{АТР}} = X/\text{АТР}.$$

Для его расчета нужно знать катаболические пути использования данного субстрата.

Иногда необходимо, чтобы все клетки в популяции делились одновременно (синхронно).

Для этого используют различные приемы получения *синхронных культур*:

- получение клеток одного размера путем фильтрации или дифференциального центрифугирования;
- резкое изменение температуры инкубации;
- воздействие света и т.д.

При этом кривая роста получается ступенчатой (рис. 66). Обычно удается синхронизировать не более трех делений, а потом культура снова переходит к асинхронному делению.

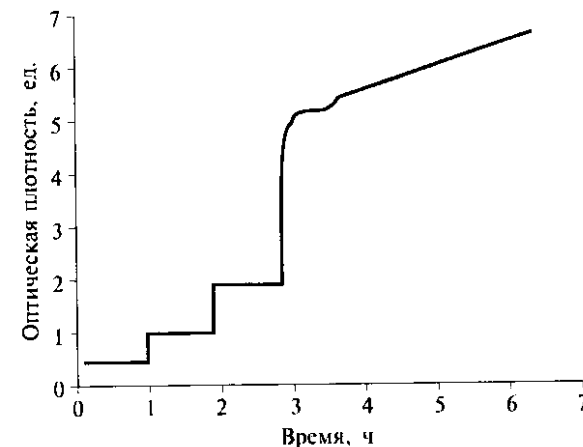


Рис. 66. Кривая роста синхронной культуры

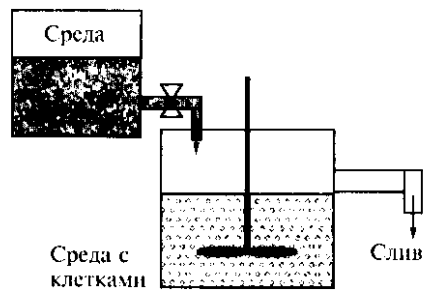


Рис. 67. Схема проточного ферментера

Непрерывное (проточное) культивирование. Проточная система культивирования позволяет зафиксировать культуру в какой-то определенной фазе (обычно экспоненциальной). При этом состав среды и условия роста остаются постоянными. Простейшая схема проточного ферментера представлена на рис. 67. Подача свежей среды и удаление части суспензии (проток) происходит с той же скоростью, с какой растет культура.

Существуют два принципиально разных типа непрерывных культур — хемостат и турбидостат.

В *хемостате* фиксируется какой-нибудь химический параметр процесса (концентрация субстрата, кислорода). Эта концентрация является лимитирующей.

Если объем сосуда обозначить через V , а скорость притока f (л/ч), то скорость разбавления определяется по формуле

$$D = f/V.$$

Если бы бактерии не росли, то скорость вымывания была бы равна

$$D_x = -\frac{dx}{dt}.$$

Плотность бактериальной суспензии снижалась бы экспоненциально:

$$x = x_0 \cdot e^{-Dt}.$$

Но бактерии тоже растут экспоненциально

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t}.$$

При этом скорость прироста

$$\mu_x = \frac{dx}{dt}.$$

Следовательно, скорость изменения плотности суспензии:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_x - D_x.$$

Если скорость прироста и скорость вымывания равны, то система находится в состоянии динамического равновесия.

Зависимость константы скорости роста μ от концентрации субстрата C_s описывается кривой насыщения:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s},$$

где K_s — концентрация субстрата, при которой $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$.

Если истинная константа μ вследствие лимитации по субстрату оказывается меньше $\mu_{\max}$, то скорость разбавления можно менять в широких пределах, не опасаясь, что это приведет к снижению плотности суспензии, однако D не должно превышать $\mu_{\max}$.

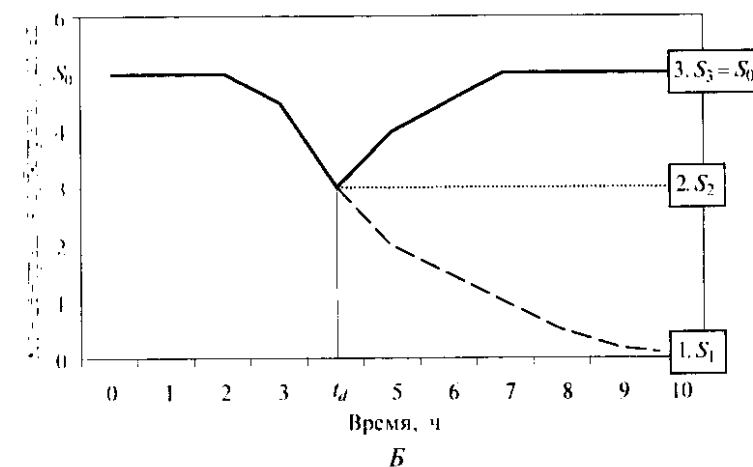
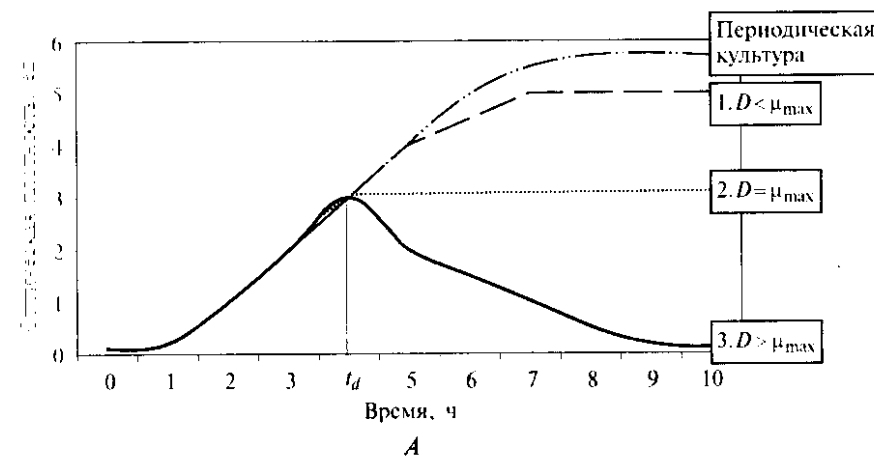


Рис. 68. Влияние скорости разбавления (D) на плотность суспензии (A) и концентрацию (S) субстрата (B) при росте культуры в хемостате

Уже при небольших концентрациях субстрата бактерии растут с достаточно высокой скоростью, а если C_s велико, то $\mu \rightarrow \mu_{\max}$.

При переходе от периодического культивирования к непрерывному в режиме хеостата в зависимости от установленной скорости разбавления плотность суспензии и концентрация субстрата будут меняться по-разному (рис. 68).

Работа *турбидостата* основана на поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии. Фотоэлемент измеряет плотность вытекающей суспензии и автоматически изменяет проток (чем плотнее культура, тем больше подается среды). В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, а скорость роста бактерий приближена к максимальной. При таком принципе работы возникают технические проблемы пристеночного обрастания поверхностей, в том числе и фотометрической кюветы.

Контроль роста микроорганизмов

Для практических целей важно осуществлять контроль за ростом микроорганизмов и подавлять развитие нежелательных форм. Активность микроорганизмов может, например, приводить к порче продуктов и развитию заболеваний. Поэтому бывает необходимо подавить микроорганизм или приостановить его рост. Агенты, вызывающие такие последствия, называют соответственно бактерицидными и бактериостатическими. Характер действия антимикробного агента часто зависит от концентрации. К тому же следует помнить, что для некоторых микроорганизмов эти вещества, наоборот, могут быть источниками углерода и энергии. Если необходимо убить все микроорганизмы в (на) объекте, то говорят о *стерилизации*. Для стерилизации применяют антимикробные агенты с широким спектром действия.

Все антимикробные агенты для удобства распределяют по нескольким группам в соответствии с механизмом их действия.

Первая группа включает вещества, приводящие к повреждению поверхностных клеточных структур. Например, 70 %-й этанол коагулирует белки, оказывая бактерицидное действие. Фенолы, крезолы, нейтральные мыла и различные поверхностно-активные вещества нарушают избирательную проницаемость цитоплазматической мембраны. С детергентами сходны по своему действию некоторые полипептидные антибиотики (полимиксин, бацитрацин, субтилин, низин).

Вторая группа объединяет вещества, действующие как ферментные яды и нарушающие нормальный метаболизм (например, тяжелые металлы — медь, ртуть, свинец). Они связываются с SH-группами белков, нарушая их пространственную структуру. Ци-

анид и CO действуют как дыхательные яды, блокируя цитохромоксидазы. 2,4-Динитрофенол является разобщителем процессов окисления и фосфорилирования. Арсенат ингибирует субстратное фосфорилирование. Антимицин А нарушает процесс переноса электронов по дыхательной цепи, ингибируя цитохром с-редуктазу. Фторациетат блокирует работу цикла трикарбоновых кислот.

Третья группа включает аналоги нормальных метаболитов, которые конкурируют с ними за каталитический центр фермента. Например, на этом основано лекарственное действие сульфаниламидных препаратов (рис. 69). У бактерий ПАБК является предшественником тетрагидрофолата. При включении структурного аналога (сульфаниламида) образуется нефункционирующий фермент и рост бактерий останавливается. На животные клетки при этом вредного воздействия не оказывается, так как фолиевая кислота в них *de novo* не синтезируется.

Четвертая группа объединяет вещества, нарушающие нормальные процессы синтеза полимеров. Например, на белковый синтез действуют антибиотики стрептомицин и неомицин (подавляют связывание аминокислот между собой), эритромицин (нарушает функции 50S-субъединицы рибосом), тетрациклин (препятствует связыванию аминоацил-tРНК с рибосомами), хлорамфеникол (подавляет функцию пептидилтрансферазы). Некоторые антибиотики подавляют синтез нуклеиновых кислот (митомицин С, актиномицин Д, рифампицин). Пенициллин и ряд других антибиотиков подавляют синтез пептидогликана (рис. 70).

Пятая группа включает вещества, оказывающие опосредованное действие (обычно, бактериостатическое). Например, высокие концентрации NaCl и сахаров снижают активность воды, оказывая консервирующее действие.

Итак, можно сделать вывод о том, что важное место среди антимикробных агентов занимают *антибиотики*. Введение их в медицинскую практику в значительной мере снизило смертность от инфекционных болезней. Необходимо отметить, что наблюдения за антимикробной активностью одних микроорганизмов по отношению к другим, патогенным, и даже попытки выделения ответственных за это веществ проводились с конца XIX в., но они не имели систематического характера. В 1929 г. А. Флемингом, в большой мере случайно, был открыт новый препарат пенициллин, который в кристаллическом виде был получен только в 1940 г. Затем процесс поиска новых антибиотиков и их продуцентов существенно ускорился. К настоящему времени известно около 3 тыс.

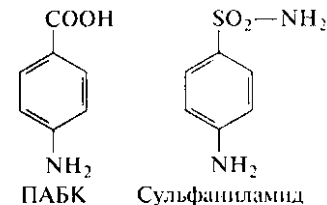


Рис. 69. Структурные аналоги

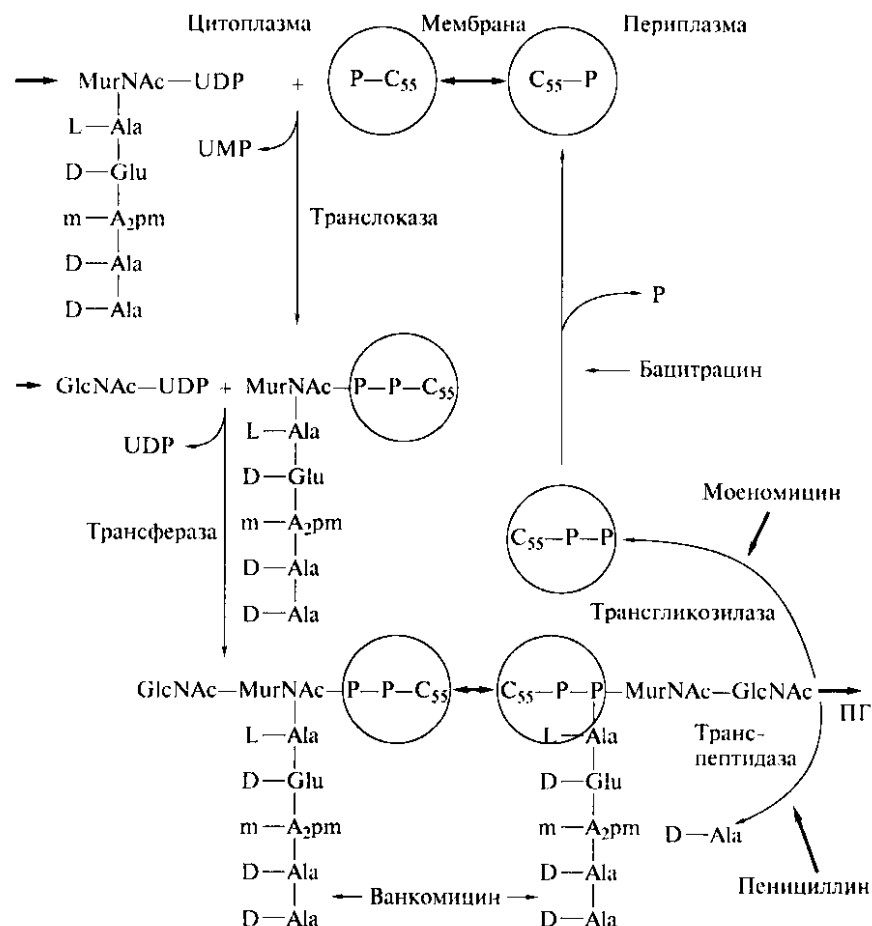


Рис. 70. Схема образования предшественников муреина, связывания их с липидом и переноса через ЦПМ. На схеме указаны места действия антибиотиков, нарушающих процесс синтеза клеточной стенки бактерий

антибиотиков и только около ста из них нашли применение в медицине. Однако антибиотики не стали панацеей от всех бед, так как активное их применение привело к появлению многообразных микробных форм с резистентностью к этим соединениям. Устойчивость связана, с одной стороны, с выработкой ферментов, расщепляющих антибиотики, с другой — с выработкой мощных транспортных систем, выбрасывающих чужеродные вещества (в том числе антибиотики) из клетки. Распространение устойчивости среди бактерий связывают с «горизонтальным» переносом плазмид резистентности. Этому способствует применение антибиотиков не только по прямому назначению как антимикробных

агентов, но и для профилактики, как стимуляторов роста, консервантов, а также в ветеринарии и растениеводстве. Для исключительных случаев существует несколько антибиотиков «стратегического запаса» (они не должны попадать в окружающую среду, чтобы в ответ не появились резистентные формы микробов).

Для преодоления множественной лекарственной устойчивости возбудителей осуществляется постоянный поиск новых антибиотиков, проводится химическая модификация известных молекул и выяснение путей подавления транспортных систем экскреции лекарственных веществ.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение макро- и микроэлементам.
2. Чем определяется роль витаминов в метаболизме микроорганизмов?
3. На какие группы подразделяются микроорганизмы по отношению к количеству и качеству питательного субстрата в среде обитания?
4. Назовите типы питания микроорганизмов. Сравните возможности микроорганизмов и высших организмов в этом отношении.
5. Каковы особенности периодического культивирования микроорганизмов?
6. Чем отличаются непрерывные культуры микроорганизмов, функционирующие в режиме хемостата и турбидостата?
7. Приведите классификацию антимикробных агентов. Назовите причины возникновения среди микроорганизмов множественной лекарственной устойчивости.

ДЕЙСТВИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Активность воды

Микроорганизмы распространены повсеместно, поэтому они подвергаются воздействию различных физико-химических факторов, что приводит к необходимости выработки соответствующих защитных механизмов. Некоторые микроорганизмы способны существовать в условиях широкого спектра различных факторов.

В осуществлении метаболизма важную роль играет активность воды a_w , равная отношению давления паров раствора к давлению паров чистой воды. Активность воды зависит как от самого ее наличия, т.е. от степени высушивания, так и от количества растворенных в ней веществ. Одни микроорганизмы не способны расти на твердых средах, а другие, называемые *ксерофилами*, растут при низких значениях a_w . В природе такие местообитания есть в пустынях и горах. К тому же там активность воды может резко меняться в течение суток (в ночное время выпадает роса и $a_w \approx 1$). В табл. 5 даны примеры микроорганизмов, живущих при разных активностях воды в соответствующих им местообитаниях.

Поскольку микроорганизмы отделены от окружающей среды полупроницаемой мембраной, в гипотонических растворах вода будет стремиться по градиенту концентраций растворенных веществ внутрь клетки, и нужно приложить определенную силу (*осмотическое давление*), чтобы предотвратить поступление воды в клетку. У грамположительных бактерий осмотическое давление может достигать в разбавленных растворах 20 атм и более. В гипертонических растворах имеет место обратное явление («отсасывание» воды из клеток), вызывающее *плазмолиз*.

В общем случае, 1 М раствор любого соединения, если оно не диссоциирует, создает давление 22,4 атм (например, 10 %-й раствор сахарозы (0,29 М) — 6,5 атм, 10 %-й раствор NaCl (1,724 М) — 77 атм). Для развития организмов без клеточной стенки применяют *изотонические растворы*.

Высокие концентрации солей и сахаров давно используются для консервирования пищевых продуктов. В природе высокие концентрации разных солей есть в Мертвом море, соленых озерах, солонцах, содовых озерах, солеварнях. Микроорганизмы, способ-

Таблица 5

Субстраты с разными значениями активности воды и микроорганизмы, обитающие на них

a_w	Материал	Микроорганизмы
1,000	Чистая вода	<i>Caulobacter</i> , <i>Spirillum</i>
0,995	Кровь человека	<i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i>
0,980	Морская вода	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>
0,950	Хлеб	Грамположительные палочки
0,900	Ветчина, кленовый сироп	Грамположительные кокки
0,850	Салими	<i>Saccharomyces rouxii</i>
0,800	Фруктовые джемы	<i>Penicillium</i>
0,750	Соленая рыба, соленые озера	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
0,700—0,600	Кукурузные хлопья, сухофрукты, конфеты	<i>Xeromyces bisporius</i> , ксерофильные грибы

ные существовать в растворах с высокой концентрацией веществ, называются *осмофилами*.

Наиболее изучены такие микроорганизмы по отношению к концентрации NaCl, их называют *галофилами* и подразделяют на группы:

галотолерантные — до 2,0 М NaCl, но могут расти и без соли (*Streptococcus*);

слабогалофильные — 0,2—0,5 М NaCl;

среднегалофильные — 0,5—2,5 М NaCl (морские бактерии);

экстремально галофильные — 2,5—5,2 М NaCl (до насыщенных растворов, галоархеи).

Рассмотрим особенности галофильных микроорганизмов, которые позволяют им существовать при высоких концентрациях

Таблица 6

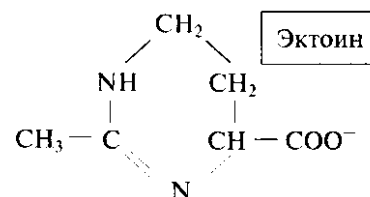
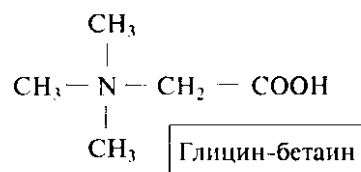
Концентрации некоторых ионов внутри и вне клеток галофильных микроорганизмов (на примере *Halobacterium cutirubrum*)

Ион	Концентрация (М)	
	в среде	в клетке
Na ⁺	3,30	0,80
K ⁺	0,05	5,30
Mg ²⁺	0,13	0,12
Cl ⁻	3,30	3,30

Таблица 7

Совместимые растворители (осмолиты), образуемые микроорганизмами

Организмы	Совместимый растворитель	Минимальная a_w
Бактерии-нефототрофы	Глицин-бетаин, пролин (у грамположительных), глутамат (у грамотрицательных)	0,97—0,90
Пресноводные цианобактерии	Сахароза, трегалоза	0,98
Морские цианобактерии	α -Гликозил-глицерол	0,92
Морские водоросли	Маннитол, пролин, гликозиды, диметилсульфонпропионат	0,92
Цианобактерии соленых озер	Глицин-бетаин	0,90—0,75
Галофильные аноксигенные фототрофные бактерии <i>Ectothiorhodospira</i>	Глицин-бетаин, трегалоза, эктоин	0,90—0,75
Экстремально галофильные археи	KCl (закачивается внутрь с обменом на NaCl)	0,75
<i>Dunaliella</i> (галофильная зеленая водоросль)	Глицерол	0,75
Ксерофильные дрожжи	Глицерол	0,83—0,70
Ксерофильные нитчатые грибы	Глицерол	0,83—0,62



солей. Известно, что многие внутриклеточные компоненты этих микроорганизмов нуждаются в высоких концентрациях Na^+ и K^+ . Например, у *Halobacterium cutirubrum* активность аспартаттранскарбамилазы при 3,5 М NaCl в 4 раза выше, чем при 2 М NaCl. Белки галофилов содержат много аспартата и глутамата, т.е. они более «кислые», в белках устанавливаются новые гидрофобные

взаимодействия, приводящие к более плотной упаковке глобул. На поверхности клеток работает механизм «белкового шита» (S-слои), когда наружу экспонируются COOH -группы аминокислот, удерживающие Na^+ . Эти же группы формируют «гидратированную» оболочку клеток за счет электростатического ориентирования диполей воды. Галофилы осуществляют активный транспорт ионов из клетки, таким образом поддерживая некоторый «осмостаз». Данные табл. 6 показывают, что иногда клетки заменяют Na^+ на K^+ .

Удержание воды у галофилов осуществляется путем синтеза совместимых растворителей (осмолитов), нейтральных по отношению к метаболитам клетки. Иногда такие вещества образуются в значительных количествах. Например, *Dunaliella viridis* накапливает глицерол до 30 % от массы клетки. Это свойство применяют для промышленного получения глицерола. Для разных микроорганизмов известны разные совместимые растворители (табл. 7).

Совместимые растворители хорошо удерживают воду, поэтому возможно их применение в косметической промышленности в составе увлажняющих кремов (эктоин из галофильных аноксигенных фототрофов).

В заключение необходимо заметить, что часто невозможно разграничить эффекты, вызванные собственно снижением влажности и наличием высокой концентрации растворенных веществ. Ясно, что эти факторы взаимосвязаны.

Показатель кислотности среды (pH)

Показатель кислотности среды (pH) изменяется от 0 до 14. В кислой среде в водных растворах преобладают ионы гидроксония H_3O^+ , в щелочной — гидроксиды OH^- . Концентрация водородных ионов воздействует на ионное состояние и, следовательно, на доступность для клетки многих метаболитов, так как в некариженном состоянии они легче проникают через мембрану. В табл. 8 представлены субстраты, отражающие всю шкалу pH, и микроорганизмы, способные к активному существованию при таких pH.

По отношению к оптимальным для роста значениям pH микроорганизмы подразделяют на ацидофильные (0—5,5), нейтрофильные (5,5—8,0) и алкалофильные (8,5—11,5). Большинство бактерий и простейших — нейтрофилы, грибы и водоросли, в целом, предпочитают низкие значения pH, цианобактерии растут при высоких pH.

Несмотря на экстремальные значения pH в окружающей среде, значение внутриклеточного pH достаточно постоянно. У растительных клеток реакция цитоплазмы слабокислая (5,0—6,0),

Таблица 8

Распределение групп микроорганизмов в соответствии с кислотностью среды их обитания

Субстрат	pH	Микроорганизмы
Вулканические воды и почвы	0,5 — 1,0	Археи (обычно еще и экстремальные термофилы)
Желудочный сок	1,5	<i>Helicobacter pylori</i>
Лимонный сок	2,0	<i>Cephalosporium</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Acidithiobacillus</i> , <i>Sulfolobus</i> , <i>Thermoplasma</i> , термофильные водоросли (многие используют восстановленные соединения серы)
Шахтные воды	2,0 — 2,5	
Разбавленный уксус	3,0	
Ревень, перенк	3,5	
Кислая почва	4,0	
Томаты	4,5	
Сыр	5,0	
Кислотные дожди	5,3	Большинство микроорганизмов
Квашеная капуста	5,5	
Горох	6,0	
Креветки	6,5	
Чистая вода	7,0	
Морская вода	7,8	Цианобактерии
Щелочные почвы	8,8	
Щелочные озера	10,0	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrobacter</i> , гнилостные бактерии рода <i>Bacillus</i> , пурпурные бактерии рода <i>Ectothiorhodospira</i>
Мыльные растворы	10,5	
Нашатырный спирт	11,0	
Насыщенный раствор извести	12,0	Уробактерии

у животных ~ 7,0. У алкали- и ацидофильных микроорганизмов pH цитоплазмы поддерживается на уровне 7,5. Постоянству внутриклеточного pH способствует малая проницаемость мембраны для протонов. Однако, поскольку протоны все-таки медленно диффундируют по градиенту, клетка использует энергозависимые механизмы выброса протонов. У алкалифильных микроорганизмов

клетка не может использовать протонный градиент для синтеза АТФ, и для запасаания энергии служит электрическая составляющая.

При небольшом закислении бактерии используют антипорт протонов с Na^+ и K^+ . При скачкообразном падении pH включается синтез специальных шаперонов (белков «кислотного шока»). Они предотвращают кислотную денатурацию белков и восстанавливают конформацию уже денатурированных белков.

В процессе развития микроорганизмы могут изменять pH среды, образуя кислые или щелочные продукты. Например, *E. coli* реагирует на повышение кислотности синтезом декарбоксилаз аминокислот. Образующиеся в результате амины подщелачивают среду. Наоборот, повышение pH среды стимулирует синтез деаминаз аминокислот, что ведет к подкислению среды. Такие механизмы есть обычно у pH-толерантных микроорганизмов. Яркий пример регулирования pH среды бактериями — двухфазный процесс ацетоно-бутилового брожения (см. гл. 6).

Температура

Предел жизнеспособности организма определяется наличием жидкой воды. Клетки некоторых микроорганизмов остаются жизнеспособными при минусовых температурах, если к воде добавить антифриз. Так как местообитаний, где создаются экстремально низкотемпературные условия не так много, большинство организмов имеет низкий температурный предел 0 °C. Существовать же (переживать) микроорганизмы могут и при -196 °C (и даже при -273 °C). Поэтому таким глубоким замораживанием часто пользуются для хранения культур под жидким азотом или в лиофилизированном состоянии. Нижние пределы роста по температуре ограничены температурой «застывания» мембраны, когда она теряет свои функции, а верхние — тепловой денатурацией жизненно важных молекул.

К низкотемпературным местам обитания относятся регионы Арктики, Антарктики, тундра, глубины океанов, где температура имеет постоянное значение около +4 °C.

Высокотемпературные места обитания — гейзеры, вулканические источники, горячие источники, «черные курильщики» — выход вулканических горячих газов на разломах земной коры в глубинах океанов, где температура при высоком давлении может достигать +360 °C.

Анализ состава жизненных форм при низких и высоких температурах показывает, что в экстремальных по температуре обитаниях, в целом, преобладают более просто устроенные формы, а из них — прокариоты и нефототрофы.

Таблица 9

Группы микроорганизмов с разными температурными пределами роста

Группа	Температура роста, °C		
	минимальная	оптимальная	максимальная
Психрофилы	-36	< 20	25
Мезофилы	15	25...30	40
Термофилы	40...50	65	70...80
Экстремальные термофилы	50...60	80...110	113

Необходимо отметить, что существуют искусственно созданные экстремальные по температуре места обитания: морозильные камеры, ферментеры, автоклавы.

В табл. 9 приведена классификация микроорганизмов в зависимости от температурных пределов роста.

Кривая зависимости скорости роста от температуры — определенная для каждого организма. При этом действует закон Q_{10} : при возрастании температуры на 10 °C скорость реакции увеличивается в 2—4 раза. При переходе через оптимальную температуру рост существенно замедляется. Распределение микроорганизмов по температуре представлено на рис. 71.

К психрофильным микроорганизмам относят представителей родов *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, дрожжей, мицелиальных грибов, некоторых групп водорослей (в Антарктике найдена *Chlamidomonas nivalis*, растущая при -36 °C!).

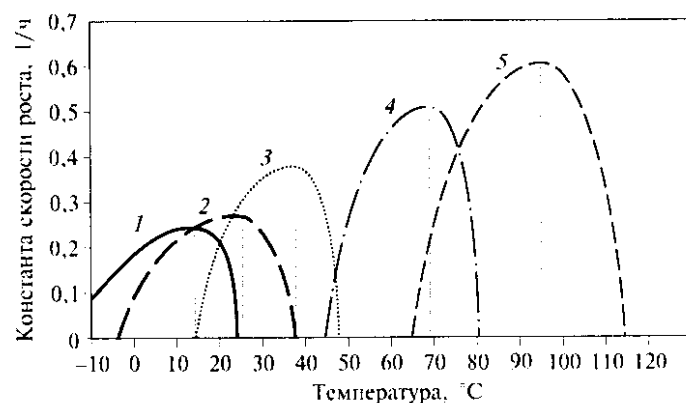


Рис. 71. Температурные пределы микробного роста:

1 — психрофилы; 2 — психротрофы; 3 — мезофилы; 4 — термофилы; 5 — экстремальные термофилы

Таблица 10

Высшие температурные пределы жизнедеятельности разных групп организмов

Организм	Жизнедеятельность до t, °C
Животные	
Водные позвоночные	38
Насекомые	50
Растения	
50	
Эукариотные микроорганизмы	
Простейшие	47
Водоросли	56
<i>Cyanidium caldarium</i>	70
Грибы	58
Прокариотные микроорганизмы	
Фототрофы	84
Хемолитотрофы	113
Гетеротрофы	100
<i>Pyrodicticum occultum</i>	110
<i>Pyrolobus fumarii</i> (нефототрофные археи из «черных курильщиков», где давление достигает 265 атм и вода не закипает до 360 °C)	113

У таких микроорганизмов обнаружен особый состав мембран с пониженной точкой замерзания. Они содержат больше ненасыщенных жирных кислот, короткоцепочечных и разветвленных и меньше циклических жирных кислот. У психрофилов белки менее стабильны при температуре выше 20 °C.

Многие виды микроорганизмов способны расти при 0 °C, хотя их температурный оптимум находится в интервале 20—30 °C. Эти микроорганизмы называются психротрофными (психроактивными, факультативными психрофилами), и именно они обычно ответственны за порчу замороженных продуктов.

Отношение к повышенной температуре роста для разных групп организмов представлено в табл. 10.

У термофилов найдены высокотемпературные стабильные белки, мембранные липиды содержат больше тугоплавких насыщенных жирных кислот и больший процент гликолипидов, все ДНК и РНК — ГЦ-типа, а рибосомы более термостабильны.

В связи с развитием биотехнологии термофильные микроорганизмы представляют особый интерес. Во-первых, при высокотем-

пературном культивировании уменьшается вероятность заражения, во-вторых, термофилы значительно быстрее растут, причем среди термофилов есть автотрофные микроорганизмы, что позволяет использовать очень простые среды. В-третьих, термофилы — источник термостабильных ферментов. Например, термофильный микроорганизм *Thermus aquaticus*, выделенный из горячих источников Йеллоустонского национального парка и растущий при температуре +70 °С, образует полимеразу (*Taq*-полимеразу), обладающую значительной термостабильностью и высокой скоростью реакции.

Устойчивость микроорганизмов к низким и высоким температурам ставит вопрос о специальных методах стерилизации и хранения продуктов.

Гидростатическое давление

Большинство микроорганизмов, живущих на поверхности земли или воды, не подвергается существенным изменениям давления и растет при давлении около 1 атм. Но есть места, где давление значительно отличается от атмосферного. Показано, что клетки микроорганизмов могут выдерживать глубокий вакуум (10^{-10} — 10^{-12} атм), правда, это не активно жизнеспособные клетки, а споры. Для *Bacillus cereus* и *E. coli* обнаружено, что они лучше растут при давлении ниже атмосферного.

Повышенное давление, кроме искусственных систем типа автоклавов, в природе наблюдается в глубоких нефтяных скважинах (как правило, с высоким содержанием серы) и в глубинных зонах океанов, которые обычно также характеризуются низкими температурами и малым содержанием питательных веществ.

В океанах фотическая зона, куда еще проникает свет, расположена на глубине до 300 м. На глубине до 1 000 м сосредоточена основная биологическая активность (99 %), а в остальных 75 % водной толщи наблюдается всего 1 % биологической активности.

По отношению к высокому давлению микроорганизмы подразделяются на:

1) *пьезочувствительные* (барочувствительные) — организмы (обычно с газовыми вакуолями), которые при повышении давления перестают расти;

2) *пьезотолерантные* (баротолерантные), выдерживающие до 400 атм, но способные расти и при обычном давлении;

3) *пьезофильные* (барофильные), нуждающиеся для роста в повышенном давлении. Умеренные барофилы выдерживают давление до 850 атм, а экстремальные — свыше 1 000 атм. Работа с такими микроорганизмами требует осторожности при взятии и доставке проб в лабораторию и очень дорогостоящего оборудова-

ния. При этом необходимо решить две проблемы — сохранить облигатно барофильных представителей при подъеме с глубины при соответствующем изменении давления и не заразить глубинные пробы микроорганизмами из вышележащих слоев воды. На рис. 72 представлена физиологическая активность разных по отношению к давлению групп микроорганизмов.

При повышении гидростатического давления происходит ряд изменений в протекании биологических процессов. Замедляются реакции, приводящие к увеличению объема (например, брожения с образованием газообразных продуктов). Наоборот, усиливаются реакции поглощения газов. Химическое равновесие сдвигается в сторону субстратов реакции. При повышенном давлении происходят денатурация биологических полимеров и диссоциация сложных агрегатов клеток. Клетки после деления не расходятся (образуются филаменты). При давлении выше 1 атм спадаются газовые вакуоли, определяющие плавучесть водных микроорганизмов. В целом у прокариот энергетические процессы преобладают над биосинтетическими.

Микроорганизмы обнаружены в самом глубоком месте Мирового океана — Марианской впадине при давлении ~1 016 атм. Самое высокое искусственно созданное давление, при котором еще сохраняются микроорганизмы, — 1 400 атм. Дальнейшее его повышение ведет к деструкции органических молекул.

Ярким примером сочетания экстремальных значений нескольких факторов является уникальное сообщество, основанное на хемолитоавтотрофии, так называемые «*черные курильщики*». Это разломы на дне океанов, из которых выходят очень горячие вул-

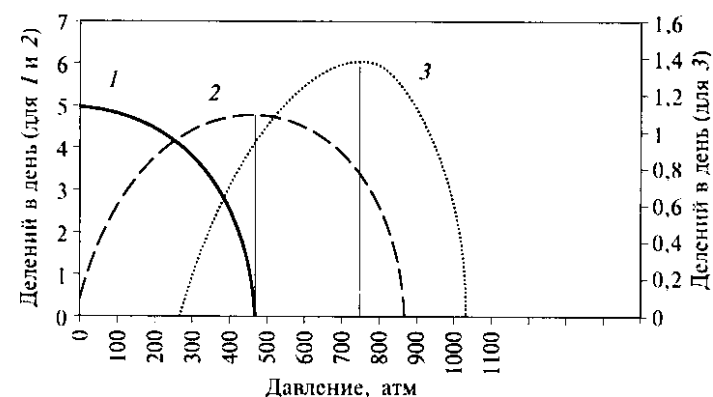


Рис. 72. Группы микроорганизмов, выделяемые по отношению к гидростатическому давлению:

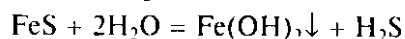
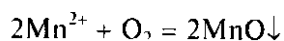
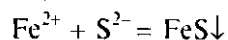
1 — пьезотолерантные; 2 — умеренные пьезофилы; 3 — экстремальные пьезофилы

Таблица 11

**Физиологические группы микроорганизмов сообщества
«черных курильщиков»**

Организмы	Донор электронов	Акцептор электронов
Серуокисляющие	HS^- , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	O_2 , NO_3^-
Нитрификаторы	NH_4^+ , NO_2^-	O_2
Серу- и сульфатредуцирующие	H_2	S^0 , SO_4^{2-}
Метаногены	H_2	CO_2
Гомоацетогены	H_2 , CO	CO_2
Водородокисляющие	H_2	O_2 , NO_3^-
Железо- и марганецокисляющие	Fe^{2+} , Mn^{2+}	O_2
Метилотрофы	CH_4	O_2
Карбоксидобактерии	CO	O_2

канические газы и вода. Там большое количество сероводорода, градиент температур от 360 до 6 °С, давление до 265 атм и нет света. «Черные курильщики» получили свое название из-за клубящегося черного осадка, образующегося в следующих химических реакциях:



В таких местообитаниях представлено несколько физиологических групп микроорганизмов (табл. 11).

В этом сообществе довольно высокая первичная продукция органического вещества, на основе которого существуют вторичные консументы: амфиподы, голотурнии, креветки.

Наличие кислорода

По своему отношению к кислороду все микроорганизмы подразделяются на две большие группы: *аэробы*, растущие в присутствии O_2 , и *анаэробы*, способные расти в его отсутствие. На самом деле, отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду значительно сложнее (табл. 12).

Особенности культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов подробно рассматриваются на практических занятиях. В целом следует сказать, что для аэробных микроорганизмов создают условия, когда имеется максимальная поверхность контакта

Таблица 12

Отношение микроорганизмов к молекулярному кислороду

Группа микроорганизмов	Отношение к кислороду	Тип метаболизма	Пример	Место обитания
Аэробы				
Облигатные	Требуют	Аэробное дыхание	<i>Micrococcus luteus</i>	Кожа, пыль
Факультативные	Не требуют, но растут лучше	Аэробное или анаэробное дыхание или брожение	<i>E. coli</i>	Толстый кишечник
Микроаэрофилы	Требуют, но в концентрации ниже атмосферной	Аэробное дыхание	<i>Spirillum volutans</i> , <i>Beggiatoa</i> spp.	Озерная вода
Анаэробы				
Аэротолерантные	Не требуют, рост не стимулирует	Брожение	<i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>S. lactis</i>	Верхние дыхательные пути, молочные продукты
Облигатные	Угнетает рост или приводит к гибели	Брожение и анаэробное дыхание	Метаногены, сульфидогены, ацетогены	Илы, болота, метантенки

среды и газовой фазы, так как растворимость O_2 в воде невелика (при 20 °С — 6,2 мг/л). Это выращивание в тонком слое среды, различное перемешивание, барботирование и т.д. Для анаэробов, наоборот, важно кислород из среды удалить и в дальнейшем поддерживать анаэробные условия.

Все типы отношения к кислороду найдены среди бактерий и простейших. Грибы, в основном, аэробы, но некоторые виды, как правило, дрожжевые анаморфы — факультативные анаэробы. Есть и небольшое количество строго анаэробных видов. Водоросли — почти всегда облигатные аэробы.

Значение кислорода определяется его ролью как: 1) сильного окислителя для некоторых субстратов, например, метана или ароматических соединений с помощью моно- и диоксигеназ; 2) конечного акцептора электронов при осуществлении аэробного дыхания; 3) одного из субстратов, например, при синтезе стероидов у дрожжей. Поэтому в анаэробных условиях дрожжи растут

Токсическое действие O_2 на микроорганизмы заключается в инаktivации чувствительных к окислению белков (например, сульфидрильных групп нитрогеназы), а также в образовании сверхактивных производных кислорода. Образование активных форм кислорода происходит при работе некоторых ферментов:

$O_2 + 4e^- \rightarrow O^{2-} + O^{2-}$ (оксид-анион) при работе цитохромоксидазы и «голубых» ферментов с Cu^{2+} (тирозиныаза, лакказы);

$O_2 + 2e^- \rightarrow O_2^{2-} (H_2O_2)$ при работе флавиновых ферментов (глюкозооксидазы, оксидазы аминокислот, ксантинооксидазы);

$O_2 + 1e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$ (супероксидрадикал) и $O_2^{\cdot -} + H_2O_2 + H^+ \rightarrow H_2O + O_2 + OH^{\cdot}$ (гидроксиладикал) при работе альдегидоксидазы, НАДН-оксидазы.

Наиболее часто образующиеся *перекисный анион* и *супероксид-радикал* удаляются специальными ферментами. *Каталаза* разлагает перекись в реакции $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$, а *пероксидаза* — в реакции $\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}_2\text{O}$, где R — окисленный субстрат пероксидазной реакции. Супероксидрадикал удаляется *супероксиддисмутазой* (СОД): $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.

В присутствии света может также образовываться *синглетный кислород*. Под действием света пигмент-фотосенсибилизатор (P) переходит в возбужденное состояние и передает энергию на молекулу кислорода: $P + h\nu \rightarrow P^*$, $P^* + O_2 \rightarrow {}^1O_2$.

Функцию «тушения» синглетного кислорода в клетке выполняют каротиноиды. Именно поэтому нефотосинтезирующие микроорганизмы, растущие на свету, имеют интенсивную желто-оранжевую или красную окраску. Для фототрофов каротиноиды осо-

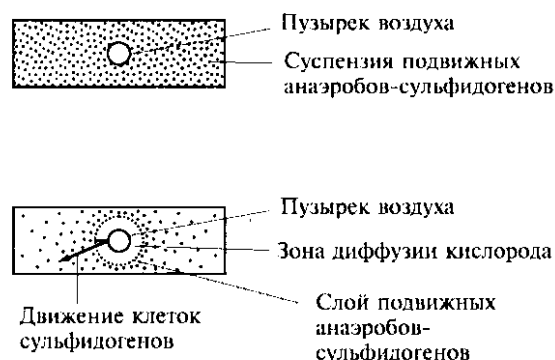


Рис. 73. «Дыхание сульфидогенов» (схема опыта)

Особенно важны, так как пигменты фотосинтеза являются активными фотосенсибилизаторами.

У аэробов и факультативных анаэробов в клетках присутствуют и супероксиддисмутаза, и каталаза, и пероксидаза. У многих облигатных анаэробов этих ферментов нет. Однако у некоторых метаногенов и клостридий находят каталазу и СОД. Они имеют важное значение при существовании организмов в условиях нестабильного анаэробнозиса. Например, кислород попадает с пищей в верхнюю часть кишечника термитов, где обитают анаэробные микроорганизмы. На рисовых полях при их осушении ил становится аэробным, однако при затоплении и восстановлении анаэробнозиса метаногенез начинается без лаг-фазы. Это свидетельствует о том, что метаногены какое-то время способны выдерживать аэробные условия.

Сульфидогены (сульфатредукторы), использующие водород, способны активно бороться с кислородом, осуществляя «дыхание сульфидогенов» (рис. 73). Исследование проводили в плоских анаэробных проточных капиллярах Перфильева. Если к суспензии подвижных анаэробов добавляли пузырек воздуха, то клетки через некоторое время выстраивались на границе зоны диффузии кислорода, образуя вокруг пузырька воздуха на некотором удалении «сферу» из клеток. Было заметно, что клетки входили в аэробную зону, поворачивали и уплывали обратно. Размер пузырька воздуха постепенно уменьшался, т.е. анаэробы активно поглощали кислород. При этом реакция «гремячего газа» ($H_2 + O_2 \rightarrow H_2O$) проходила в системе: гидрогеназа (поглощающая) + цитохром c_3 при наличии молекулярного водорода.

Необходимо отметить, что и у аэробов есть ферменты, чувствительные к кислороду (например, нитрогеназа). В таких случаях в клетках имеются различные способы защиты (например, клубеньки — у *Rhizobium*, капсулы — у *Azotobacter*, гетероцисты без фотосистемы II — у цианобактерий).

Несмотря на токсичность кислорода для облигатных анаэробов, эти микроорганизмы могут существовать в постоянно аэробных местообитаниях, но в сообществах с аэробными или факультативно анаэробными организмами, которые поглощают O_2 . Примерами таких сообществ являются циано-бактериальные маты, где верхний слой аэробный и кислородный, а нижний — анаэробный; различные гранулированные осадки, где во внутренней части создаются анаэробные условия; микробиота ротовой полости, где облигатно анаэробный *Bacteroides gingivalis* живет в отложениях зубного камня.

Показателем наличия кислорода в среде может служить окислительно-восстановительный потенциал Eh, который меняется от -300 до +800 мВ. Чем больше его отрицательное значение, тем больше восстановлена среда (анаэробные условия).

Радиация

Электромагнитные излучения подразделяются в зависимости от длины волны на ионизирующее излучение (γ - и рентгеновские лучи с $\lambda < 200$ нм), ультрафиолетовое излучение, видимую область, инфракрасное излучение и радиоволны. По характеру действия излучения делятся на: 1) оказывающие физиологическое действие; 2) оказывающие летальное и мутагенное действие; 3) оказывающие тепловое и механическое действие.

Физиологическое действие оказывают ближний ультрафиолет, видимый свет и инфракрасные лучи (350—400—800—1100 нм). Это прежде всего *фотосинтез* — процесс конверсии солнечной энергии в химическую. Разные фототрофные микроорганизмы поглощают свет различной длины волны. Пределы используемого света определяются, с одной стороны, необходимостью наличия энергии для фотохимических реакций, а с другой — необходимостью предотвращения деструкции пигментов. Электромагнитные волны важны для проявления фототаксиса. Существуют фотозависимые синтезы и у нефотосинтезирующих микроорганизмов (например, образование каротиноидов у микобактерий). У нефототрофных микроорганизмов акцепторами света считают также порфирины и флавины.

Однако не следует забывать, что свет таких длин волн не всегда оказывает положительное влияние. Под действием инфракрасных лучей может происходить перегрев клетки, а видимый свет в аэробных условиях приводит к образованию синглетного кислорода, что вызывает фотоокисление клеточных ферментов. В качестве защиты микроорганизмы синтезируют каротиноиды, служащие «тушителями» синглетного кислорода.

Ультрафиолет в зависимости от длины волны и дозы может вызывать как летальный, так и мутагенный эффект. При этом наблюдается повреждение прежде всего молекул ДНК (особенно при $\lambda = 260$ нм). В молекуле возникают тиминовые димеры, ингибирующие репликацию. Эти повреждения могут быть устранены двумя путями: *фотореактивацией* и *темновой репарацией*. В первом случае на поврежденное место «садится» фермент, активируемый синим (видимым) светом, и исправляет структуру ДНК, устраняя связи между тиминовыми основаниями в димерах. Во втором случае свет не нужен, работают ферменты эндонуклеаза (вырезает поврежденный участок), полимераза (синтезирует правильную структуру по комплементарной цепи) и лигаза (сшивает синтезированные последовательности).

Ультрафиолет с $\lambda = 325$ —400 нм также вреден для микроорганизмов, поскольку наряду с образованием тиминовых димеров происходит разрушение триптофана и образуются его токсичные фотопродукты, которые действуют как химические мутагены.

Ионизирующее излучение представлено очень короткими волнами с высокой энергией. Низкие уровни такого излучения могут вызывать у микроорганизмов мутации, а высокие почти всегда приводят к гибели. Следствием ионизирующего облучения являются разрывы водородных связей, окисление двойных связей, разрушение кольцевых структур, полимеризация некоторых молекул. Присутствие кислорода усиливает эти эффекты, возможно, из-за генерации гидроксил-радикалов ($\text{OH}^\bullet$). Но главная причина гибели, конечно, деструкция ДНК.

Микроорганизмы весьма существенно различаются по устойчивости к радиации. Есть микроорганизмы, выделенные из облученных продуктов и из воды атомных реакторов (*Deinococcus radiodurans*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Boda marina* — жгутиковое простейшее). Устойчивость, по-видимому, связана с высокой эффективностью репарационных систем. Однако для большинства микроорганизмов ультрафиолетовое и ионизирующее излучения в определенных дозах губительны, поэтому такие излучения можно использовать при стерилизации. При этом следует помнить о возможности появления устойчивых к облучению форм. В свете этих данных перенесение микроорганизмов (особенно спор) через космическое пространство не кажется таким уж невероятным.

В заключение следует отметить, что в природе микроорганизмы испытывают на себе влияние не одного, а множества факторов (например, в «черных курильщиках» — температуры, давления, высокого содержания сульфида), т.е. необходимо учитывать и взаимодействие факторов друг с другом.

Контрольные вопросы

1. Назовите особенности микроорганизмов-галофилов.
2. Как ацидо- и алкалофильные микроорганизмы приспособились к существованию при экстремальных значениях pH среды?
3. На какие группы делятся микроорганизмы по отношению к температурным пределам и чем они различаются между собой?
4. Почему экстремальные барофилы характеризуются пониженной физиологической активностью?
5. Чем обусловлено токсическое действие O_2 на микроорганизмы? Приведите способы защиты от активных форм кислорода.
6. Какое действие оказывают излучения с разной длиной волны на микроорганизмы?
7. Приведите пример природного местообитания микроорганизмов, в котором сочетаются экстремальные значения многих физико-химических факторов среды.

Проникновение веществ в клетку

Первой стадией метаболизма того или иного вещества является его проникновение в клетку. У большинства микроорганизмов в клетку проникают вещества, растворенные в воде. Поглощение нерастворенных в воде веществ имеется только у эукариот, и среди микроорганизмов к такому процессу способны простейшие. Процесс носит название *эндоцитоз* (рис. 74). При *фагоцитозе* поглощаются твердые вещества, при *пиноцитозе* — жидкости. Экскреция продуктов может происходить в обратном порядке. У высших животных эндоцитоз сохранился в виде защитной функции (у фагоцитов), а экзоцитоз — при экскреции гормонов.

У прокариот клеточная стенка и ЦПМ являются существенным препятствием для высокомолекулярных веществ. Поэтому такие соединения сначала расщепляются вне клетки на олиго- и мономеры соответствующими гидролазами. У грамотрицательных бактерий эти ферменты либо расположены на наружной стороне ЦПМ, либо локализованы в периплазматическом пространстве. Высокомолекулярные вещества проникают в их периплазму с помощью белков-поринов в наружной (внешней) мембране.

У микроорганизмов, которые часто живут в бедных средах (разбавленных растворах), существует несколько принципиально различных способов поступления веществ в клетку. Все незаряженные молекулы (H_2O , газы) могут поступать в клетку путем обычной диффузии (*пассивной диффузии*). Это проникновение веществ в клетку по градиенту концентрации, не требующее затрат энергии и происходящее до тех пор, пока не наступит равновесие между содержанием данного вещества вне и внутри клетки. Этот процесс идет с невысокой скоростью.

Скорость значительно увеличивается при участии специфических, часто индуцибельных, белков-переносчиков (*пермеаз*), и тогда процесс называют *облегченной диффузией*. В этом случае также процесс продолжается до тех пор, пока есть градиент концентраций и не затрачивается метаболическая энергия. Механизм действия пермеаз пока неясен. Это белки, расположенные либо поперек мембраны, либо способные передвигаться через мембрану

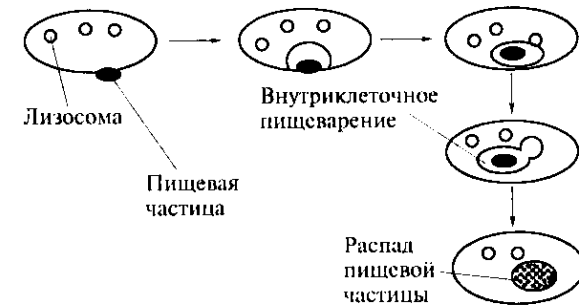


Рис. 74. Эндоцитоз

как в свободном, так и в связанном с субстратом состоянии. Остается неясным, что в этом случае заставляет пермеазу освобождать субстрат на внутренней стороне мембраны. Эукариотические клетки путем облегченной диффузии транспортируют различные сахара и аминокислоты. У прокариот путем облегченной диффузии переносится глицерол (бактерии кишечной группы). Имеются неспецифические пермеазы для всех катионов. Особый случай — перенос катионов железа. В аэробных водных растворах Fe^{2+} неустойчив и быстро окисляется до Fe^{3+} . Поэтому для снабжения двухвалентным железом аэробные микроорганизмы имеют особые переносчики — *сидерофоры*, которые вне клетки ковалентно привязывают к себе Fe^{3+} , диффундируют через мембрану, где освобождают Fe^{2+} внутри клетки, восстанавливая его (рис. 75). Одними из наиболее распространенных сидерофоров являются *гидроксаматы*. Fe^{3+} имеет высокое сродство к гидроксамату ($10^{-17}M$), поэтому связь очень прочная, а Fe^{2+} к гидроксамату привязан слабо, поэтому после восстановления он легко отщепляется на внутренней стороне мембраны и идет на синтез гемов или железосерных белков. Если Fe^{3+} в среде много, то сидерофор находится на или внутри мембраны, а если мало, то он выделяется во внешнюю среду и как бы концентрирует катионы Fe^{3+} на себя. Надо заметить, что среди анаэробных микроорганизмов сидерофоры находят нечасто, так как в анаэробных условиях нет дефицита Fe^{2+} . Сидерофоры обнаружены и у высших организмов в слюне, крови и слезной жидкости. Здесь они связывают ионы железа, которые становятся недоступными для микроорганизмов, т.е. эти жидкости так предохраняются от заражения.

Экскреция продуктов метаболизма у микроорганизмов, как правило, происходит путем облегченной диффузии.

Механизмы *активного транспорта* позволяют веществам поступать в клетку против градиента концентрации. Такие механизмы требуют затраты метаболической энергии. *Первичный транспорт* — это выброс протонов из клетки с образованием протонного гради-

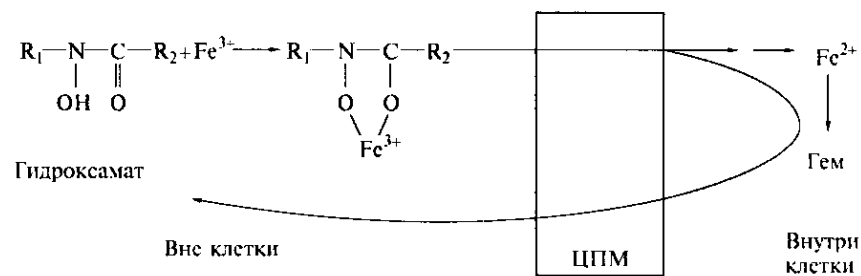


Рис. 75. Перенос ионов железа с помощью сидерофоров-гидроксаматов

снта через цитоплазматическую мембрану. За счет этого трансмембранного градиента протонов и работают все виды *вторичного транспорта*. Протонный градиент в клетке всегда поддерживается на определенном уровне за счет дыхания, фотосинтеза, брожения.

Виды вторичного транспорта представлены на рис. 76. У прокариот с помощью электронейтрального симпорта переносятся аминокислоты и другие органические кислоты, электронейтральный антипорт с протонами приводит к переносу катионов, а электрогенный — к транспорту сахаров и некоторых аминокислот, посредством унипорта происходит выброс соли у галофилов.

Транслокация групп как вид вторичного транспорта отличается от предыдущих тем, что вещество проникает внутрь клетки в модифицированном виде (рис. 77). Так транспортируются сахара, пурины и пиримидины у про- и эукариот. Перенос фосфатной группы на сахара осуществляется от фосфоенолпирувата (ФЕП), а на пурины и пиримидины — от фосфорибозилпирофосфата

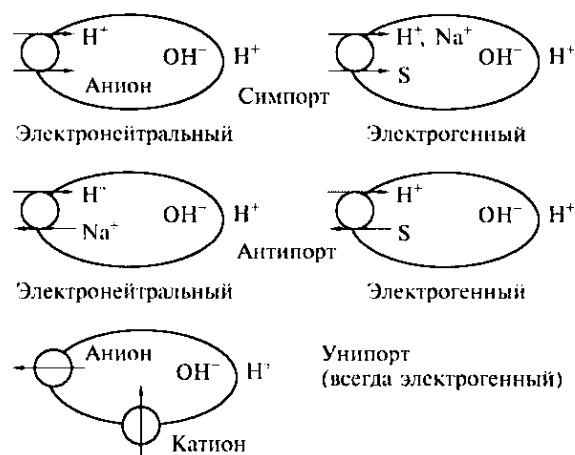


Рис. 76. Виды вторичного транспорта

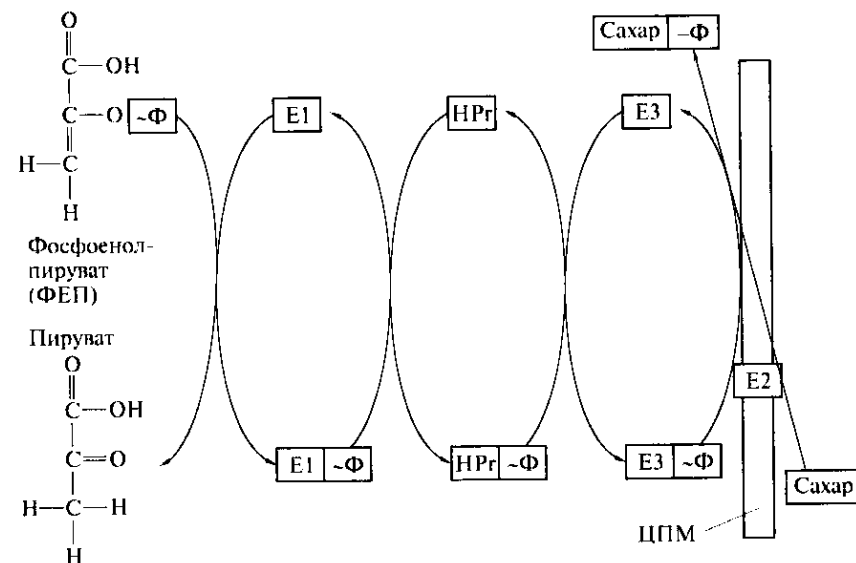


Рис. 77. Транслокация групп (E1, E2, E3 — ферменты, HPr — низкомолекулярный белок)

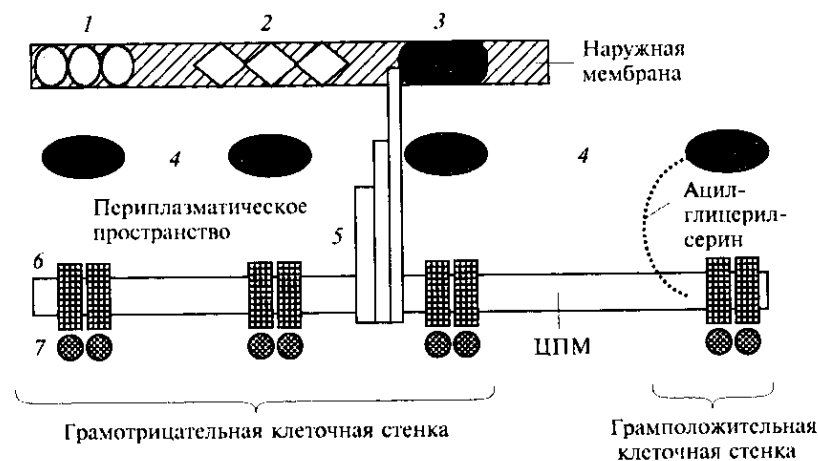


Рис. 78. Схема организации транспортных систем, зависимых от экстрацеллюлярных связывающих белков:

1 — неспецифический тримерный порин; 2 — специфический тримерный порин; 3 — рецептор внешней мембраны с высоким сродством; 4 — растворимые связывающие белки; 5 — комплекс для трансдукции энергии; 6 — интегральные мембранные белки (гомо- или гетеродимеры); 7 — АТФ-связывающие субъединицы (гомо- или гетеродимеры)

(ФРПФ). E1 и HPr — неспецифичны, а E2 и E3 — специфичны для каждого субстрата и, как правило, индуцибельны.

У граммотрицательных микроорганизмов из-за наличия наружной мембраны в оболочке существуют более сложные смешанные механизмы с участием *связывающих белков*, локализованных в периплазматическом пространстве. Связывающие белки высокоспецифичны, образуют комплекс с субстратом и переносят его через периплазматическое пространство на соответствующие пермеазы, которые с затратой энергии транспортируют субстрат внутрь клетки. Обычно используется энергия в форме АТФ, но могут участвовать и другие соединения с макроэргическими связями. Транспортные системы с участием связывающих белков имеются и у грамположительных микроорганизмов, но тогда связывающие белки «заякорены» своей N-концевой частью в ЦПМ. Обобщенная схема организации транспортных систем, зависящих от экстрацеллюлярных связывающих белков, представлена на рис. 78.

Известно, что многие микроорганизмы имеют высокоактивные системы выброса ксенобиотиков (и антибиотиков), чем зачастую и объясняется их устойчивость к этим соединениям. Из-за способности микроорганизмов к латеральной передаче генов такая устойчивость быстро распространяется. Поэтому необходимо найти способы эффективного подавления выбрасывающих транспортных систем для поддержания высокой действующей концентрации лекарственного препарата внутри клетки.

Энергетические процессы у микроорганизмов

Основные понятия. Вся совокупность химических реакций в клетке (или *метаболизм*) подчиняется *принципу биохимического единства*, сформулированному голландским микробиологом А. Клейвером, который гласит, что в биохимическом отношении все живые существа на Земле сходны. У них единообразие строительных блоков, единая «энергетическая валюта» (АТФ), универсальный генетический код и в основе своей идентичны главные метаболические пути. Реакции, приводящие к расщеплению и окислению веществ с получением энергии, называются *катаболизмом*; пути, приводящие к синтезу основных сложных веществ, называют *анаболизмом*; промежуточные реакции, перестройки одних веществ в другие называют *амфиболизмом*.

По типу получения энергии все микроорганизмы подразделяют на фототрофы (энергия света) и хемотрофы (энергия химических связей органических или неорганических соединений). Энергия нужна клетке для синтеза различных веществ, для осуществления движения (перемещения в пространстве) и для поглощения веществ из окружающей среды.

АТФ — универсальный переносчик энергии. Большая часть энергетических реакций связана с использованием АТФ — высокоэнергетической молекулы, содержащей две макроэргические связи. Гидролиз 1 М АТФ даст около 32 кДж свободной энергии. Другие соединения с макроэргическими связями — это пироглюкаты (PP_i или ФФ_{ii}), креатинфосфат, ФЕП, ацил-КоА, ГТФ, ЦТФ и т.д. Запасание энергии может также осуществляться в форме полифосфатов. Еще одна форма запасаания энергии — энергизованное состояние мембраны, или *трансмембранный потенциал* ($\Delta\psi_{H+}$), — может обеспечивать процессы проникновения веществ в клетку, таксисы, обратный транспорт ионов и синтез АТФ. Однако сложные органические вещества не могут синтезироваться за счет $\Delta\psi_{H+}$.

Существуют два принципиально разных пути синтеза АТФ в клетке:

1) *субстратное фосфорилирование* — перенос макроэргической связи с интермедиата катаболизма на АДФ в соответствии с реакцией $S \sim \Phi + \text{АДФ} = S + \text{АТФ}$. Необходимо отметить, что для образования такого фосфорилированного промежуточного соединения иногда требуется сначала затратить АТФ, однако в конечном итоге микроорганизм должен получить выигрыш в синтезированной АТФ. К важнейшим реакциям субстратного фосфорилирования относятся:

а) 1,3-дифосфоглицериновая кислота (1,3-диФГК) + АДФ → 3-ФГК + АТФ;

б) ФЕП + АДФ → пируват + АТФ;

в) Ацил-Φ (ацетил-Φ) + АДФ → органическая кислота (ацетат) + АТФ.

Эти реакции осуществляются, как правило, в растворах;

2) *мембранное* (окислительное или фото-) *фосфорилирование* — перенос электронов по электронтранспортной цепи (ЭТЦ). При этом важно, чтобы субстраты окислялись постепенно. Такой способ получения АТФ характерен для аэробных условий, а также при анаэробном дыхании. Общий вид схемы ЭТЦ представлен на рис. 79. В этом случае синтез АТФ осуществляется на мембране.

Синтез богатых энергией соединений, в частности АТФ, происходит за счет высвобождаемой в ходе окислительно-восстановительных реакций свободной энергии. Связь стандартной свободной энергии реакции (ΔG°) и разности стандартных окислительно-восстановительных потенциалов ($\Delta E'_0$) донора и акцептора электронов показывает уравнение

$$\Delta G^\circ = -nF\Delta E'_0,$$

где n — количество перенесенных протонов; F — постоянная Фарадея.

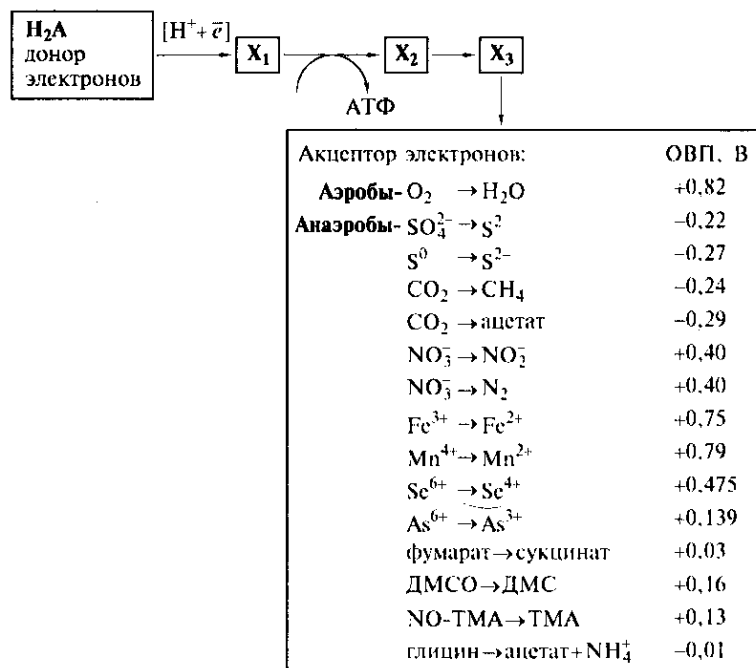


Рис. 79. Схема ЭТЦ (ОВП — окислительно-восстановительный потенциал; ДМСО — диметилсульфоксид; ДМС — диметилсульфид; ТМА — триметиламин)

ЭТЦ и ее компоненты. Для работы ЭТЦ необходимо, чтобы переносчики располагались в мембране асимметрично и последовательно, в соответствии со своими окислительно-восстановительными потенциалами. Компонентами дыхательной цепи являются ферментные белки, содержащие связанные с ними коферменты или простетические группы. *Коферментами* называют низкомолекулярные вещества, которые передают субстрат от одного ферментного белка другому, отделяясь от белковой части. *Простетические группы* — тоже небольшие молекулы, но они не отделяются от белка во время присоединения и переноса субстрата. Многие такие соединения относятся к витаминам (табл. 13), поэтому если микроорганизм не способен сам синтезировать некоторые из них, то это вещество или его предшественник необходимо добавлять в питательную среду.

В табл. 14 приведены окислительно-восстановительные потенциалы метаболически наиболее важных пар.

Тогда в соответствии со своими потенциалами переносчики расположатся так: $НАД^+ \rightarrow$ флавины $\rightarrow$ хиноны $\rightarrow$ цит. $b \rightarrow$ цит. $c \rightarrow$ цит. $a(o) \rightarrow O_2$.

Таблица 13

Коферменты или простетические группы — переносчики и их отношение к витаминам

Кофермент или простетическая группа	Что переносит	Витамин
НАД(Ф) ⁺	Водород, $\bar{e}$	Никотиновая кислота
ФМН, ФАД	Водород, $\bar{e}$	Рибофлавин
Убихинон	Водород, $\bar{e}$	Q ₁₀
Цитохромы	$\bar{e}$	Производные гема
Биотин	Карбоксильные группы	Биотин
Пиридоксальфосфат	Аминогруппы	Пиридоксин
Тетрагидрофолиевая кислота	Формильные группы	Фолиевая кислота, <i>para</i> -аминобензойная кислота
Кофермент А	Ацильные группы	Пантотеновая кислота
Липоевая кислота	Ацильные группы и водород	Липоевая кислота
Кофермент В ₁₂	Карбоксильные группы (перемещение внутри молекулы), метильные группы	Кобаламин
Тиаминпирофосфат	Альдегидные группы	Тиамин

Таблица 14

Окислительно-восстановительные потенциалы наиболее важных пар

Пара	Eh, мВ
CO ₂ /формат	-432
2H ⁺ /H ₂	-420
Ферредоксин окисл./восст.	-390
НАД(Ф) ⁺ /НАД(Ф)Н	-320
ФАД/ФАДН	-220
ФМН _{окисл.} /ФМН _{восст.}	-220
Пируват/лактат	-190
Менахинон окисл./восст.	-74
Убихинон окисл./восст.	+100
Цитохромы <i>b, c, a</i> (окисл. формы) /цитохромы <i>b, c, a</i> (восст. формы)	+70 — +290
O ₂ /H ₂ O	+810

Необходимо отметить, что пиридиннуклеотиды могут служить не только переносчиками электронов и протонов, но и быть *восстановительными эквивалентами* в окислительно-восстановительных реакциях, например, когда углерод входит в реакции анаболизма в более окисленной форме, чем сахара (в виде органических кислот, CO_2).

Переносчики располагаются в мембране асимметрично, по разные стороны мембраны (рис. 80). При переносе электрона одновременно происходит и транслокация протона, который высвобождается на внешней стороне мембраны. Так как мембрана непроницаема для протонов, во внешней среде их становится больше и наводится трансмембранный потенциал, имеющий электрическую и химическую составляющие: $\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\psi + \Delta p\text{H}$ (может быть $\Delta p\text{Na}$). В мембране наряду с переносчиками содержится АТФазная система, образующая АТФ за счет «закачивания» протонов («протонная помпа»). Часть трансмембранного потенциала расходуется непосредственно на транспорт веществ в клетку и движение жгутиков. С другой стороны, при необходимости АТФазная система может с затратой энергии наводить трансмембранный потенциал.

Отличие ЭТЦ при анаэробном дыхании заключается в том, что конечным акцептором электронов могут служить неорганические или органические соединения, но не кислород. В этом случае разность потенциалов между донором и акцептором электронов меньше и меньше мест сопряжения, где энергии достаточно для образования макроэнергетической связи («цепь короче»). Также цепь укорачивается при использовании в качестве донора электронов такого субстрата, окислительно-восстановительный потенциал которого более положителен, чем у пиридиннуклеотидов (например, при окислении сукцината сукцинатдегидрогеназа пе-

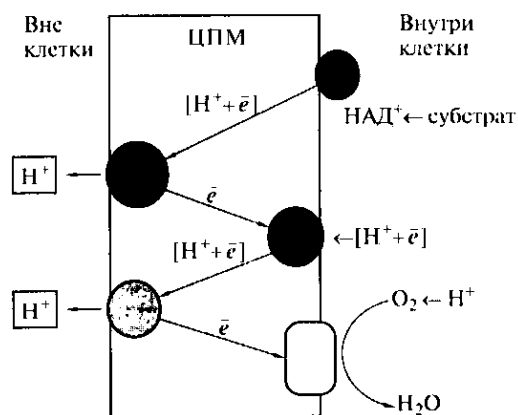


Рис. 80. Схема расположения переносчиков в ЦПМ

Классификация ферментов

Номер класса	Класс ферментов	Катализируемые реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов (окислительно-восстановительные реакции)
2	Трансферазы	Перенос групп между молекулами
3	Гидролазы	Реакции гидролиза (перенос функциональных групп на молекулу воды)
4	Лиазы	Удаление групп и формирование двойных связей или прибавление групп к двойным связям
5	Изомеразы	Перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм
6	Лигазы	Объединение двух молекул с использованием энергии АТФ (реакции конденсации с образованием C—C-, C—S-, C—O-, C—N-связей)

редает электроны на флавины). Тогда для синтеза восстановительных эквивалентов необходим обратный перенос электронов с затратой энергии АТФ.

Классификация и номенклатура ферментов. Для большого числа известных ферментов в настоящее время используется *классификация IUB* (International Union of Biochemistry), согласно которой ферменты группируются в шесть классов. Класс делится на подклассы, а подкласс — на субподклассы. Каждый фермент имеет порядковый номер внутри своего субподкласса, поэтому его можно охарактеризовать соответствующими четырьмя цифрами [например, сукцинатдегидрогеназа будет обозначена как КФ 1.3.99.1 (КФ — классификация ферментов)]. В табл. 15 представлены классы ферментов и осуществляемые ими реакции.

Для большинства ферментов принята *систематическая номенклатура* (правила наименования). Так, для оксидоредуктаз название складывается из названия донора электронов, двосточия, названия акцептора электронов и названия класса через дефис (например, алкоголь:НАД⁺-оксидоредуктаза). В то же время допускается использование упрощенных или исторически сложившихся названий.

Общая схема катаболизма микроорганизмов

Пути использования сахаров. Обычно центральным амфиболитом считают глюкозу, так как она первая из органических веществ

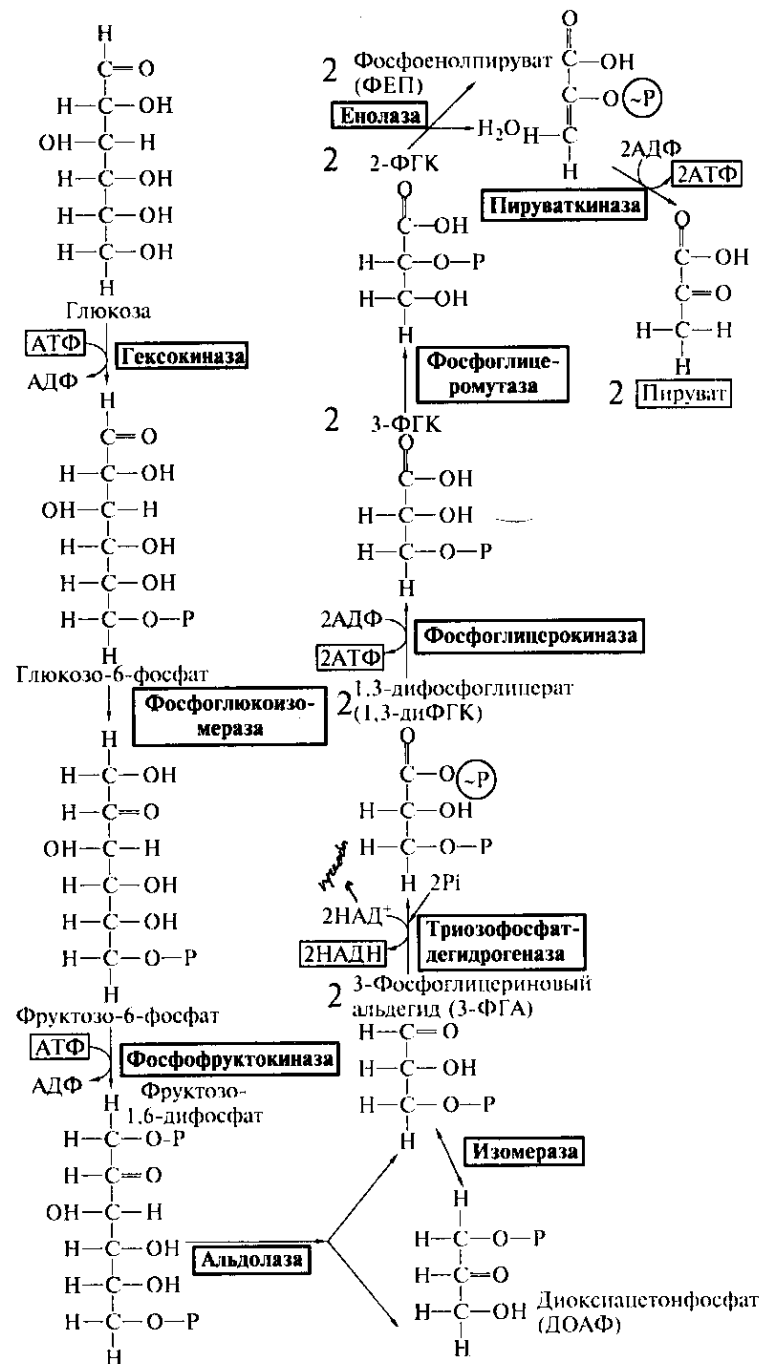


Рис. 81. Гликолиз

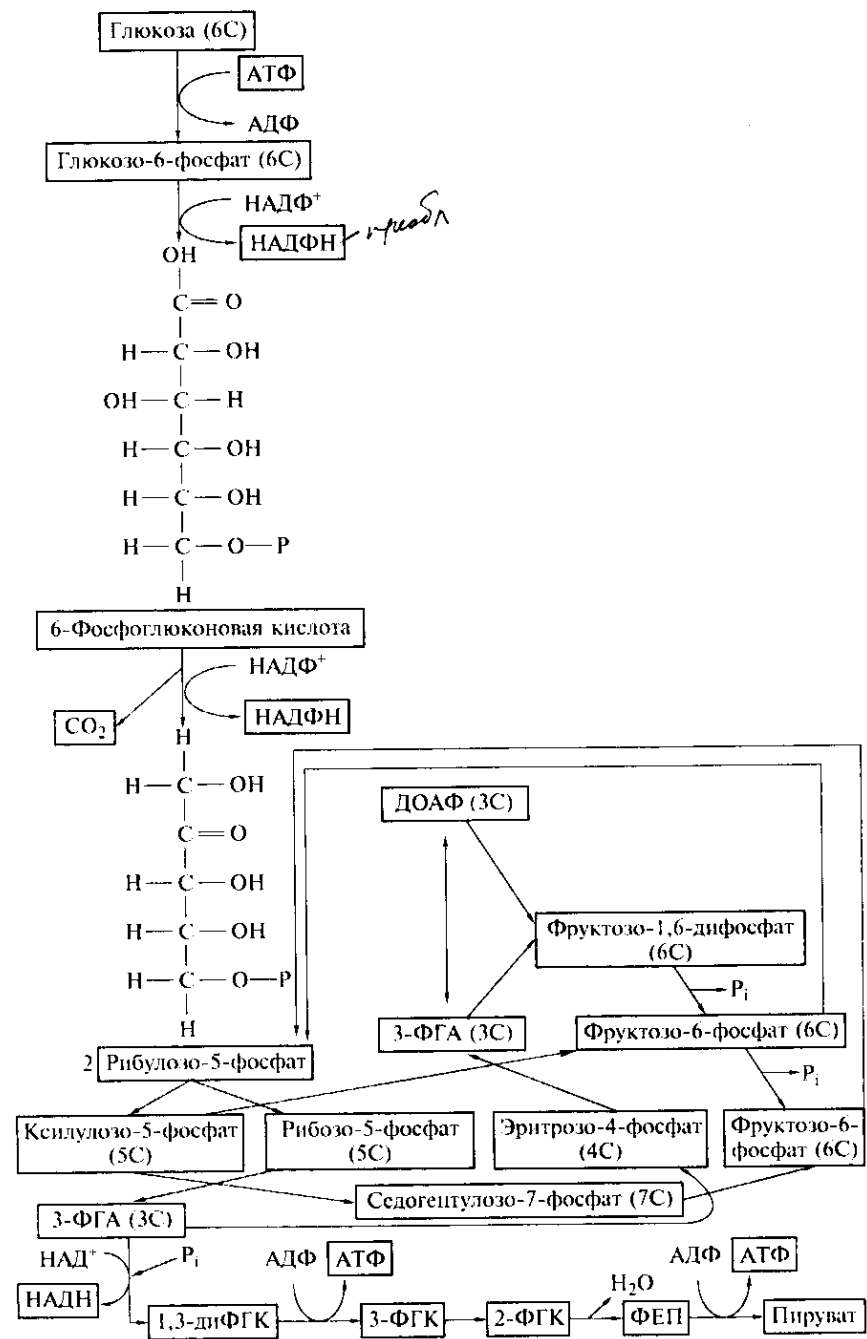


Рис. 82. Пентозофосфатный путь

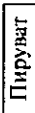


Рис. 83. КДФГ-путь

образуется при фотосинтезе и может вступать в катаболизм для получения энергии. Есть три основных пути окисления глюкозы — гликолиз, пентозофосфатный и кетодезоксифосфоглюконатный (КДФГ-путь). Гликолиз, или путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, встречается как у прокариот, так и у эукариот. В нем из молекулы глюкозы образуются две молекулы пирувата, синтезируется 2 НАДН и 2 АТФ (рис. 81). Пентозофосфатный путь (гексозомонофосфатный, или путь Варбурга — Диккенса — Хорекера) распространен у растений, а у микроорганизмов играет вспомогательную роль. В результате его реакций образуются пентозы для последующих синтезов, пируват, три молекулы пиридиннуклеотидов и 2 АТФ (рис. 82).

КДФГ-путь, или путь Эннера — Дудорова, присущ только микроорганизмам и приводит к образованию из одной молекулы глюкозы двух молекул пирувата, 1 АТФ и 2 восстановленных пиридиннуклеотида (рис. 83).

Преобразования пирувата. Далее пируват преобразуется в «активированную уксусную кислоту» (ацетил-КоА) различными способами. У микроорганизмов обнаружены все реакции преобразования пирувата:

- пируват + КоА + НАД⁺ → ацетил-КоА + НАДН + СО₂ + Н⁺. Реакция катализируется пируватдегидрогеназным комплексом с тиамином (витамином В₁) в качестве кофактора. Такой комплекс обнаружен у аэробных микроорганизмов;

- пируват + КоА + Фд → ацетил-КоА + ФдН₂ + СО₂. Реакция катализируется пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой и характерна для анаэробов (например, клостридий). При этом ФдН₂ при участии гидрогеназы (выделяющей) образует молекулярный водород;

- пируват + КоА → ацетил-КоА + формиат. Здесь участвует пируват:формиатлиаза, которая характерна для Enterobacteriaceae, фотобактерий и некоторых фототрофов;

- пируват → ацетальдегид + СО₂ (реакция преобразования пирувата с помощью пируватдекарбоксилазы характерна для дрожжей).

Полученный ацетил-КоА поступает в окислительные циклы или участвует в процессах брожения.

Цикл трикарбоновых кислот. У дышащих микроорганизмов основным окислительным циклом является цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), или цикл Кребса (рис. 84). За один оборот цикла из ацетил-КоА образуется 2 молекулы углекислоты, 8 восстановительных эквивалентов и 1 АТФ. Как правило, коферменты в этом случае передают водород в ЭТЦ, где и происходит синтез АТФ. ЦТК выполняет функцию не только конечного окисления питательных веществ, но и обеспечивает организм многочисленными предшественниками для процессов биосинтеза. Для восполнения промежуточных продуктов цикла Кребса, отведенных в анаболические

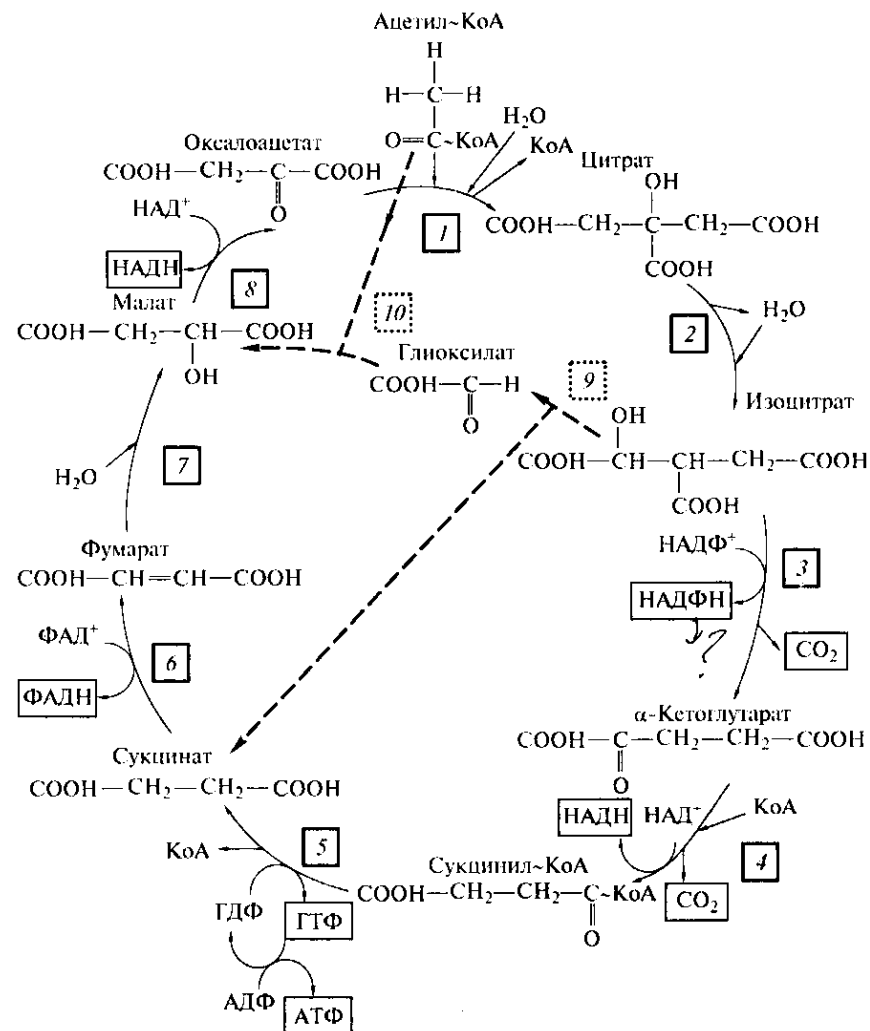


Рис. 84. Цикл Кребса с глиоксилатным шунтом (показан штриховой линией).

Ферменты: 1 — цитратсинтаза; 2 — аконитаза; 3 — изоцитратдегидрогеназа; 4 — α-кетоглутаратдегидрогеназа; 5 — сукцинаттиокиназа; 6 — сукцинатдегидрогеназа; 7 — фумараза; 8 — малатдегидрогеназа; 9 — изоцитратлиаза; 10 — малатсинтаза

реакции, служат *анаплеротические реакции*. Наиболее распространенным является *глиоксилатный шунт* (см. рис. 84). При росте на средах с органическими кислотами и другими углеродными соединениями (не сахарами) дополнительные реакции требуются не только для обеспечения работы ЦТК, но и для синтеза проме-

жуточных продуктов глюконеогенеза. Некоторые шунтирующие реакции будут рассмотрены далее (см. гл. 6, 8).

Особенности метаболизма анаэробных микроорганизмов. Для большинства анаэробно живущих микроорганизмов возможности обеспечения энергией исчерпываются ее получением при фосфорилировании на уровне субстрата. Дальнейшие этапы и циклы расщеплений играют роль только поставщиков предшественников для биосинтеза. При этом для многих анаэробных микроорганизмов для поддержания окислительно-восстановительного равновесия встает задача избавиться от восстановителей. Это часто происходит путем выделения молекулярного водорода с участием следующих ферментов:

- пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза образует восстановленный ферредоксин, а гидрогеназа (выделяющая) катализирует реакцию $\text{ФдН}_2 \rightarrow \text{Фд} + \text{H}_2\uparrow$;

- пируват:формиатлиаза приводит к образованию муравьиной кислоты, а комплекс гидрогеназы (выделяющей) и формиатдегидрогеназы (гидрогеназы) разлагает формиат на молекулярный водород и углекислоту: $\text{НСООН} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$;

- под действием дегидрогеназы и гидрогеназы (выделяющей) происходят следующие реакции: 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) + $\text{Ф}_\text{H} + \text{НАД}^+ \rightarrow 1,3\text{-диФГК} + \text{НАДН} + \text{H}^+$; $\text{НАДН} + \text{H}^+ + \text{Фд} \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{ФдН}_2$; $\text{ФдН}_2 \rightarrow \text{Фд} + \text{H}_2$. Такая система работает только при низких значениях ОВП и эффективном удалении молекулярного водорода, поскольку реакция термодинамически невыгодна. Обычно это происходит в экологических нишах, где конечные звенья пищевой цепи представлены метаногенами и/или сульфидогенами, использующими водород.

Брожения

Брожению подвергаются вещества, которые не полностью восстановлены и не полностью окислены. Существует много видов брожений, характерных для тех или иных групп микроорганизмов и приводящих к образованию различных конечных продуктов. Во всех случаях брожение предполагает строгое равновесие процессов окисления и восстановления (пиридиннуклеотиды, восстановленные на одном этапе брожения, впоследствии в том же количестве окисляются на другом). По определению Л. Пастера, брожение — это жизнь без кислорода. В более узком смысле брожение может быть определено как бескислородные превращения пирувата, полученного в реакциях одного из путей преобразования сахаров (гликолиза, пентозофосфатного или КДФГ-пути).

Спиртовое брожение у дрожжей было изучено исторически первым. Дрожжи, как и большинство грибов, осуществляют аэроб-

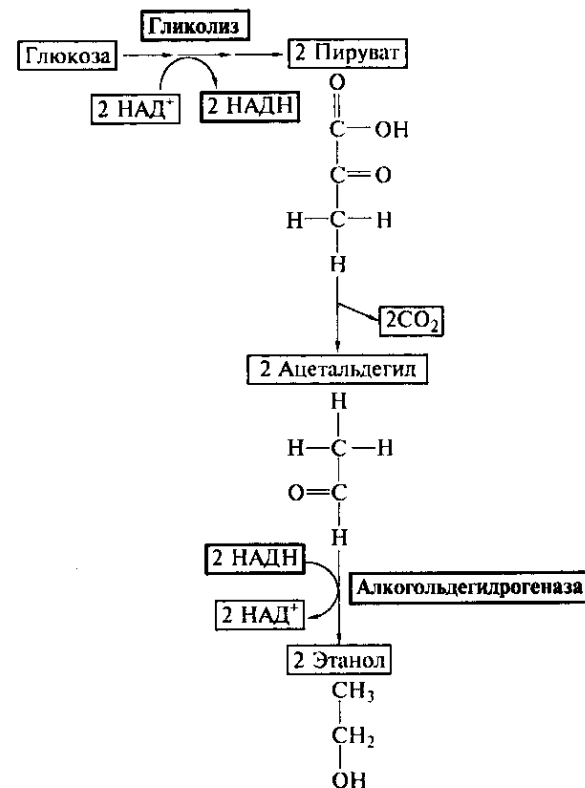
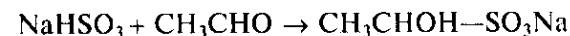


Рис. 85. Спиртовое брожение у дрожжей

ное дыхание, однако в отсутствие кислорода они способны сбраживать углеводы до этанола и углекислоты (рис. 85): $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CO}_2 + 2\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

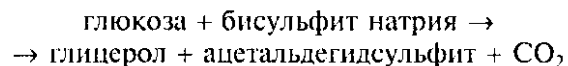
В присутствии кислорода дрожжи переключаются на аэробное дыхание, при котором образуется в 20 раз больше биомассы и синтезируется значительно больше АТФ. Брожение, соответственно, подавляется. Это так называемый *эффект Пастера* — один из классических примеров регуляции обмена веществ.

Изучение дрожжевого спиртового брожения привело к возможности управлять процессом в плане получения измененных продуктов. Карл Нейберг показал, что если к бродящим дрожжам добавлять некоторые химические вещества, то можно изменить состав продуктов брожения. Например, если связывать ацетальдегид бисульфитом



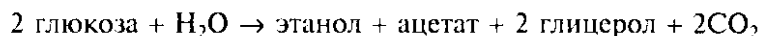
то основным продуктом станет глицерол.

В такой ситуации ацетальдегид не может служить акцептором водорода и эту роль принимает на себя диоксиацетонфосфат (ДОАФ), который восстанавливается и дефосфорилируется до глицерола. Теперь реакция брожения выглядит следующим образом:



Такая модификация известна как *II форма брожения по Нейбергу*. Этот прием успешно используется в биотехнологии для получения глицерола.

При изменении pH среды с помощью NaHCO_3 или Na_2HPO_4 брожение идет по *III форме брожения по Нейбергу*, так как при этом ацетальдегид превращается путем реакции дисмутации в этанол и ацетат, а акцептором водорода опять становится ДОАФ, образуя глицерол:



Нормальное дрожжевое брожение К. Нейберг считал *I формой брожения*.

Следует заметить, что этанол, образуемый дрожжами, не является для них «безразличным» соединением. Известно, что 1–2%-й этанол влияет на мембраны — увеличивается их текучесть, и они перестают поддерживать градиент протонов. Дрожжи относятся к спиротолерантным микроорганизмам — выдерживают 9–12 % по объему этанола. Наиболее экстремальными в этом отношении являются дрожжи расы *sake* (до 18 %). Они используются для приготовления рисовой водки, когда сначала плесневые грибы рода *Aspergillus* образуют амилазу, расщепляющую крахмал риса, а затем дрожжи выбраживают сахара до этанола — так получают саке.

Как отмечалось выше, дрожжи не могут существовать в анаэробных условиях долго: поделившись около шести раз, они останавливаются в росте, так как одна из стадий синтеза их фосфолипидов требует присутствия кислорода.

Только бактерии рода *Sarcina* образуют этанол тем же путем, что и дрожжи. Некоторые бактерии способны осуществлять процесс при 45 °C (дрожжи бродят при температурах до 30 °C и саморазогрев бродящей массы становится для них большой проблемой). Известный алкогольный напиток текилу получают перегонкой сброженного сока агавы — пульке. Из пульке и был выделен подвижный (монотрих) палочковидный микроорганизм *Zymomonas mobilis*, превращающий глюкозу в пируват по КДФГ-пути (рис. 86).

Некоторые клостридии и энтеробактерии проводят брожения, в которых спирт является побочным продуктом (рис. 87). В зависимости от условий набор продуктов брожения сильно варьирует: ацетат, этанол, CO_2 или лактат, CO_2 , этанол (ацетат).

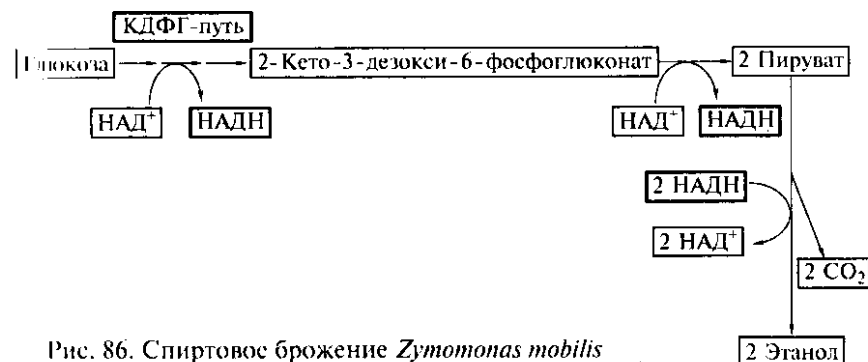


Рис. 86. Спиртовое брожение *Zymomonas mobilis*

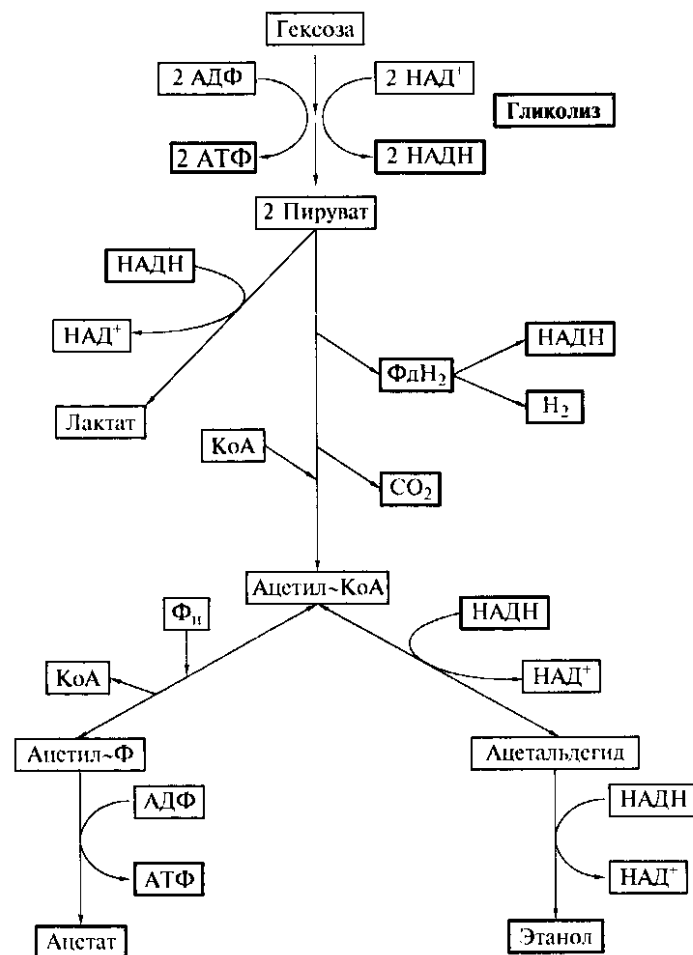


Рис. 87. Спиртовое брожение некоторых энтеробактерий и клостридий

Этанол как побочный продукт образует и гетероферментативная молочнокислая бактерия *Leuconostoc mesenteroides*.

Молочнокислое брожение осуществляют филогенетически неродственные микроорганизмы, объединяемые по признаку образования молочной кислоты (представители порядков Lactobacillales и Bacillales класса Bacilli и сем. Bifidobacteriaceae класса Actinobacteria). Они различны по морфологии, но все грамположительны, не образуют спор (кроме представителей сем. Sporolactobacillaceae), неподвижны. Живут только за счет брожения (АТФ получают исключительно путем субстратного фосфорилирования), аэротолерантны, каталазоотрицательны, не содержат гемопroteинов (цитохромов), растут только на богатых средах с добавлением большого количества факторов роста (витаминов), могут использовать лактозу, чем схожи с бактериями кишечной группы.

Схема сбраживания сахаров через гликолиз характерна для *гомоферментативного молочнокислого брожения* (рис. 88), когда лактата образуется ~90 % и только 10 % приходится на другие продукты (ацетат, ацетоин, этанол). При *гетероферментативном молочнокислом брожении* (рис. 89) сахара сбраживаются через пентозофосфатный путь и лактата образуется ~50 %.

Некоторые гетероферментативные молочнокислые бактерии очень чувствительны к изменению условий. Так, *L. mesenteroides* при соприкосновении с кислородом образует значительное количество полисахарида (происходит ослизнение продукта).

Гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Bifidobacterium* образуют при делении V-подобные структуры. Это преобладающая микрофлора желудочно-кишечного тракта грудных детей, которая регулирует баланс между молочнокислыми и гнилостными бактериями. Известный физиолог И. И. Мечников считал, что молочнокислые продукты подавляют гнилостную микрофлору, которая производит вредные амины (шлаки), приводящие к старению. В настоящее время выпускаются таблетки бифидобактерина, которые способствуют восстановлению нормальной микро-

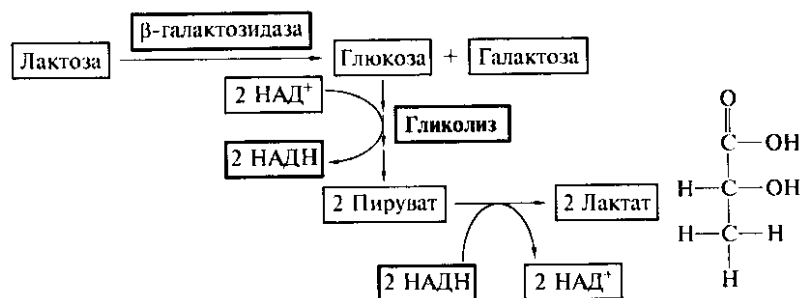


Рис. 88. Гомоферментативное молочнокислое брожение

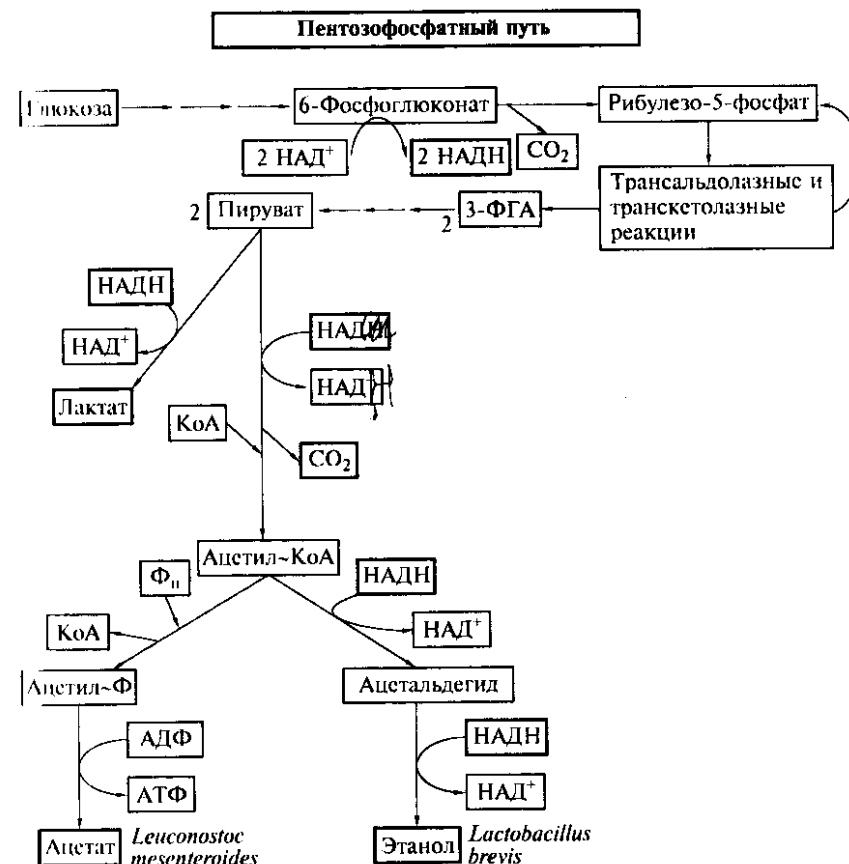
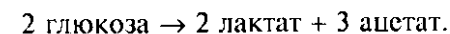


Рис. 89. Гетероферментативное молочнокислое брожение

биоты кишечника (при дисбактериозе, вызванном, например, приемом антибиотиков). Нормальная микрофлора кишечника является для млекопитающих источником витаминов и обеспечивает правильность путей переваривания пищи. Не надо, однако, забывать, что бифидобактерии — это мощные нитратредукторы, осуществляющие реакцию $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$. Нитриты в крови необратимо связываются с гемоглобином, поэтому у грудных детей, у которых бифидобактерии преобладают, при попадании с пищей нитратов может наступить удушье. Бифидобактерии сбраживают сахара по схеме, представленной на рис. 90. Общая формула брожения:



Отметим, что в данном случае не происходит образования этанола и выделения CO₂.

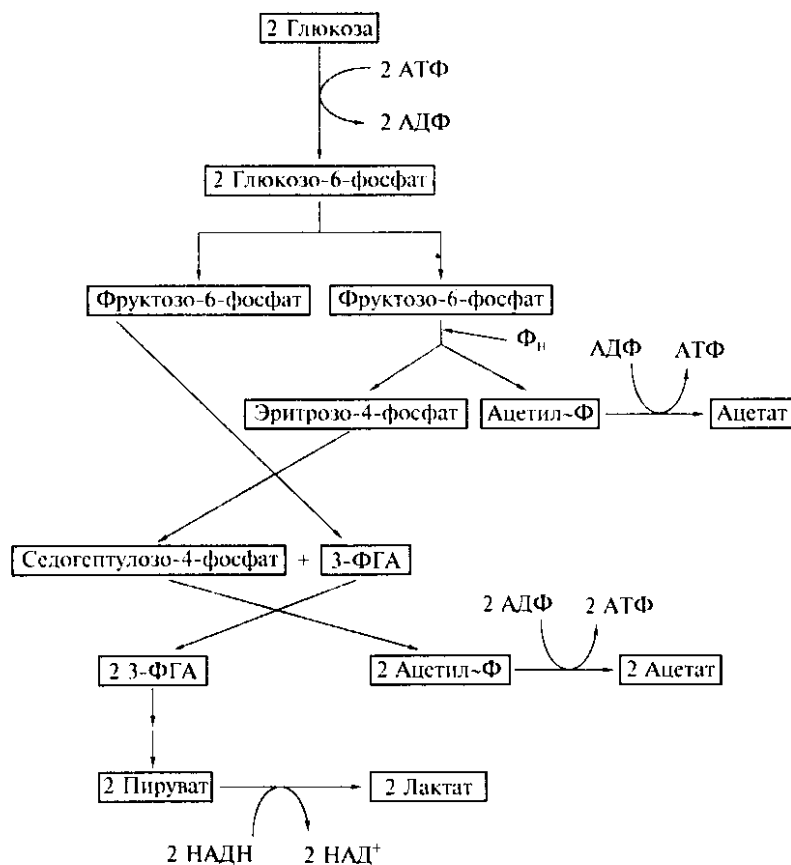


Рис. 90. Гетероферментативное молочнокислое брожение, осуществляемое бифидобактериями

Поскольку лактат — это естественный консервант, снижающий иногда pH до 3, он препятствует развитию микробиоты разложения и гниения (например, клостридий). Ту же самую цель преследует и искусственное снижение pH (маринование — добавление уксуса, лимонной или бензойной кислоты). При низком pH короткоцепочечные алифатические жирные кислоты становятся протонофорами, препятствуя таким образом развитию микроорганизмов. Свойство образовывать лактат при брожении используется при квашении капусты, засолке огурцов, приготовлении молочнокислых продуктов, силосовании кормов, в заквасках для ржаных сортов хлеба и добавках в сырокопченые колбасы, а также для получения чистой молочной кислоты.

Пропионовокислое брожение происходит при приготовлении некоторых твердых сыров на стадии их дозревания. В результате обра-



Рис. 91. «Снеппинг»-деление и образование V-образных и «палисадниковых» структур за счет разницы в толщине клеточной оболочки. Стрелкой показано место «защелкивания»

зуется пропионовая кислота. Основная группа микроорганизмов, способных осуществлять такое брожение, относится к подпорядку *Propionibacterineae* класса *Actinobacteria*. Это обитатели рубца и кишечника жвачных животных. Они относятся к коринеформным бактериям, могут осуществлять характерное «снеппинг»-деление, образуя вилочки и палисадниковые формы в сочетаниях клеток (рис. 91). Это грамположительные, неподвижные палочки, не образующие спор. Они способны расти в микроаэрофильных усло-

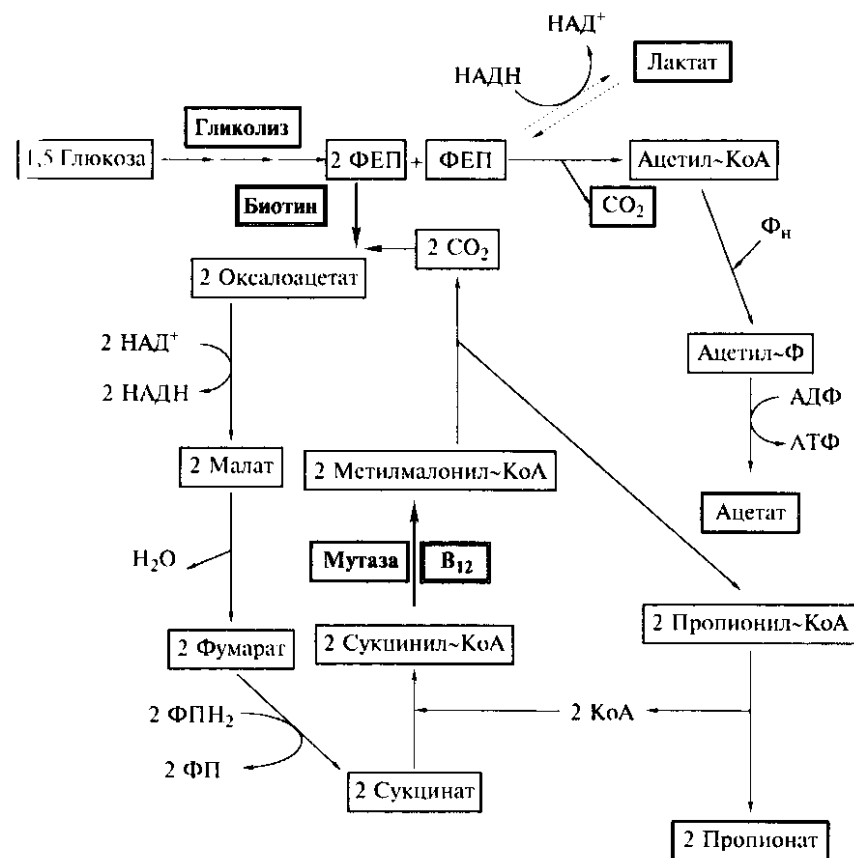


Рис. 92. Пропионовокислое брожение

виях, имеют короткую ЭТЦ и гемсодержащие ферменты — цитохромы и каталазу, могут осуществлять анаэробное фумаратное дыхание.

Эта группа микроорганизмов интересна также тем, что у нее впервые в 1936 г. Харландом Вудом была обнаружена фиксация CO_2 в гетеротрофных условиях. Она заключается в том, что ферменты пируват- или ФЕП-карбоксилазы достраивают C_3 -кислоты до C_4 -кислот с помощью CO_2 (в том числе и экзогенного). Само образование пропионовой кислоты идет по метилмалонил-КоА-пути (рис. 92). Суммарная реакция:



Пропионовокислые бактерии — источник чистого витамина B_{12} для медицины. Кормовой витамин B_{12} получают, экстрагируя осадки метантенков, т.е. из биомассы метаногенов.

Смешанное (муравьинокислое) брожение, названное по характерному, но не главному, продукту, осуществляют микроорганизмы, объединенные в порядок Enterobacteriales. Такое брожение приводит к образованию этанола и сложной смеси органических кислот (ацетата, лактата, сукцината, формиата). Формиат сначала может накапливаться, а затем расщепляться с помощью гидрогенлиазы на H_2 и CO_2 . Порядок Enterobacteriales содержит несколько родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* и др. Это грамотрицательные, подвижные палочки с перитрихальным жгутикованием, беспоровые, факультативные анаэробы, способные получать энергию как в процессе брожения, так и за счет дыхания. Клетки содержат гемопротеины (цитохромы, каталазу), совершенно нетребовательны к условиям роста. Близки по метаболизму к этой группе также представители родов *Vibrio* и *Yersinia*. Общая схема брожения представлена на рис. 93. Для родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia*, а также некоторых видов рода *Bacillus* характерна несколько модифицированная схема, где преобладают не органические кислоты, а 2,3-бутандиол (рис. 94). Иногда этот процесс называют **бутандиоловым брожением**.

Значение самих микроорганизмов определяется прежде всего тем, что среди них есть важные для медицины роды — *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Yersinia* (возбудители пневмонии, тифов, дизентерии, сальмонеллеза, холеры, чумы). *E. coli* (и в меньшей степени *Proteus vulgaris*) являются **санитарно-показательными организмами**, определяемыми при анализе питьевой воды и при сертификации пищевых продуктов. Их наличие в пробах указывает на загрязненность фекальными массами. Для питьевой воды определяют такие параметры, как **коли-индекс** (число клеток в 1 л воды) и **коли-титр** (количество миллилитров воды, в котором содержится 1 клетка). Так, показателем чистой воды в Российской Фе

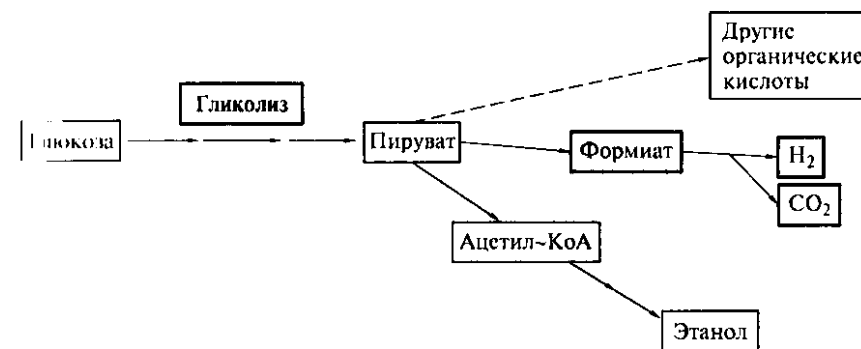


Рис. 93. Общая схема смешанного брожения

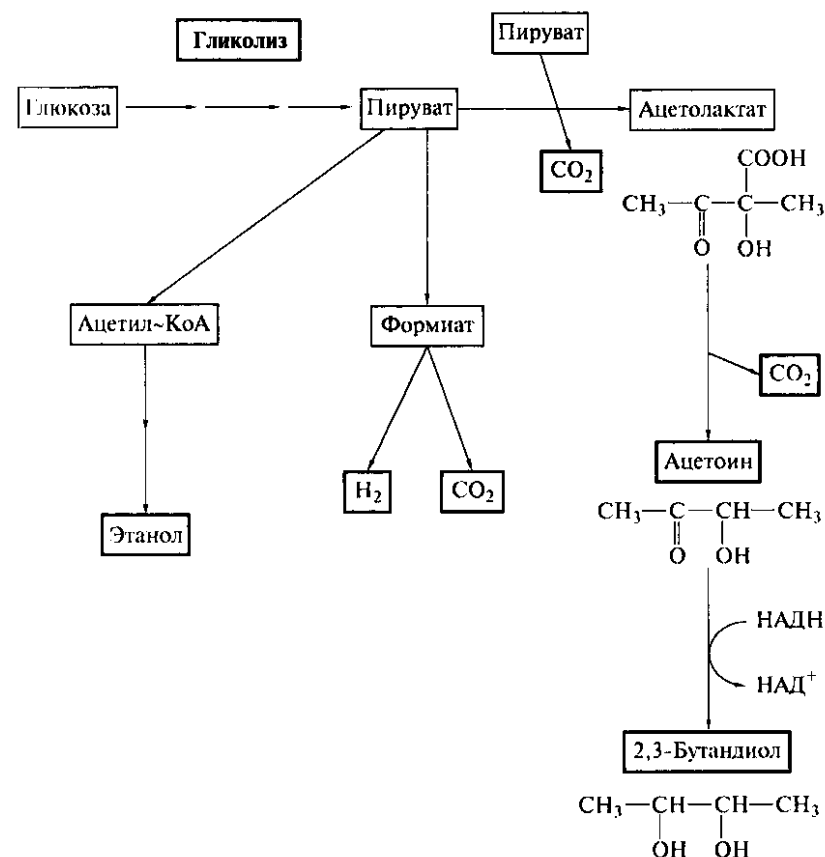


Рис. 94. Бутандиоловое брожение

дерации является коли-титр >500 (в Европе >300). К роду *Erwinia* относятся фитопатогенные виды, вызывающие мягкие гнили. Они имеют мощные пектиназы, которые в настоящее время используются в биотехнологии для осветления соков (фермент из *E. carotovora*). *Serratia marcescens* (*Bacterium prodigiosum*) — «чудесная палочка», образует ярко-красный пигмент продигиозин, похожий по цвету на кровь. Подобный вид смешанного брожения в анаэробных условиях осуществляют и светящиеся бактерии.

Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение. Продуктами такого брожения являются бутират и другие органические кислоты, а также ацетон, бутанол, этанол. Осуществляют брожение микроорганизмы рода *Clostridium*, относящегося к семейству Clostridiaceae. Это грамположительные палочки с перитрихальным жгутикованием, образующие сферические или овальные эндоспоры, раздувающие клетку. Имеют бродильный тип метаболизма. Одни виды рода строго анаэробны (*C. pasteurianum*, *C. kluyveri*), другие — аэротолерантны (*C. histolyticum*, *C. acetobutylicum*). Многие являются типичными обитателями почвы, но есть и патогенные виды. Как правило, не содержат гемопротеинов (цитохромов, каталазы). В настоящее время имеются данные, что у клостридий есть *каталаза* и *супероксиддисмутаза*. Клостридии способны образовывать цитохромы при добавлении в среду предшественников гема. Запасные вещества — крахмалоподобные полисахариды. Основная масса — мезофилы, но есть виды, растущие при температуре 75 °С. Развиваются в нейтральной или щелочной среде. Некоторые виды способны к фиксации молекулярного азота. Вообще, это универсальные микроорганизмы, способные использовать множество суб-

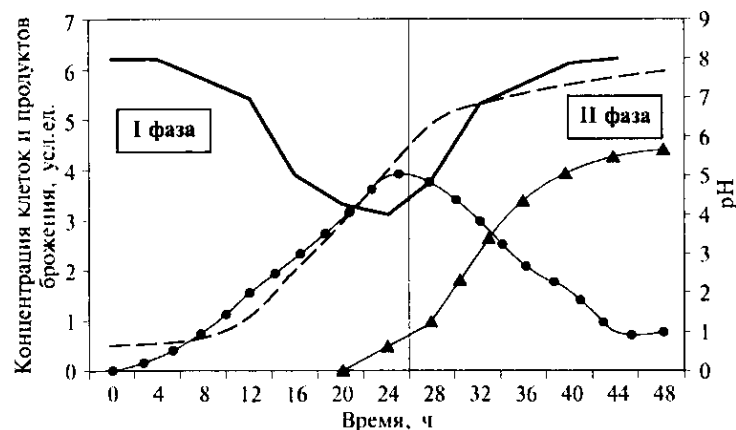


Рис. 95. Двухфазное маслянокислое и ацетонобутиловое брожение клостридий (— — биомасса; ▲▲ — нейтральные продукты; ●● — кислоты; — — pH)

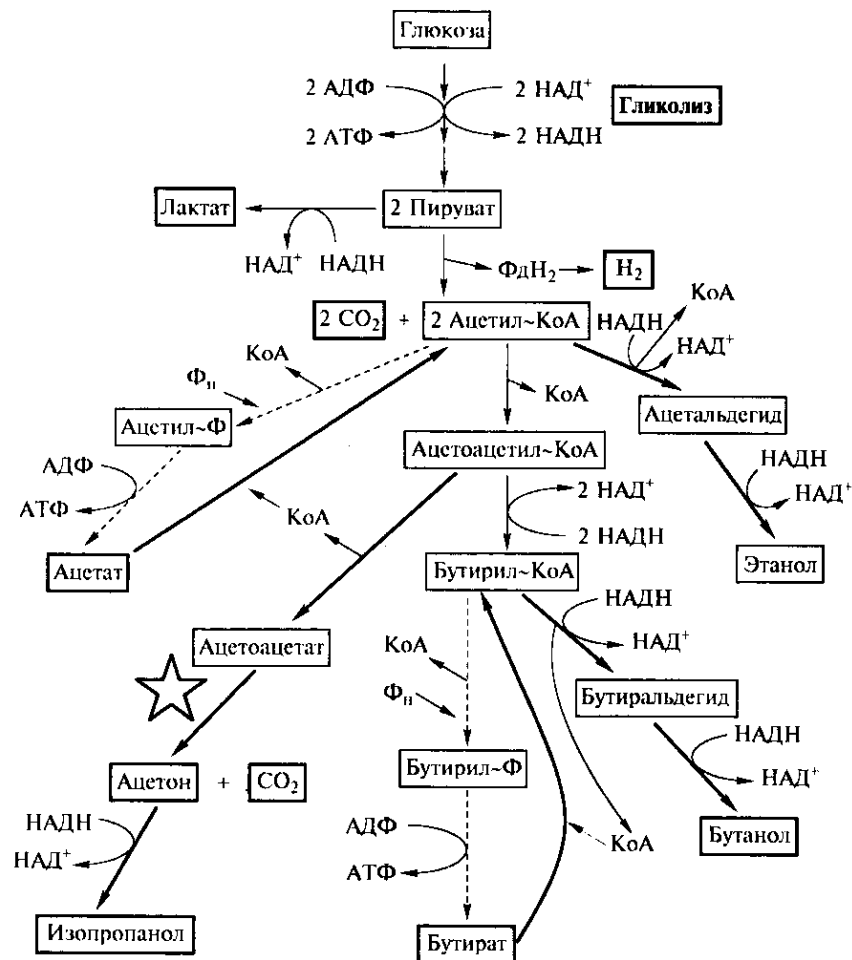


Рис. 96. Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение (— — общие стадии; --- — реакции I фазы; — — реакции II фазы; ★ — фермент ацетоацетатдекарбоксилаза)

стратов. *Сахаролитические клостридии* растут на сахаросодержащих и полисахаридных средах, *протеолитические* (или *непротеолитические*) способны использовать белки и аминокислоты, среди них много болезнетворных форм, *пуринолитические* гидролизуют нуклеиновые кислоты и сбраживают пурины и пиримидины. Этот вид брожения характеризуется четко выраженной *двухфазностью*. Во время фазы I клетки активно растут, образуют кислые продукты и pH снижается. В течение фазы II восстановительные эквиваленты переносятся на образовавшиеся кислые продукты и получаются ней-

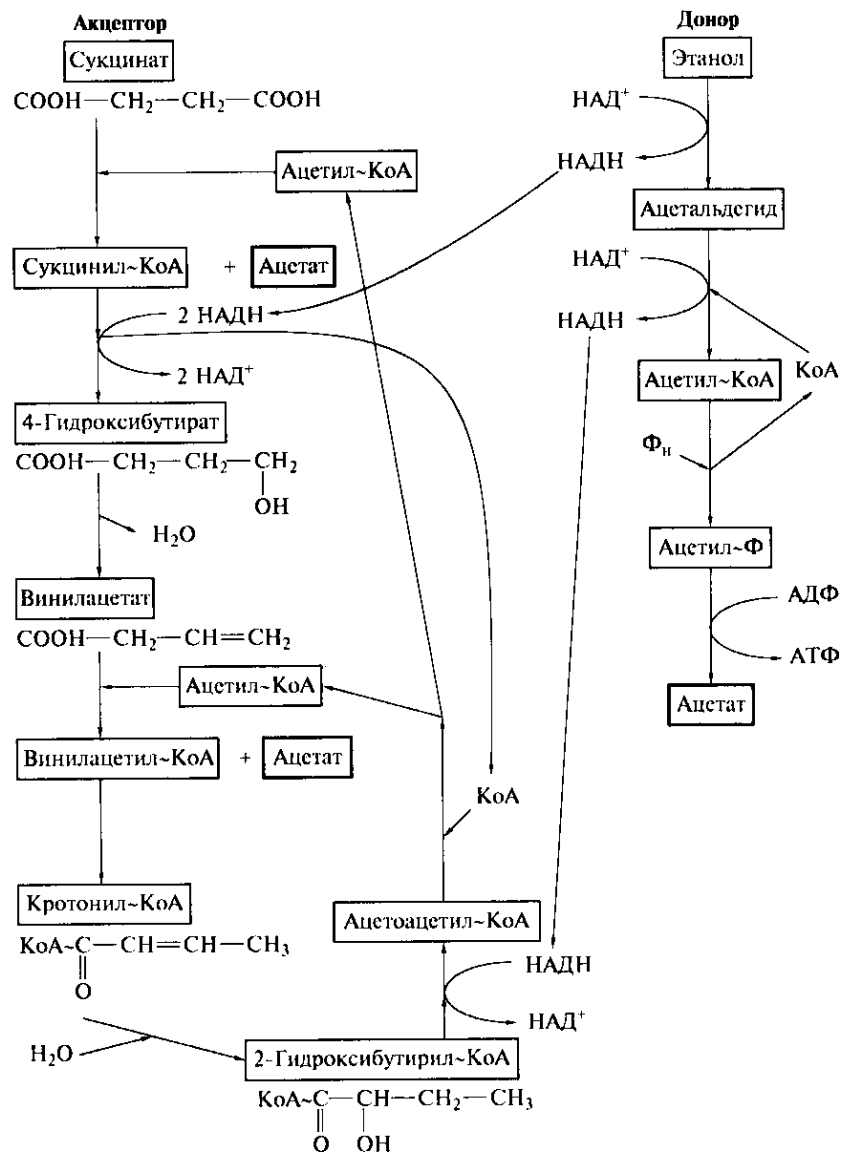
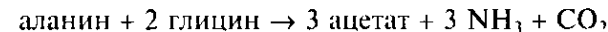


Рис. 97. Схема суццинат-этанольного брожения

тральные вещества, вследствие чего рН возвращается к нормальному уровню и культура снова может развиваться. Графическое выражение этого процесса представлено на рис. 95. Биологический смысл двухфазности заключается в более полном использовании субстрата за счет поддержания комфортных для культуры условий

существования путем сброса избыточных восстановительных эквивалентов на образовавшиеся кислые продукты брожения, т.е. решается две проблемы — «исправления рН» и избавления от восстановителя. Полная схема брожения представлена на рис. 96. Синтез фермента ацетоацетатдекарбоксилазы регулируется кислотностью среды и начинается при рН 5,0.

Некоторые бактерии и клостридии способны сбрасывать аминокислоты (без дезаминирования), но только в виде определенных пар. Одна аминокислота при этом служит донором, а другая — акцептором водорода (реакция Стикленда). Донорами могут быть аланин, лейцин, изолейцин, валин, серин, акцепторами — глицин, пролин, аргинин, триптофан. В реакции



донор подвергается дезаминированию и окислительному декарбоксилированию, а акцептор — восстановительному дезаминированию.

Модификацией такого «парного» брожения является суццинат-этанольное брожение у *C. kluyveri* (рис. 97) с суммарным уравнением



Сами клостридии интересны тем, что среди них есть опасные возбудители болезней человека. Например, *C. histolyticum* и *C. septicum* — возбудители газовой гангрены, протеолитические клостридии, образующие токсины, с которыми связано большое количество летальных исходов в период военных действий, когда раны загрязнялись почвой. При пережатии артерий для остановки крови в тканях возникал анаэробизм и шло брожение с интенсивным выделением газов. Развитие гангрены могло быть остановлено насыщением раны кислородом до 3 атм, что и было предложено военным хирургом В. И. Кравченко («бочка Кравченко»). *C. tetani*, вызывающий столбняк, образует столбнячный токсин, приводящий к судорогам мышц. И наконец, всем известный нейротоксин ботулин синтезирует *C. botulinum*, как правило, развивающийся в плохо приготовленных консервированных белковых продуктах (рыба, мясо, бобовые). Этот токсин термолабилен, т.е. разрушается после кипячения в течение 15 мин.

Гомоацетатное брожение, продуктом которого является только ацетат, хотя и называется брожением, однако часть реакций происходит за счет анаэробного дыхания. Микроорганизмы, его осуществляющие, широко распространены в анаэробной зоне, это строгие анаэробы, способные перерабатывать богатый набор субстратов. Они связаны синтрофными связями с ацетокластическими метаногенами, которые проводят реакцию ацетат → метан + CO₂, так как в пресных водоемах нет других возможностей уда-

лить ацетат в анаэробных условиях. Можно сказать, что гомоацетогены стоят на перепутье между броуильщиками и организмами, дышащими анаэробно, поскольку две молекулы ацетата дает брожение, а третья получается за счет анаэробного карбонатного дыхания (рис. 98). Ферментный комплекс *СО-дегидрогеназа-аце-*

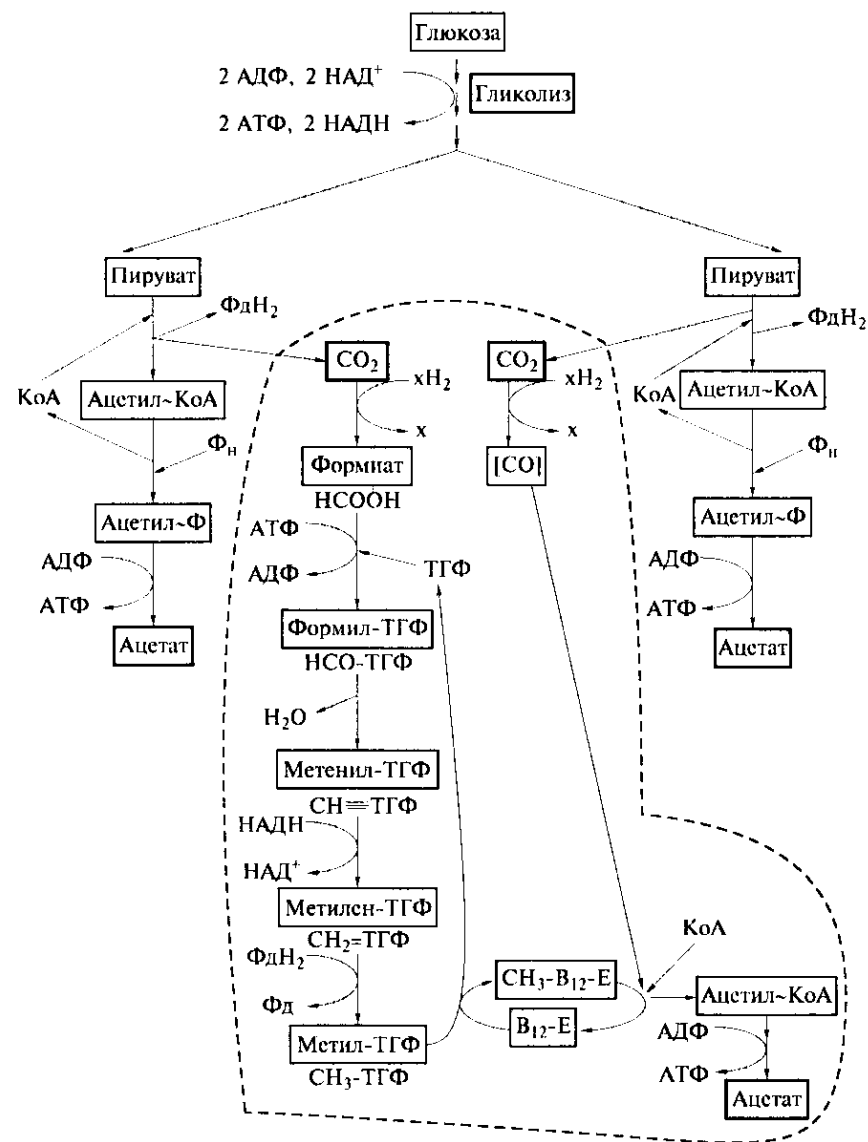


Рис. 98. Гомоацетатное брожение (----- — ацетил-КоА-путь)

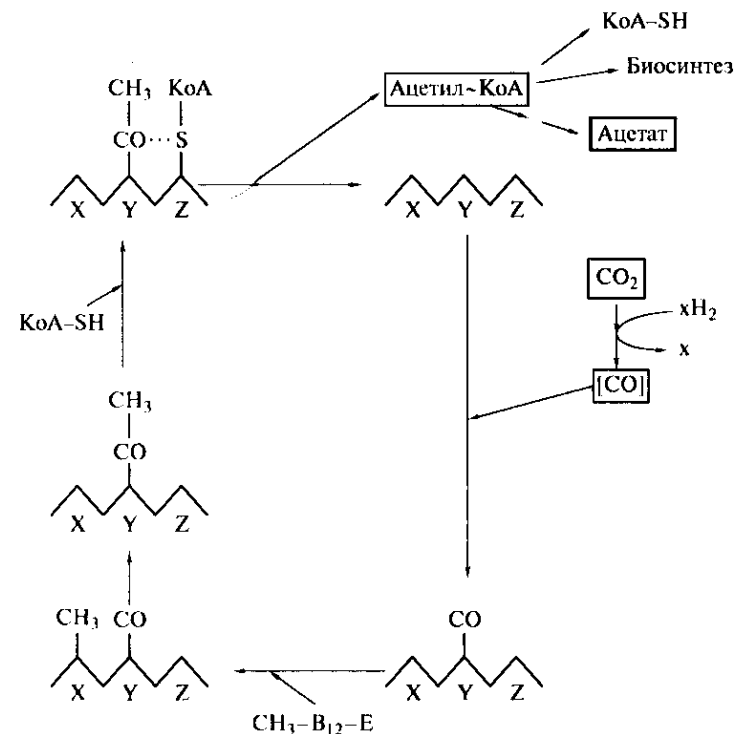


Рис. 99. Схема действия *СО-дегидрогеназы-ацетил-КоА-синтазы* у гомоацетогенов

тил-КоА-синтаза предположительно работает по схеме, представленной на рис. 99. При наличии кислорода ферменты гомоацетогенов теряют свою активность, поэтому их выделение и очистку проводят в анаэробных боксах.

Гомоацетогены могут расти автотрофно на $\text{CO}_2 + \text{H}_2$, образуя ацетат, при этом водород служит донором, а углекислота — акцептором электронов. Когда гомоацетогены растут автотрофно, формирование АТФ путем субстратного фосфорилирования ограничено. В этом случае АТФ генерируется, в основном, с помощью хемиосмотического механизма, сопряженного с восстановлением углекислоты до ацетил-КоА (*путь Вуда — Льюнгдала*) (см. рис. 98 (область, ограниченная штриховой линией) и рис. 99). Мембраны гомоацетогенных клостридий содержат ферменты гидрогеназу, НАДН:ферредоксин-оксидоредуктазу, пирролохинолинхинонзависимую метанолдегидрогеназу, *СО-дегидрогеназу*, метилен-ТГФ-редуктазу и протонзависимую АТФазу. АТФ у гомоацетогенов может синтезироваться как за счет протондвижущей силы, так и за счет $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ -антипорта.

Виды анаэробного дыхания

Акцептор электронов	Восстановленный продукт	Название дыхания — процесса	Примеры микроорганизмов
NO_3^-	NO_2^-	Нитратное — диссимиляционная нитратредукция	Бактерии кишечной группы
NO_3^-	$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$	Нитратное — денитрификация	<i>Pseudomonas</i> , <i>Bacillus</i>
SO_4^{2-}	H_2S	Сульфатное — диссимиляционная сульфатредукция	<i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfotomaculum</i>
S^0	H_2S	Серное — серуредукция	<i>Desulfuromonas</i> , <i>Thermoproteus</i>
CO_2	CH_4	Карбонатное — метаногенез	Метаногенные археи
CO_2	Ацетат	Карбонатное — ацетогенез	Гомоацетогенные бактерии
Fe^{3+}	Fe^{2+}	«Железное»	<i>Geobacter</i>

Возможен рост этих организмов в атмосфере CO с образованием ацетата. Большинство гомоацетогенов способно к росту на одноуглеродных субстратах. К другим соединениям, используемым некоторыми гомоацетогенами, относят галактозу, рибозу, глюкуроновую кислоту, глюконат, маннит, глицерин, многие спирты, органические кислоты и аминокислоты. *Acetobacterium woodii* и некоторые клостридии в присутствии CO_2 (CO) используют О-метильные группы большого количества метоксилированных ароматических кислот, включая ванильную, сириговую, 3,4,5-триметоксибензойную, ферулиновую и другие, для синтеза ацетата.

Гомоацетогенные микроорганизмы распространены во многих таксономических группах. Это представители родов *Clostridium*, например, *Clostridium thermoaceticum*, *C. formicoaceticum*, *C. thermoautotrophicum* (растет при 70°C), *Sporomusa*, *Acetobacterium* (*A. woodii*), *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Acetitomaculum*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Moorella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Syntrophococcus*. Все они относятся к домену Bacteria. Среди архей и эукариот гомоацетогенов до настоящего времени не обнаружено.

Ацетат играет важную роль ключевого интермедиата в глобальном цикле метана. При расщеплении сложных органических веществ гомоацетогены синтезируют ацетат из метильных групп и CO_2 . Ацетат метаболизируется до метана и углекислоты метаногенными археями.

Анаэробное дыхание

Анаэробный энергодающий процесс, в котором конечным акцептором электронов служит окисленное органическое или неорганическое вещество, отличное от кислорода, называют анаэробным дыханием. Анаэробное дыхание сопряжено с функционированием ЭТЦ. Считают, что эволюция процессов запасаения энергии шла от субстратного фосфорилирования (без мембран) через анаэробное дыхание (на мембранах, но без кислорода) к аэробному дыханию (высшая форма — специализированные органеллы, митохондрии).

Виды анаэробного дыхания подразделяются по используемому конечному акцептору электронов (табл. 16).

Процессы восстановления нитрата широко распространены в живой природе. Это прежде всего ассимиляция нитрата $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_3$. В форме аммиака (аммония) азот встраивается в органические молекулы. Такая **ассимиляционная нитратредукция** известна у растений, грибов, бактерий и происходит с помощью молибденсодержащей цитоплазматической нитратредуктазы и сложной гемсодержащей железосерной нитритредуктазы. Иные восстановитель-

ные процессы идут при **анаэробном нитратном дыхании** — это **нитратредукция** ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) у бифидо- и энтеробактерий и **денитрификация** ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\uparrow$) у псевдомонад и бацилл. Донор электронов — обычно органическое вещество. Это единственный процесс, позволяющий превратить связанный азот в газообразный, и именно таким образом происходит **вынос азота из почвы** (поэтому нельзя вносить нитраты и навоз вместе в качестве удобрений, ведь при создании анаэробных условий после дождя начинается мощная денитрификация). Процессы анаэробного дыхания с нитратом в качестве акцептора можно также назвать **диссимиляционной нитратредукцией**, так как восстановленные формы азота не идут непосредственно на синтетические процессы. Бактерии, способные к диссимиляционной нитратредукции, являются факультативными анаэробами и обладают полной дыхательной системой, причем синтез мембрансвязанных нитрат- и нитритредуктаз индуцируется только в анаэробных условиях, а у некоторых микроорганизмов — еще и в присутствии нитрата. Поэтому, чтобы не происходило обеднение почвы азотом, необходима вспашка, т.е. создание аэробных условий.

У микроорганизмов, которые осуществляют только восстановление нитрата до нитрита, последний может накапливаться в культуральной жидкости. В этом случае дальше иногда происходит **ассимиляционная нитритредукция**, не дающая энергии, но зато пре-

образующая нитрит в NH_4^+ , который идет на синтез аминокислот и других азотсодержащих соединений, т.е. происходит *аммонификация нитрата*.

Ранее упоминалось о мощной нитратредуктазе бифидобактерий. Восстановление нитрата до нитрита кишечной микробиотой также может приводить к цианозу, когда эритроциты, блокированные нитритом, не могут переносить кислород.

Развернутая схема денитрификации выглядит следующим образом:



Интересно, что у млекопитающих NO действует как нейротрансмиттер, регулируя кровяное давление, а также используется макрофагами для уничтожения бактерий и опухолевых клеток. У бактерий существует два типа нитритредуктазы, катализирующей образование NO. Одна содержит цитохромы *c* и *d*₁ (как у *Pseudomonas aeruginosa*), другая является медьсодержащим белком (как у *Alcaligenes*). Нитритредуктаза грамотрицательных бактерий, возможно, находится в периплазме.

При *сульфатном дыхании* конечным акцептором электронов служит сульфат. Физиологическую группу бактерий, восстанавливающих сульфат, называют сульфатредуцирующими, десульфатирующими или сульфидогенными. Сульфатредукторы широко распространены в таксономических группах, но все они, в отличие от нитратредукторов, строгие (облигатные) анаэробы. Обычно обитают в морских донных осадках. Большая часть сероводорода в природе возникает благодаря сульфатному дыханию (или *диссимилационной сульфатредукции*):



Донорами электронов могут служить формиат, ацетат, H_2 , пропионат, бутират, лактат, высшие жирные кислоты, этанол и т.д. Одна группа сульфатредукторов окисляет доноры водорода не полностью и выделяет ацетат из-за незамкнутости цикла трикарбоновых кислот (обычно отсутствует 2-оксоглутаратдегидрогеназа). Вторая группа окисляет органические вещества до воды и CO_2 . В табл. 17 приведена краткая характеристика различных таксономических групп сульфатредукторов.

Помимо сульфатного дыхания, бактерии, грибы и растения осуществляют восстановление сульфата путем *ассимиляционной сульфатредукции*, включая затем серу в виде сульфида в серосодержащие аминокислоты и белки. Оба процесса имеют общее начало (рис. 100).

Сульфатредукторы бывают гетеро- и автотрофные. У гетеротрофов ассимиляция органического вещества обычно идет с уровня ацетата, у автотрофов (H_2/CO_2 и SO_4^{2-}) присутствует *ацетил-КоА*.

Таблица 17

Сульфатредукторы из разных систематических групп

Группа	Краткая характеристика
Бактерии	
А. Спорообразующие:	
р. <i>Desulfotomaculum</i> р. <i>Desulfonispore</i> р. <i>Desulfosporosinus</i>	Грамположительные, разные по морфологии микроорганизмы, образующие эндоспоры. Способны к полному или неполному окислению субстратов. Некоторые — автотрофы, азотфиксаторы, термофилы. Имеют цит <i>b(c)</i> , не содержат десульфовиридина
Б. Неспоровые:	
р. <i>Desulfobacter</i>	Палочки, полностью окисляющие ацетат и этанол, некоторые способны к автотрофии
р. <i>Desulfobacterium</i>	Мелкие палочки с полным окислением субстратов, некоторые — автотрофы
р. <i>Desulfobulbus</i>	Эллипсоидные клетки с неполным окислением ацетата и этанола, некоторые способны окислять молекулярный водород
р. <i>Desulfococcus</i>	Кокки, полностью окисляющие субстраты
р. <i>Desulfomicrobium</i>	Мелкие палочки, характер окисления субстратов до конца не ясен
р. <i>Desulfonema</i>	Нити, передвигающиеся скольжением. Полностью окисляют ацетат
р. <i>Thermodesulfobacterium</i>	Термофильные палочки с неполным окислением субстратов
р. <i>Desulfomonas</i>	Палочки с полярными жгутиками. Ацетат окисляют не полностью
р. <i>Desulfosarcina</i>	Крупные кокки в кубоидных пакетах с полным окислением ацетата
р. <i>Desulfovibrio</i>	Подвижные вибрионы, содержащие цит <i>c</i> , <i>b</i> и десульфовиридин. Имеют незамкнутый ЦТК
Археи	
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Архей с нерегулярной формой клеток из морского гидротермального источника. Кроме сульфата хорошо восстанавливает тиосульфат с глюкозой, формиатом, формамидом, лактатом, пируватом в качестве доноров электронов. H_2 может быть донором при росте с тиосульфатом, но не с сульфатом. Элементарную серу не восстанавливает

путь фиксации CO_2 (путь Вуда—Льонгдала), такой же, как у гомацетогенов. В этом случае основным ферментным комплексом является *СО-дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза* со сложным активным центром.

В неблагоприятных условиях, когда сульфат истощается, а органики много, сульфатредукторы могут переходить на сбраживание лактата и пирувата, образуя ацетат и H_2 .

Сульфатредукторы являются важным звеном глобального круговорота серы, поставляют сульфид для анаэробного фотосинтеза. С другой стороны, накопление сульфида может приводить к замору рыб, а также к коррозии металла (рис. 101) и бетона. При тесном контакте клеток сульфатредукторов с поверхностью железа возникает катодная поляризация, при которой Fe^0 донирует электроны сульфату внутри клеток при посредничестве периплазматического гидрогеназного ферментного комплекса. Образованный ион Fe^{2+} либо используется клетками для анаболизма, либо

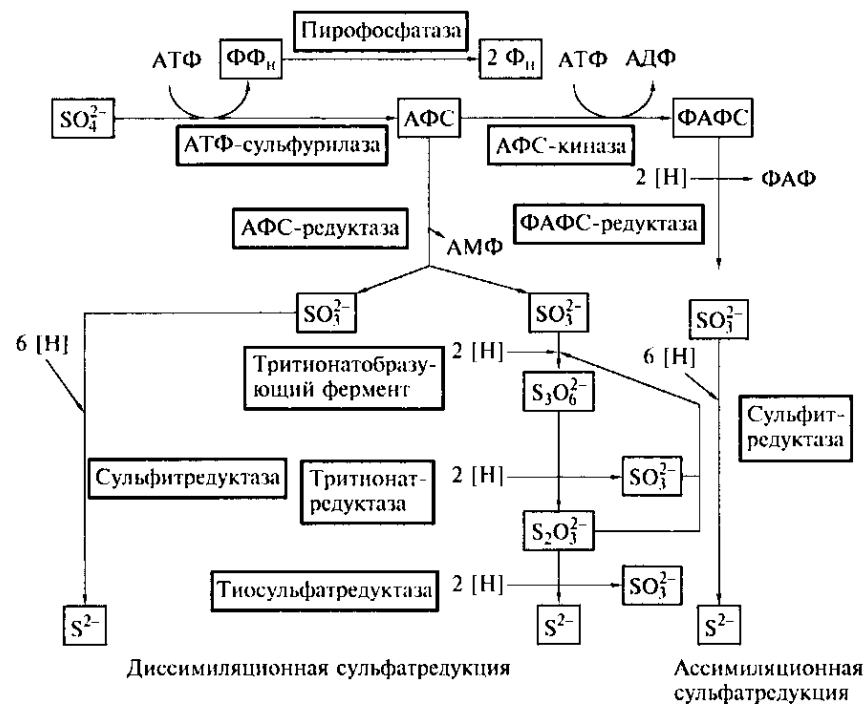


Рис. 100. Процессы ассимиляционной и диссимиляционной сульфатредукции (АФС — аденозинфосфосульфат; ФАФС — фосфоаденозинфосфосульфат; ФАФ — фосфоаденозинфосфат)

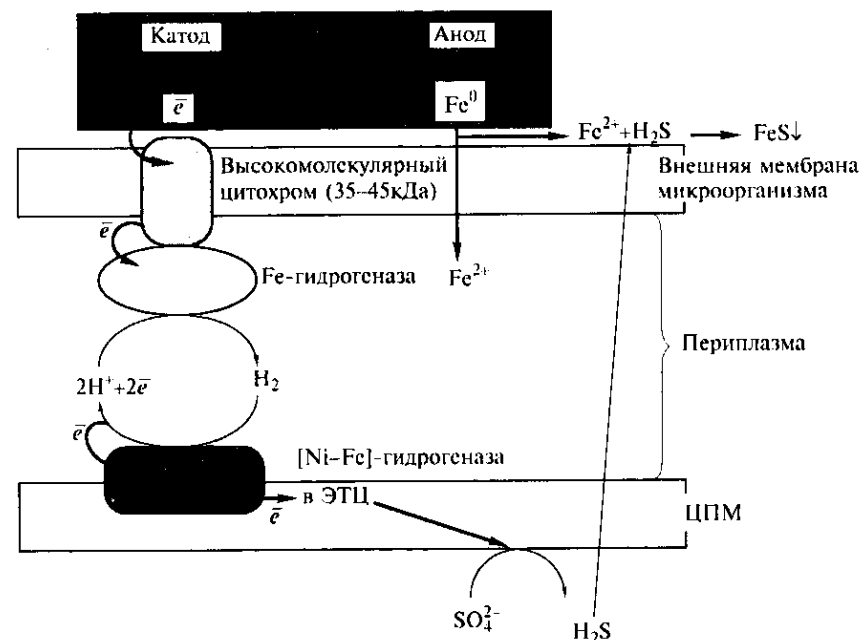


Рис. 101. Биокоррозия железа, вызываемая *Desulfovibrio vulgaris* шт. Hildenborough

связывается экстрацеллюлярно с сульфидом, полученным в результате сульфатного дыхания. В настоящее время на нефтяных месторождениях большой проблемой стала биокоррозия труб нефтепроводов, в немалой степени связанная с развитием внутри труб биопленок, содержащих клетки сульфатредукторов.

Серное дыхание может происходить в местообитаниях, связанных с вулканической деятельностью, где много абиогенной элементарной серы в анаэробных условиях.

Примеры использования серы разными микроорганизмами приведены в табл. 18.

Больше всего серовосстанавливающих микроорганизмов обнаружено среди архей, как правило, существующих в экстремальных условиях (табл. 19).

Из домсна Bacteria наиболее изучен р. *Desulfuromonas* (*D. acetoxidans*) — подвижная палочка с латерально расположенным жгутиком. Окисляет ацетат или этанол до CO_2 , содержит низкопотенциальный цитохром c_7 , FeS-белки и ферменты ЦТК. Живет в синтрофных ассоциациях с фототрофными зелеными серобактериями, потребляющими сульфид (рис. 102).

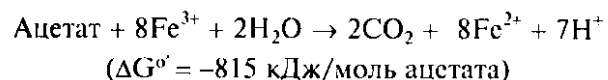
Более экзотичный вид анаэробного дыхания — это «**железное**» дыхание. При восстановлении Fe^{3+} в Fe^{2+} реакция выгодна термодинамически (+770 мВ), но проблема в том, что при pH 7,0 со-

Таблица 18

Примеры использования элементарной серы микроорганизмами

Микроорганизм	Доноры электронов	Роль S ⁰	Места обитания
А. Мезофилы			
<i>Desulfuromonas</i>	Ацетат, этанол	Акцептор электронов	Пресноводные осадки
<i>Campylobacter</i>	H ₂ , формиат	Акцептор электронов	Осадки стоков
<i>Spirillum</i>	H ₂ , формиат	Акцептор электронов	Анаэробные стоки
<i>Wolinella</i>	H ₂ , формиат	Акцептор и донор электронов	Рубец жвачных животных
Штамм DL-1	Лактат, H ₂	Акцептор электронов	Озерные илы
Б. Термофилы			
<i>Desulfurella</i>	Ацетат	Акцептор электронов	Циано-бактериальные маты
В. Экстремальные термофилы			
<i>Thermotoga</i>	H ₂ , органические вещества	Детоксикация	Морские осадки, подводные морские термальные источники, серные наземные источники

единения трехвалентного железа практически нерастворимы и выпадают в осадок ($K_p^* = 10^{-18}$ М). Клетки все время испытывают дефицит акцептора электронов, который находится вне клетки. Поэтому при доставке Fe³⁺ в клетку задействованы комплексообразователи — *сидерофоры*, как и для микроорганизмов, использующих железо в синтезах. У клеток, ассимилирующих Fe²⁺, оно используется внутри клетки, а при анаэробном дыхании обнаруживается вне клетки, причем механизм его выброса в среду неизвестен. Возможная цепь переноса электронов при «железном» дыхании изображена на рис. 103. Интересно, что теоретически при восстановлении трехвалентного железа и использовании ацетата в качестве донора электронов может быть синтезировано около 11 молекул АТФ:



*K_p — константа растворимости.

Таблица 19

Систематические группы архей, содержащие представителей, восстанавливающих элементарную серу (А — автотрофы; Г — гетеротрофы)

Систематическая группа	Тип питания
Филум А1. Crenarchaeota	
Класс 1. Thermoprotei	
Порядок 1. Thermoproteales	
Семейство 1. Thermoproteaceae	
Род 1. <i>Thermoproteus</i>	А
Род 3. <i>Pyrobaculum</i>	А
Семейство 2. Thermofilaceae	
Род 1. <i>Thermofilum</i>	Г
Порядок 2. Desulfurococcales	
Семейство 1. Desulfurococcaceae	
Род 1. <i>Desulfurococcus</i>	Г
Род 4. <i>Staphylothermus</i>	Г
Род 7. <i>Thermodiscus</i>	А
Семейство 2. Pyrodictiaceae	
Род 1. <i>Pyrodictium</i>	А, рост при $t = 113^{\circ}\text{C}$
Порядок 3. Sulfolobales	
Семейство 1. Sulfolobaceae	
Род 1. <i>Sulfolobus</i>	А, рост при pH 1,0—1,5, в аэробных условиях окисляют S ⁰
Род 2. <i>Acidianus</i>	А
Род 6. <i>Sulfurococcus</i>	А, рост при pH 1,0—1,5, в аэробных условиях окисляют S ⁰
Филум А2. Euryarchaeota	
Класс 4. Thermoplasmata	
Порядок 1. Thermoplasmatales	
Семейство 1. Thermoplasmataceae	
Род 1. <i>Thermoplasma</i>	Г
Класс 5. Thermococci	
Порядок 1. Thermococcales	
Семейство 1. Thermococcaceae	
Род 1. <i>Thermococcus</i>	Г
Род 2. <i>Pyrococcus</i>	Г

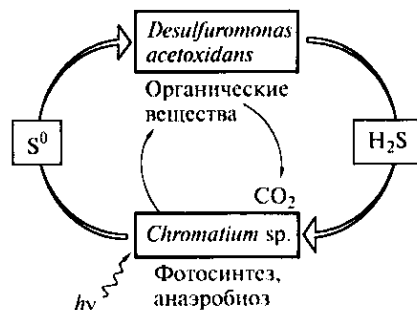


Рис. 102. Синтрофная ассоциация микроорганизмов, основанная на использовании соединений серы

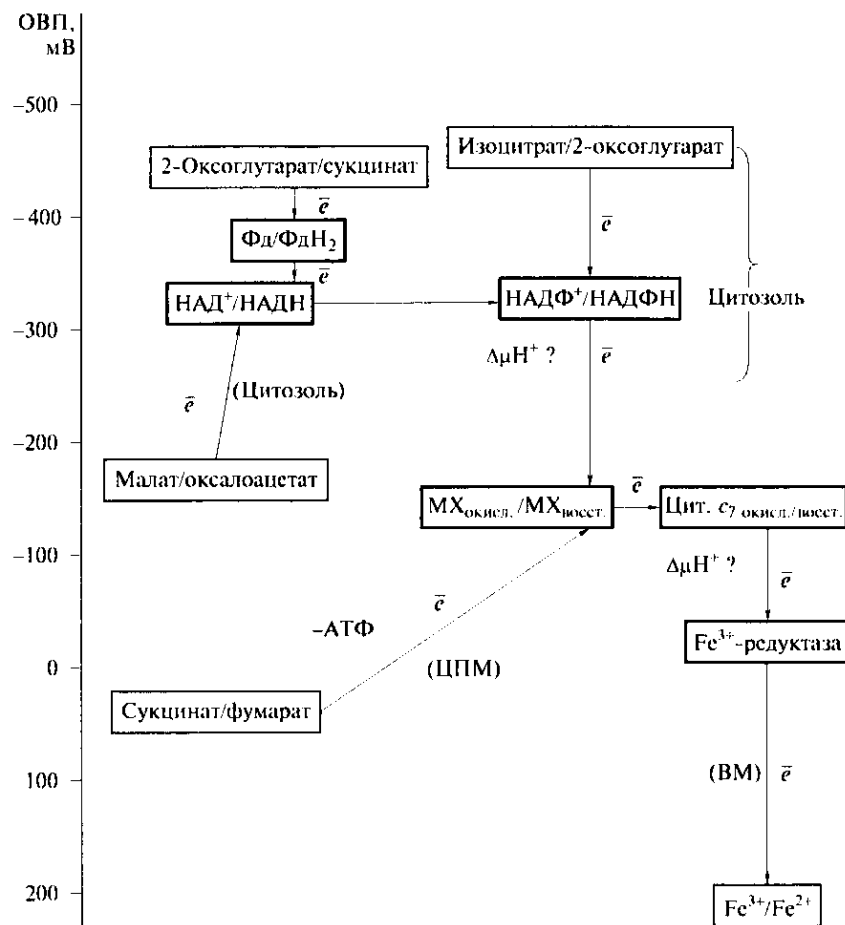


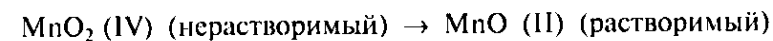
Рис. 103. Возможная цепь переноса электронов при «железном» дыхании

Однако при pH 7,0 на практике $\Delta G^{\circ} = -34$ кДж/моль ацетата, т.е. энергии едва хватает на одну молекулу АТФ. Возможно, что для синтеза АТФ необходимо несколько оборотов реакции.

В природе Fe^{3+} содержится в различных минералах (гематит, ферригидрит, магнетит и т.д.). Широко распространены $\text{Fe}(\text{OH})_3$ и пирит $\text{FeS}(\text{FeS}_2)$.

Трехвалентное железо способны восстанавливать микроорганизмы следующих родов: *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, но неизвестно, связан ли этот процесс с получением энергии. Восстанавливают Fe^{3+} , синтезируя АТФ, представители сем. Geobacteriaceae — *G. metallireducens* и *G. sulfurreducens*. Последний способен также восстанавливать S^0 . Считают, что «железное» дыхание возникло раньше, чем сульфатное, нитратное и аэробное.

Интенсивные исследования микроорганизмов, использующих ионы металлов в качестве акцепторов электронов, начались на рубеже XX и XXI вв. В настоящее время обнаружены организмы, способные восстанавливать марганец:



Еще один тип дыхания, где конечным акцептором служит органическое вещество, называется **фумаратным дыханием**. К фумаратному дыханию способны практически все микроорганизмы, имеющие электронтранспортную цепь с сукцинатдегидрогеназой. Это энтеробактерии, вибрионы и пропионовые бактерии: $2[\text{H}^+] + \text{фумарат} \rightarrow \text{сукцинат}$. При этом цепь переноса электронов очень короткая, при восстановлении 1 М фумарата образуется 1 М АТФ, так как есть только один пункт сопряжения, где происходит окислительное фосфорилирование. К фумаратному дыханию способны также некоторые факультативно анаэробные черви (*Ascaris*, *Fasciola*, *Arenicola*). Это, по-видимому, аналог молочнокислого брожения в мышцах млекопитающих.

Карбонатным дыханием называют анаэробное дыхание, где конечным акцептором электронов служит углекислота (или CO). В разделе, посвященном брожениям, уже говорилось о гомоацетогенных микроорганизмах, получающих энергию при карбонатном дыхании, клеточное вещество которых в автотрофных условиях синтезируется по пути Вуда — Льюнгдала (ацетил-КоА-пути). Второй физиологической и систематической группой, получающей энергию с помощью карбонатного дыхания, являются микроорганизмы, образующие метан, или метаногены. Это самая большая группа архей из филума Euryarchaeota — строгие анаэробы, образующие в качестве конечного продукта метаболизма метан. Обычно являются последним звеном пищевой цепи в анаэробных пресноводных местообитаниях, т.е. в этих условиях они завершают цикл углерода на Земле (гидролитики → бродильщики → ацетогены → метаногены). В морских анаэробных местообитаниях аце-

тат используют также сульфатредукторы. Метан в смеси с CO_2 (биогаз — 60—70 % CH_4 + 40—30 % CO_2) образуется на дне озер и болот, поднимаясь вверх, попадает в аэробную зону и используется метанооксиляющими микроорганизмами. Метан образуется также в рубце жвачных (корова выделяет до 900 л метана в день) и в кишечнике термитов.

Считают, что метаногены — это древнейшие организмы в истории Земли, когда атмосфера состояла из CO_2 , H_2 и CO . По морфологии они варьируют от простых палочек, кокков и сарцин до спиральных форм и нерегулярных коккоидов. Рост — от автотрофного и гетеротрофного до метилотрофного, температурные интервалы роста — от мезофильных до экстремально термофильных. Содержание ГЦ в ДНК от 27 до 61 %. Клеточные стенки содержат псевдомуреин, пептиды и/или полисахариды. Синтезируют коэнзим М, никель-корриноид F_{430} , метанофуран и метаноптерин, производное 5-дсазофлафина — F_{420} . При освещении светом с длиной волны 420 нм клетки метаногенов флуоресцируют сине-зеленым светом (свойство кофакторов F_{420} и F_{430}). Кофакторы метаногенеза очень чувствительны к кислороду, но могут длительно сохраняться без доступа кислорода и воды. Они найдены в нефтяных пластах, что также свидетельствует о древности метаногенов.

Метаногены потребляют довольно узкий набор субстратов. К первой группе субстратов относят H_2/CO_2 , CO . При этом 95 % фиксированного CO_2 используется для получения энергии и выделяется в виде CH_4 и только 5 % идет на биосинтез. Ко второй группе относят ацетат и некоторые спирты (ацетокластический метаногенез). Третью группу составляют одноуглеродные субстраты (формиат, метанол, метиламин, ди- и триметиламины).

Современная классификация метаногенных архей по 16S рРНК представлена ниже.

Филум A2. Euryarchaeota

Класс 1. Methanobacteria

Порядок 1. Methanobacteriales

Семейство 1. Methanobacteriaceae

Род 1. *Methanobacterium*

Род 2. *Methanobrevibacter*

Род 3. *Methanosphaera*

Род 4. *Methanothermobacter*

Семейство 2. Methanothermaceae

Род 1. *Methanothermus*

Класс 2. Methanococci

Порядок 1. Methanococcales

Семейство 1. Methanococcaceae

Род 1. *Methanococcus*

Род 2. *Methanothermococcus*

Семейство 2. Methanocaldococcaceae

Род 1. *Methanocaldococcus*

Род 2. *Methanotorris*

Порядок 2. Methanomicrobiales

Семейство 1. Methanomicrobiaceae

Род 1. *Methanomicrobium*

Род 2. *Methanoculleus*

Род 3. *Methanofollis*

Род 4. *Methanogenium*

Род 5. *Methanolacinia*

Род 6. *Methanoplanus*

Семейство 2. Methanocorpusculaceae

Род 1. *Methanocorpusculum*

Семейство 3. Methanospirillaceae

Род 1. *Methanospirillum*

Род Insertae Sedis 1. *Methanocalculus*

Порядок 3. Methanosarcinales

Семейство 1. Methanosarcinaceae

Род 1. *Methanosarcina*

Род 2. *Methanococcoides*

Род 3. *Methanohalobium*

Род 4. *Methanohalophilus*

Род 5. *Methanolobus*

Род 6. *Methanosalsum*

Семейство 2. Methanosactaceae

Род 1. *Methanosaeta*

Класс 7. Methanopyri

Порядок 1. Methanopyrales

Семейство 1. Methanopyraceae

Род 1. *Methanopyrus*

Классы Methanobacteria, Methanococci, Methanopyri включают метаногенных архей, образующих метан на H_2/CO_2 , формиате, ацетате, метаноле, метиламинах и H_2 /метаноле. Представители сем. Methanosactaceae используют в качестве субстрата метаногенеза преимущественно ацетат.

Метаногены встречаются во всех анаэробных местах обитания, но в морских водоемах сульфатредукторы опережают их в борьбе за субстрат, так как эффективнее получают энергию. У сульфатредукторов ацетат окисляется через ЦТК и есть полная электронтранспортная цепь, заканчивающаяся сульфатом. В то же время многие морские метаногены способны использовать метиламины, которые не являются субстратами для сульфатредукторов.

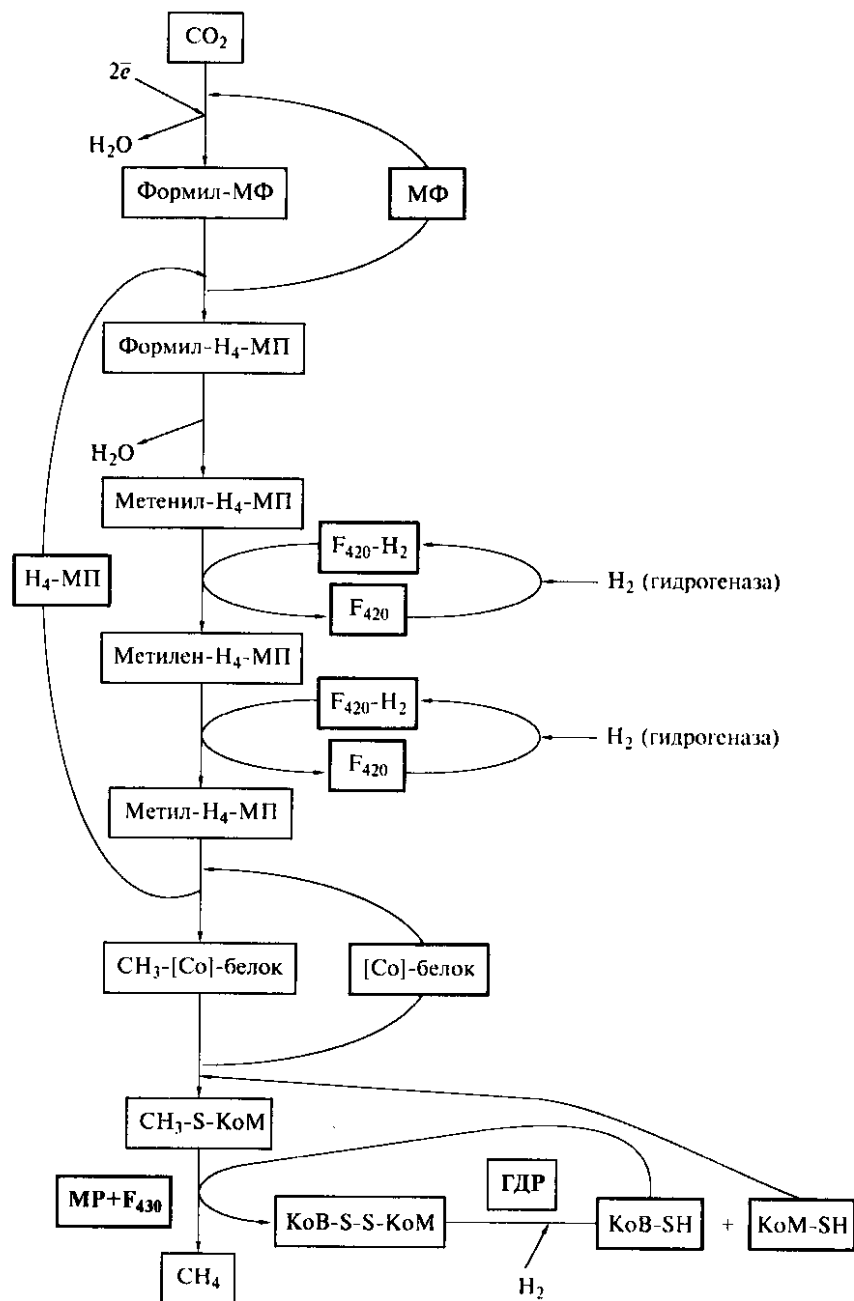


Рис. 104. Процесс образования метана на H_2/CO_2 (МФ — метанофурил; $\text{H}_4\text{-МП}$ — тетрагидрометаноферин, МР — метилредуктаза; ГДР — гетеродисульфидредуктаза)

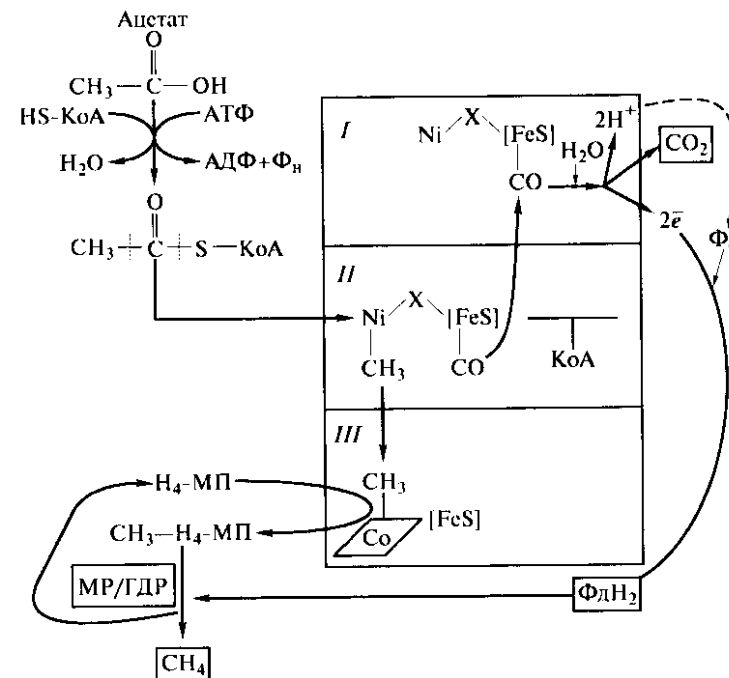


Рис. 105. Ацетокластический метаногенез (I—III — субъединицы)

Ниже приведены суммарные реакции, приводящие к образованию метана:

	ΔG° , кДж/моль метана
$4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	-135
$4\text{HCOOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	-130
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-112
$\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$	-104
$4\text{CH}_3\text{NH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$	-75
$2(\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$	-73
$4(\text{CH}_3)_3\text{N} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2 + 4\text{NH}_3$	-74
$2(\text{CH}_3)_2\text{S} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S}$	-73
$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$	-31

Процессы образования метана при использовании различных субстратов изображены на рис. 104—106. Ацетокластический метаногенез был описан Р. Баркером еще в 1956 г., но расшифровка процесса произошла только в конце XX в. При этом пока не показано, что основной комплекс ацетокластического метаногенеза —

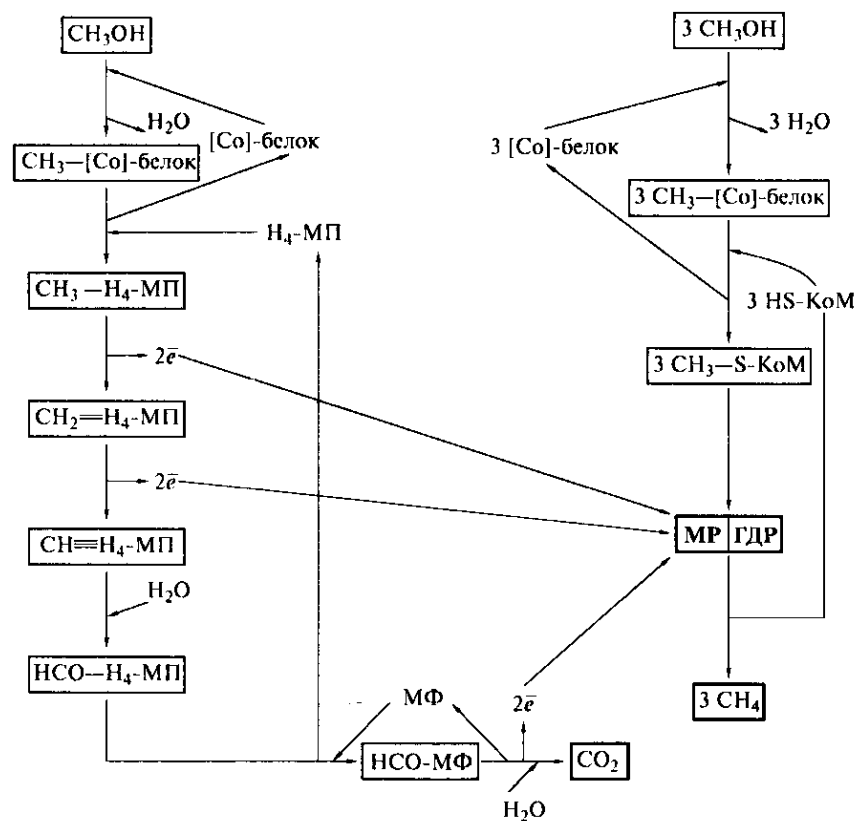


Рис. 106. Процесс образования метана при росте на метаноле

это СО-дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза, которая выделена и очищена у гомоацетогенов. Также неизвестно, способна ли СО-дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза гомоацетогенов участвовать и в расщеплении ацетил-КоА. Метанол как субстрат метаногенеза важен, так как он может образовываться в анаэробных зонах при гидролизе пектина и лигнина, имеющих широкое распространение.

Метаногенные археи занимают важное место в природных экосистемах. Метаногенез активно идет на рисовых полях, причем 90 % образующегося метана попадает в атмосферу через сосудистую систему растений риса. Источники метана — это рубец жвачных, кишечник лошадей и других млекопитающих (примерно 70 % людей имеют метаногены в кишечной микробиоте). Метан попадает в атмосферу при разработке угольных шахт, через разломы на дне океанов («черные курильщики») и при вулканической деятельности. Из всего выделяемого в год метана $((670—1600) \cdot 10^{12} \text{ г})$

«живой» и «мертвый» метан составляют соответственно $(312—755) \cdot 10^{12} \text{ г}$ и $(355—870) \cdot 10^{12} \text{ г}$. Концентрация метана в атмосфере равна 1,75 об. ч/млн (ppm) в Северном полушарии и 1,67 ppm — в Южном. Метан — газ, «ответственный» за «парниковый эффект»: присутствие 1,3 ppm метана вызывает на Земле потепление на 1,3 °С. Время жизни метана в атмосфере 8—10 лет, основной сток происходит за счет фоторасщепления.

Еще один источник образования метана — это искусственные сооружения для очистки стоков и получения биогаза (анаэробные реакторы и метантенки). В таких установках обычно работают микробные сообщества, где метаногены — конечное звено пищевой цепи разложения сложных органических соединений.

С метаногенами в тесном экзо- и эндосимбиозе могут жить некоторые анаэробные простейшие (например, на одну клетку реснитчатого простейшего приходится около 700 клеток метанообразующих архей).

Аэробное дыхание

При аэробном дыхании конечным акцептором электронов в цепи переноса является молекулярный кислород, поэтому для облигатно аэробных микроорганизмов он — необходимое ростовое вещество. Так как для пары $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ $E_h = +810 \text{ мВ}$, то при таком конечном акцепторе получается существенный выигрыш энергии по сравнению с брожением и анаэробным дыханием, т.е. аэробная дыхательная цепь — достижение эволюции. При этом аэробные микроорганизмы могут иметь анаэробные стадии превращения сахаров или стадии брожения (например, гликолиз и молочнокислое брожение в мышцах), но исключительно за счет них эти организмы не могут обеспечить себя энергией. Итак, молекулярный кислород необходим:

- в реакциях включения одного-двух атомов кислорода в некоторые молекулы (например, стероидов, отдельных жирных кислот, каротиноидов);
- для начальных этапов окисления некоторых субстратов (например, метана у метилотрофов и ароматических молекул при их расщеплении) с помощью моно- и диоксигеназ. Следует заметить, что сами эти реакции не дают энергии, но они помогают дальнейшему окислению субстрата;
- при работе оксидаз (например, глюкозооксидазы, цитохром-оксидазы);
- как конечный акцептор электронов в дыхательной цепи.

Использование многоуглеродных субстратов. У большинства микроорганизмов дыхание в принципе не отличается от такового в митохондриях. Однако микроорганизмы в зависимости от усло-

вий роста способны использовать альтернативные пути, синтезируя разные цитохромоксидазы. Схема митохондриальной ЭТЦ представлена на рис. 107. Так как ЭТЦ у прокариот расположена в цитоплазматической мембране, сначала генерируется $\Delta\mu_{H^+}$ и за-

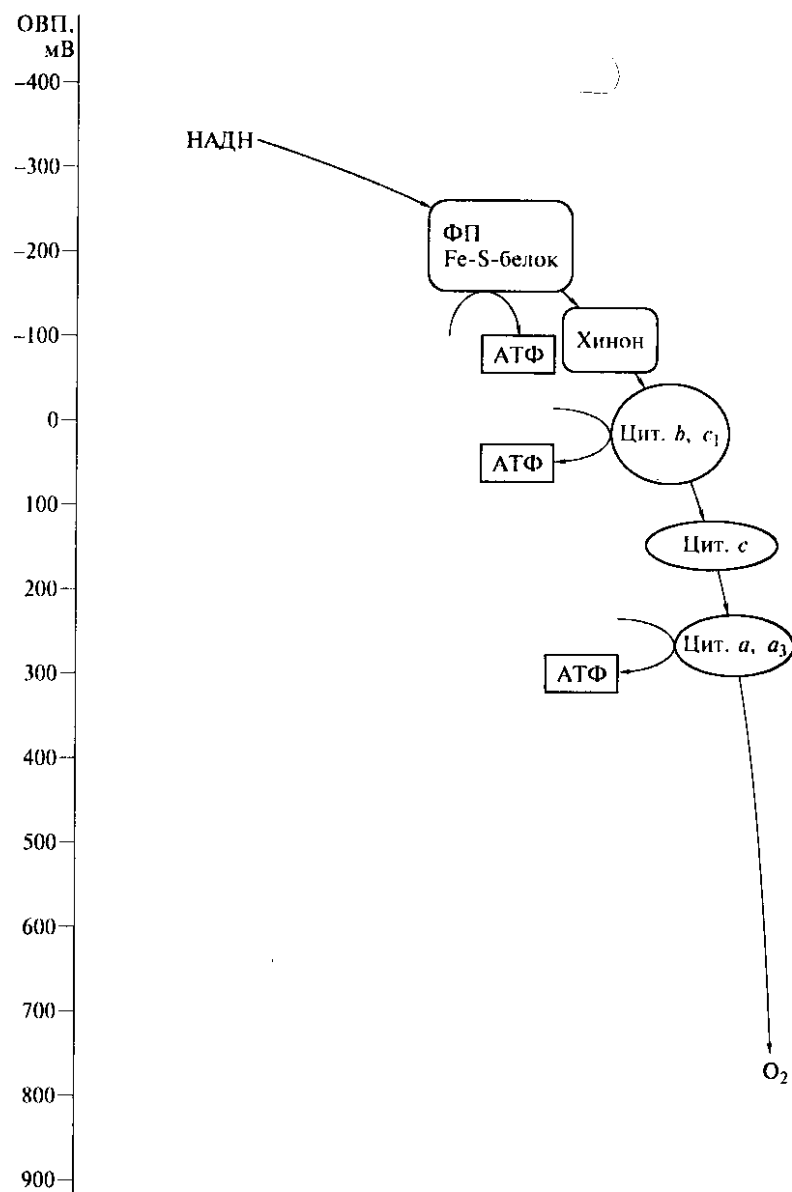


Рис. 107. Схема ЭТЦ митохондрий (имеется три пункта сопряжения)

тем АТФ. Для синтеза 1 АТФ достаточно 150—300 мВ. Такая разница окислительно-восстановительных потенциалов создается в ЭТЦ в определенных местах, называемых *пунктами сопряжения*, так как именно здесь находится АТФаза. Цепь начинается с окисления восстановленных пиридиннуклеотидов, поскольку многие субстраты окисляются при участии *НАД⁺-зависимых дегидрогеназ* (например, малат, пируват). Другие субстраты передают электроны в ЭТЦ на более низких уровнях (например, сукцинат — на уровне убихинона, а метанол — на уровне цитохрома с). Тогда в зависимости от использованного субстрата цепь может быть укороченной и, следовательно, *пунктов сопряжения* будет меньше. У некоторых микроорганизмов с укороченной ЭТЦ образуется больше цитохромов (в частности, у метилотрофов). У *E. coli* цепь разветвленная (рис. 108), в ней нет цит. с, а терминальная оксидация устойчива к цианиду.

При *полном окислении* субстрата единственным окисленным продуктом является CO_2 , а конечным этапом окисления — в основном цикл трикарбоновых кислот (см. рис. 84). В качестве альтернативных систем следует назвать *цикл дикарбоновых кислот* у *E. coli* (рис. 109) и *окислительный пентозофосфатный путь* (Варбурга—Диккенса—Хорекера) у *Glucanobacter* (см. рис. 82). В этом случае, чтобы молекула гексозы окислилась полностью, цикл должен «прокрутиться» шесть раз.

Окончательное окисление может произойти, если тот или иной субстрат сначала превратится в центральный интермедиат ацetyl-КоА или другие интермедиаты ЦТК. Для окисления *белков* микроорганизмы выделяют *внеклеточные протеазы*, которые гидролизуют белки до коротких *пептидов* и *аминокислот*. Таким свойством обладают некоторые бактерии и грибы, в основном патогенные, вызывающие порчу продуктов, а также почвенные микроорганизмы. Разложение белка микроорганизмами (*аммонификация*) всегда сопровождается образованием ряда продуктов: амми-

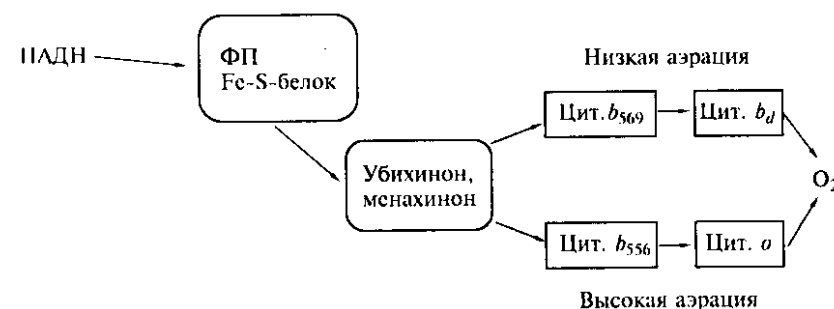


Рис. 108. Разветвленная ЭТЦ у *E. coli*

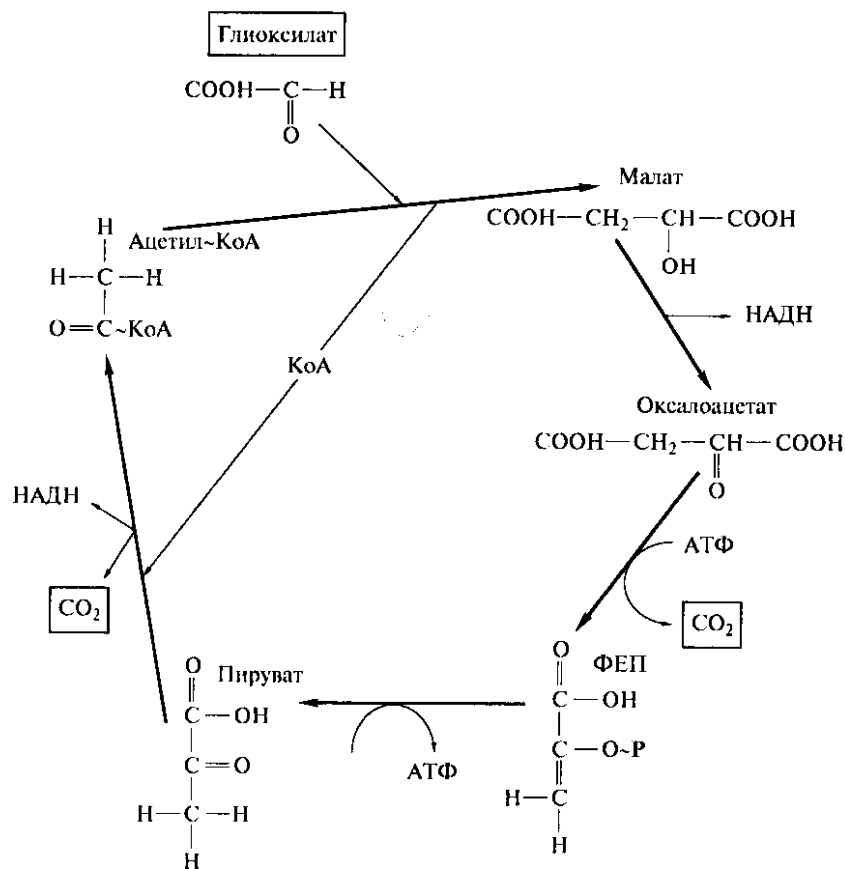


Рис. 109. Цикл дикарбоновых кислот у *E. coli*

ака при дезаминировании аминокислот, сероводорода при расщеплении серосодержащих аминокислот (метионина, цистеина и их производных) и индола при распаде триптофана. Процесс аммонификации всегда сопровождается подщелачиванием среды. Аминокислоты дезаминируются с образованием органических кислот (пировата, ацетата и других интермедиатов ЦТК) и в таком виде входят в цикл Кребса для полного окисления и получения клеткой энергии. Также они могут быть использованы как источник углерода для синтезов клеточных компонентов. Аминогруппы аминокислот идут либо на анаболизм азотсодержащих веществ клетки, либо выделяются в виде иона аммония.

Целлюлоза гидролизруется с помощью *внеклеточных целлюлаз* (в аэробных условиях — грибами и миксобактериями, в анаэробных — клостридиями и некоторыми анаэробными грибами). *Ксилан* древесины и луба гидролизруется ксиланазами до ксилозы и

арабинозы. Есть соответствующие ферменты для гидролиза *крахмала, пектина, фруктозанов, маннанов, агара, хитина, лигнина*. Обычно такие ферменты есть у почвенных бактерий (например, *Cytophaga*) и фитопатогенных форм (например, *Erwinia*). Эти ферменты в ряде случаев используют в биотехнологии (например, пектиназы *E. carotovora* — для осветления соков). Дисахариды далее подвергаются либо гидролизу, либо фосфоролитическому расщеплению. Моносахара превращаются в пироват по одному из рассмотренных ранее путей: гликолизу, пентозофосфатному или КДФГ-пути. Ацетил-КоА образуется у аэробов из пировата с помощью *пироватдегидрогеназного комплекса с тиамином (В₁)* в качестве кофермента.

Интересно, что в рубце жвачных происходит сложный процесс превращения целлюлозы в белок животного через белки микроорганизмов (рис. 110). Если бы в рубце вместо метаногенов присутствовали бы гомоацетогены, то было бы меньше потерь углерода вещества в виде газов.

Липиды расщепляются микробными липазами до *глицерола* и *жирных кислот*. Глицерол затем фосфорилируется, окисляется до ДОАФ и катаболизируется через реакции гликолиза. Жирные кислоты подвергаются β-окислению до ацетил-КоА.

Ароматические соединения сначала расщепляются моно- или диоксигеназами до β-кетoadипиновой кислоты или ее производных, которые затем разлагаются на ацетил-КоА и сукцинат.

Производные *пуринов* и *пиримидинов* «входят» в ЦТК через фумарат, а *пентозы* — через α-кетоглутарат.

Предельные и непредельные углеводороды используются почвенными микроорганизмами разных групп, которые сначала окисляют их до соответствующих жирных кислот с помощью оксигеназ,



Рис. 110. Схема превращения целлюлозы в белки животного через биомассу микроорганизмов

а затем подвергают β -окислению (кроме одноуглеродных соединений).

Вариант аэробного метаболизма, когда субстрат расщепляется не полностью и конечный продукт не CO_2 (или не только CO_2), называют *неполным окислением*. Конечными продуктами неполных окислений могут быть органические соединения (ацетат), которые часто схожи с продуктами некоторых брожений. Образование неполностью окисленных продуктов объясняется либо дефектами в ферментных системах микроорганизмов, либо замедлением их работы из-за неоптимальности условий культивирования.

Типичные представители микроорганизмов, осуществляющих неполные окисления, — группа уксуснокислых бактерий. Это грам-отрицательные мелкие палочки, некоторые подвижны, широко распространены в природе (живут на листьях растений), ацидотолерантны (рН 3—5), многие обладают значительной устойчивостью к этанолу (9—10 %). Наиболее известны два рода: *Acetobacter* с перитрихальным жгутикованием и *Gluconobacter* с полярно расположенными жгутиками. Этим бактериям присуща способность к образованию кислот путем неполного окисления сахаров и спиртов. У *Acetobacter* высокая активность алкогольдегидрогеназы сочетается с низкой активностью ферментов ЦТК, а у *Gluconobacter* отсутствует ключевой фермент ЦТК α -кетоглутаратдегидрогеназа. В биотехнологии используют превращение уксуснокислыми бактериями этанола в ацетат, сорбита в сорбозу, образование глюко-ната и ацетона.

Многие грибы способны выделять в среду продукты метаболизма (органические кислоты и аминокислоты), что связано с «дезорганизацией» их метаболизма путем изменения условий культивирования, которые затормаживают деятельность определенных ферментов ЦТК. Причиной накопления промежуточных продуктов в «узких местах» может быть избыток субстрата, изменение рН, концентрации микроэлементов. С помощью грибов можно получать (в том числе и в промышленности) следующие продукты: молочную (*Rhizopus nigricans*, *Saprolegnia*), фумаровую (*Mucor*, *Rhizopus*), глюконовую (*Aspergillus niger*), щавелевую (многие грибы при высоком рН), лимонную (*A. niger*) и итаконовую (*A. itaconicus*, *A. terreus*) кислоты. L-глутаминовая кислота образуется промышленным продуцентом *Corynebacterium glutamicum* путем восстановительного аминирования 2-оксоглутаровой кислоты.

Одна из групп бактерий, использующих многоуглеродные субстраты, отличается уникальной способностью к *биолюминесценции*. Это *светящиеся бактерии* — морские организмы, хемоорганотрофы, сходные с представителями сем. Enterobacteriaceae. Представляют из себя грам-отрицательные, факультативно анаэробные палочки, передвигающиеся с помощью жгутиков. Большинство склонно к *психрофилии* и является *галофилами*, т.е. требует при-

сутствия иона натрия. В анаэробных условиях осуществляют *смешанное брожение*. В основном это свободноживущие микроорганизмы, но есть и симбионты морских животных (например, *Photobacterium phosphoreum* и *P. leiognathi* живут в светящихся органах рыб).

Свечение наблюдается только в присутствии кислорода. Обычно бактерии испускают сине-зеленый свет (472—505 нм), но один штамм *Vibrio fischeri* светится желтым светом с длиной волны 545 нм. В аэробных условиях микроорганизмы осуществляют процесс аэробного дыхания и свечения (рис. 111). У них имеется обычная дыхательная цепь и работает цикл Кребса. Свечение зависит от окисления длинноцепочечного альдегида с 13—18 атомами углерода в молекуле. Светится возбужденный флаavin под действием фермента люциферазы. Люцифераза — это двухсубъединичный фермент типа монооксигеназы. Кодирована генами *lux*-оперона, которые очень удобны в биоинженерных работах в качестве репортерных генов. Система люциферазы очень чувствительна к различным загрязнениям, поэтому светящиеся микроорганизмы можно использовать в неизбирательных экспресс-тестах на общую токсичность.

Биологический смысл свечения пока непонятен. Есть гипотеза, что это защита от переокисления: когда накапливается много восстановленного пиридиннуклеотида, срабатывает «отводной канал», электроны сбрасываются на флаavin и высвечиваются.

В настоящее время показано, что способностью к свечению обладают представители родов *Photobacterium*, *Beneckia*, *Vibrio*, *Photorhabdus*. Однако светящиеся бактерии начали находить и в пресных водах, и в почве. Представитель почвенных обитателей *Xenorhabdus* не требует присутствия Na^+ и более термофилен. Возможно, свойство светиться не связано с определенными таксономическими группами. Также в последнее время показано, что свечение (особенно у симбиотических бактерий) подчинено эффекту «кворума», т.е. зависит от пороговой плотности популяции.

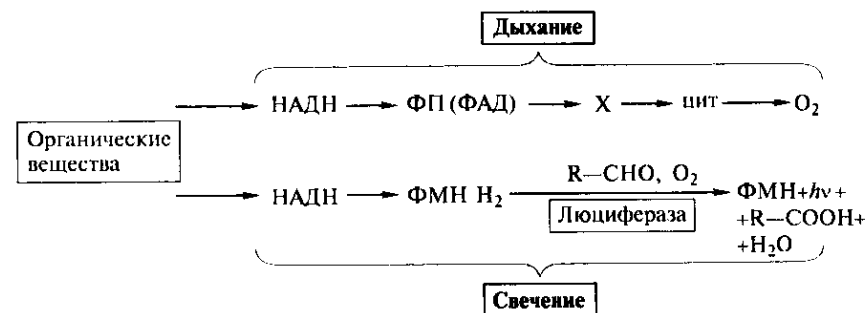


Рис. 111. Схема ЭТЦ светящихся бактерий (X — хинон; R-CHO — длинноцепочечный альдегид)

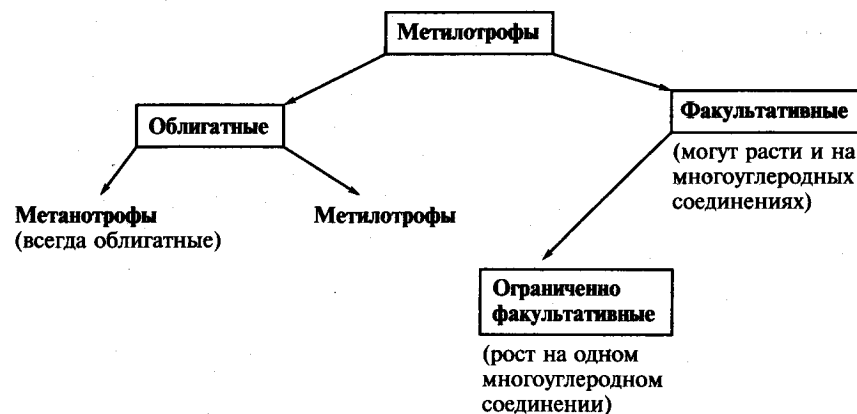
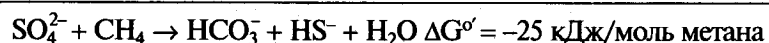
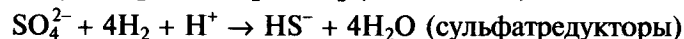
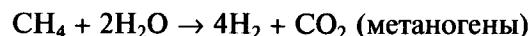


Рис. 112. Группы метилотрофных микроорганизмов

Использование одноуглеродных соединений (метилотрофия). Итак, у большинства микроорганизмов дыхание не отличается от такового в митохондриях. Однако есть среди микробов и уникальные группы. Прежде всего это — *метилотрофные микроорганизмы* — физиологическая группа, способная расти на одноуглеродных соединениях (рис. 112). Одноуглеродными называют такие соединения углерода, в состав молекулы которых входит один атом углерода или их может быть несколько, но при этом молекула никогда не содержит C-C-связей.

Процесс образования метана был рассмотрен выше. Метанол в природе образуется при разложении пектина и лигнина. Формальдегид в силу его реакционной способности в свободном виде не встречается. Формиат образуется в результате брожений, но в больших количествах не накапливается. $(\text{CH}_3)_3\text{NO}$ (N-оксид триметиламина) — осморегулятор у морских растений и животных, поддерживающий в цитоплазме их клеток осмотическое равновесие, — является универсальным акцептором электронов (+730 мВ). При гибели морских животных и растений это соединение восстанавливается в триметиламин, который обуславливает запах тухлой рыбы.

В аэробной зоне эти и подобные C_1 -соединения используются метилотрофами. Ранее считалось, что в анаэробных условиях метан до CO_2 окисляется путем «обратного метаногенеза» и сульфидогенеза:



Поскольку в процессе необходимо участие по крайней мере двух организмов, такая суммарная энергия для их развития недостаточна, так как по современным представлениям минимальный квант энергии для одного организма должен составлять ~20 кДж на реакцию. Поэтому в 2000 г. был предложен новый гипотетический механизм анаэробного окисления метана:

	ΔG° , кДж/моль метана
$2\text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 4\text{H}_2$	-14,4
$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4\text{H}_2\text{O}$	-17,8
$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + \text{HS}^- + \text{H}^+$	-18,5
$2\text{CH}_4 + 2\text{SO}_4^{2-} \rightarrow 2\text{HCO}_3^- + 2\text{HS}^- + 2\text{H}_2\text{O}$	-50,7

По этой схеме энергии достаточно для каждого организма. Биохимия этого процесса неизвестна, и микроорганизмы пока не выделены в чистой культуре, но то, что процесс идет именно так, подтверждено опытами с мечеными соединениями. В лаборатории проф. Г. Виделя получены накопительные культуры, растущие при давлении 10 атм и выше за счет анаэробного окисления метана. Считается, что для протекания процесса необходима ассоциация двух микроорганизмов — метаногенного архея и сульфатредуцирующей бактерии. Показано, что в анаэробных осадках потребление метана количественно связано с восстановлением сульфата. В такой системе метан — единственный источник углерода для обоих микроорганизмов, а сульфат — единственный акцептор электронов в системе.

Метанол в анаэробной зоне используется сульфатредукторами или метаногенами, формиат (кроме метилотрофов) — энтеробактериями, образующими его в брожении смешанного типа.

Окисление метана в присутствии кислорода идет в соответствии со схемой:



Метанотрофы могут соокислять и другие органические соединения, но как источник углерода и энергии используют только метан.

В 1906 г. был описан первый микроорганизм *Bacillus methanica* (*Methylomonas methanica*). Надо отметить, что выделить метанотрофы в чистую культуру довольно сложно, так как в большинстве своем они растут вместе со спутниками, например олиготрофными *Hyphomicrobium*. Тем не менее в 1970 г. было выделено сразу 100 новых штаммов (до этого их было всего 5) благодаря развитию техники микробиологических псевдов (ламинарные боксы, микроманипуляторы, силикагелевые пластинки). Выделение таких культур из отдельных колоний обычно ведут на твердых сре-

Классификация и некоторые основные

Признак	I тип мембран —			
	<i>Methylomonas</i>	<i>Methylobacter</i>	<i>Methylococcus</i>	<i>Methyломicrobi-um</i>
Форма клеток	Палочки, большинство подвижны	Палочки, кокки, некоторые подвижны	Кокки, овалы, неподвижны	Палочки, подвижны
Стадия покоя	Незрелые цисты (как у азотобактера)	Зрелые цисты (как у азотобактера)	Незрелые цисты (как у азотобактера)	Нет
РубисКО	—	—	+	—
РМФ-путь	+	+	+	+
Сериновый путь	—	—	+	—
Мембран-связанная ММО	+	+	+	+
Растворимая ММО	-/+	—	+/-	-/+
ЦТК	Неполный (без 2-ОГДГ)			
Основной хинон	MX8, UX8		MX8	?
Азотфиксация	—	—	—	—
Жирные кислоты	14:0 и 16:1	16:1	16:0 и 16:1	16:1
Температура роста, °C	25—40	20—40	37—62	20—35

Примечание. ММО — метанмонооксигеназа; UX и MX — убикинон и 2-оксоглутаратдегидрогеназа.

дах, не содержащих органических соединений, тонкими иглами под микроскопом.

Метилотрофы рассматривали как потенциальный источник пищевого белка. Компания ICI (Великобритания) разработала процесс производства белково-витаминного концентрата, используемого в качестве кормовой добавки (Pruteen), на основе *Methylo*

свойства групп метанотрофов

сем. <i>Methylococcaceae</i>		II тип мембран — сем. <i>Methylosinaceae</i>		
<i>Methylosphaera</i>	<i>Methylocaldium</i>	<i>Methylosinus</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Methylocella</i>
Кокки, неподвижны	Палочки, кокки, некоторые подвижны	Вибриониды, образуют розетки, подвижны	Вибриониды и овалы, иногда образуют розетки, неподвижны	Кокки, изогнутые палочки, неподвижны
Нет	Незрелые цисты (как у азотобактера)	Экзоспores	Липидные цисты	Экзоспores
—	+	—	—	?
+	+	—	—	—
—	+	+	+	+
+	+	+	+	—
+	—	+/-	+/-	+
?	Неполный (без 2-ОГДГ)	Полный		?
?	?	UX8		
+	—	+	—	?
16:1 и 16:0	16:0 и 16:1	18:1 и 16:1	18:1	18:1
0—21	30—62	15—35		

метилхинон соответственно; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот; 2-ОГДГ —

phillus methylotrophus. Время генерации этого микроорганизма — 1,5 ч, а конверсия углерода метанола составляет 70 %. Компания Shell (Великобритания/Нидерланды) пыталась организовать получение пищевого белка на смеси метана и воздуха при давлении 7 атм. Однако работы были свернуты с началом «зеленой революции», так как соевый белок оказался дешевле.

Метанотрофы окисляют, как правило, только метан (реже и хуже — метанол). К общим свойствам метанотрофов можно отнести высокое сродство к метану ($K_{CH_4} = 0,1 - 30,0$ мкМ для чистых культур и $K_{CH_4} = 0,1 - 2,2$ мкМ для смешанных культур), невысокую скорость роста ($\mu = 0,02 - 0,07$ ч⁻¹), высокую скорость окисления метана ($V_{max} = 10 - 31$ мМ CH_4 г⁻¹ · ч⁻¹) и высокое сродство к кислороду ($K_{O_2} = 0,14 - 0,18$ мкМ). Хорошо растут на средах с пониженным содержанием O_2 (0,45 — 20 %). Представители четырех родов способны к азотфиксации. Некоторые виды растут при температуре 62 °С. Обычно нейтрофильны, но есть ацидо-(до pH 5) и алкалифильные (до pH 10) представители.

Метанотрофы обладают хорошо развитой системой внутрицитоплазматических мембран, на типе которой и строится их первичная классификация (табл. 20). Все метанотрофы входят в классы Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria филума B12 Proteobacteria. Внутрицитоплазматическая мембранная система I типа представляет собой стопки «тарелочек», II тип этой системы имеет мембраны, параллельные ЦПМ и не пересекающие центр клетки. Только у одного недавно выделенного рода *Methylocella* обнаружено уникальное строение этой системы в виде мембранных везикул.

Для метанотрофов характерно наличие сложных и разнообразных поверхностных структур: капсул, трубчатых и бокаловидных выростов, микрофибрилл и регулярных слоев.

Ранее предполагали, что метан сначала окисляется до CO_2 , а затем углекислота фиксируется в цикле Кальвина. На *Methylosinus trichosporium* было показано, что на самом деле в большинстве случаев углерод фиксируется на уровне формальдегида (рис. 113). Часть метана действительно окисляется до CO_2 с запасанием энергии. Пути фиксации формальдегида приведены на рис. 114—116. РМФ-цикл конкретного микроорганизма — это сочетание одного из вариантов правой части и одного из вариантов левой части, т.е. всего известно 4 типа РМФ-цикла. В сериновом пути наряду с формальдегидом фиксируется и углекислота.

Первая реакция окисления метана до метанола идет при участии фермента метанмонооксигеназы (ММО). Обычно этот фермент мембрансвязанный, растворимая ММО у метанотрофов встречается реже. У *Methylocella*, наоборот, присутствует только растворимая ММО и пока не обнаружена мембрансвязанная.

Итак, монооксигеназы встраивают один атом кислорода в молекулу метана, а второй с затратой двух электронов и двух протонов от донора-восстановителя идет на формирование молекулы H_2O . Работа фермента требует затраты энергии, которая запасается клеткой в дальнейших реакциях окисления с помощью дегидрогеназ метанола, формальдегида и формиата.

Метанол образуется и окисляется в периплазматическом пространстве до формальдегида. Первая дегидрогеназа метанола (клас

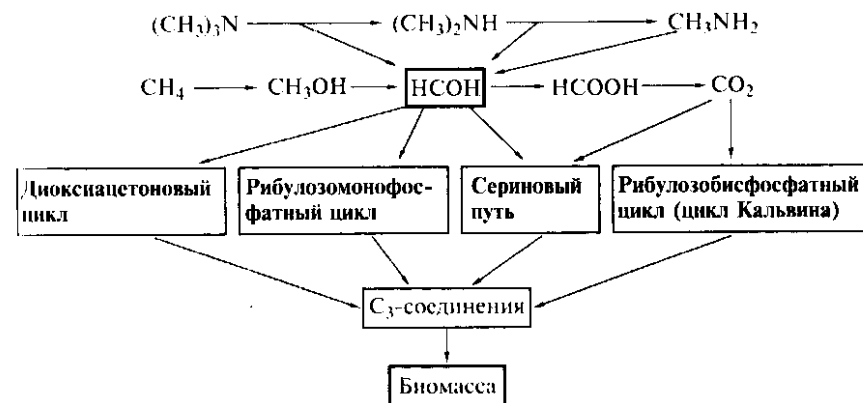


Рис. 113. Ассимиляция C_1 -соединений у метилотрофов

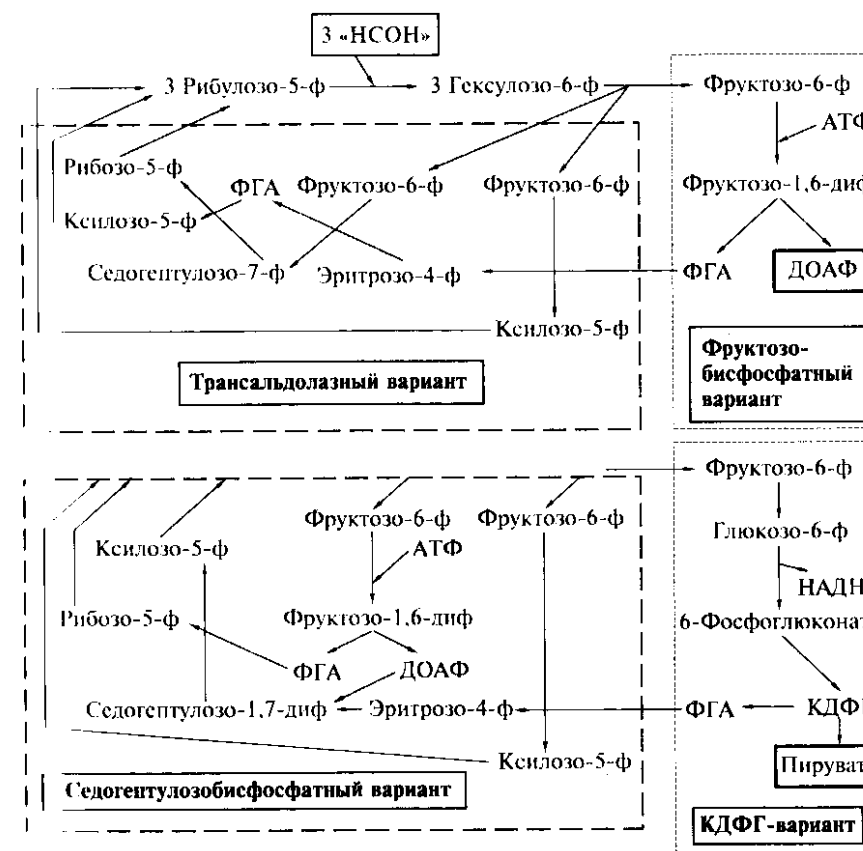


Рис. 114. Рибулосомонофосфатный цикл (РМФ-цикл) (ф — фосфат)

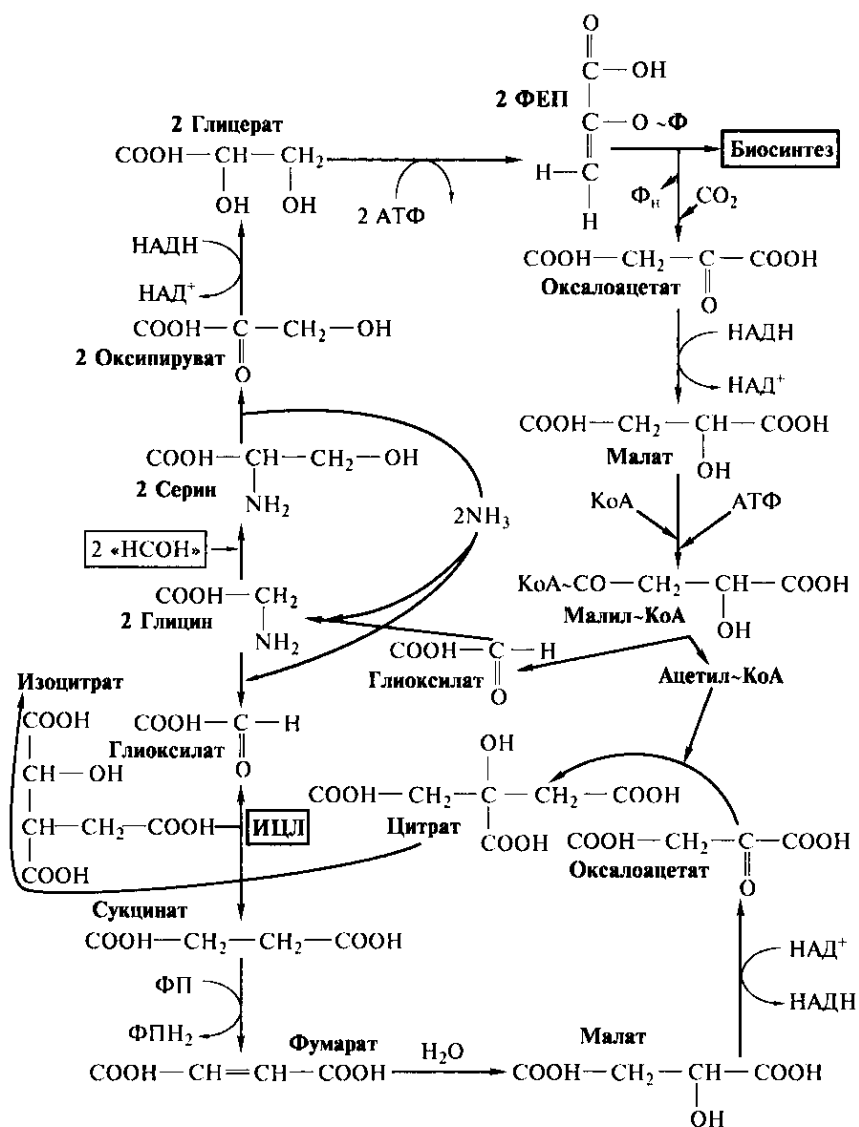


Рис. 115. Сериновый путь фиксации формальдегида (ИЦЛ — изоцитрат-лиаза)

сическая, рис. 117, А), содержащая в виде протетической группы пирроло-хинолин-хинон (ПХХ), цитохром *c*-зависимая, поэтому в результате такого окисления генерируется максимум одна молекула АТФ. Вторая метанолдегидрогеназа (рис. 117, Б) восстанавливает НАД⁺ и при таком процессе образуется до 3 АТФ.

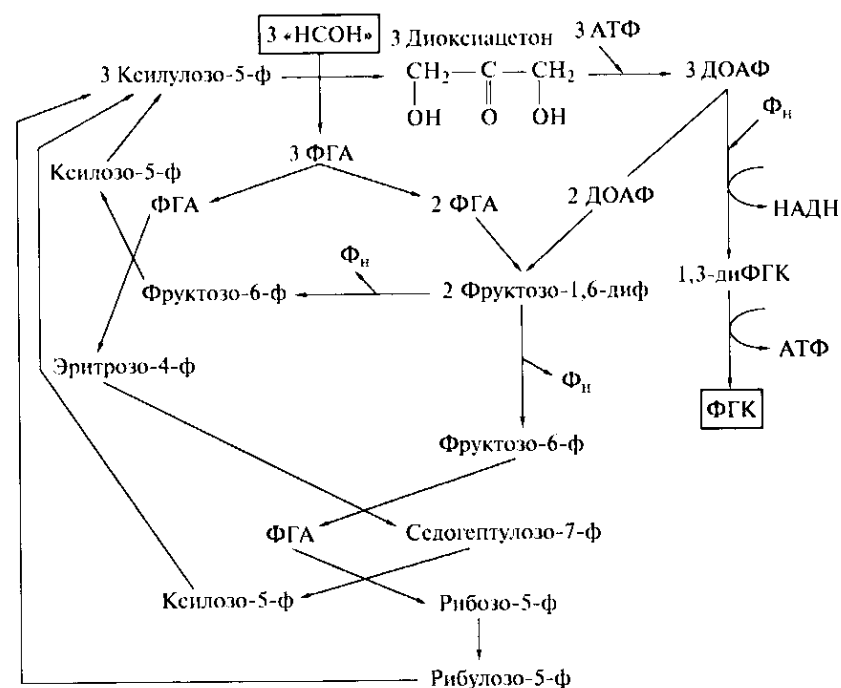


Рис. 116. Диоксанацетоновый цикл фиксации формальдегида

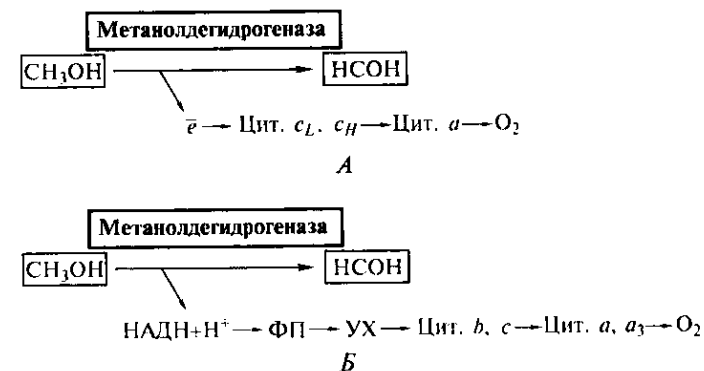


Рис. 117. Два типа (А, Б) метанолдегидрогеназ (НАДН — пиридин-нуклеотид; ФП — флавопротеид; УХ — убихинон)

НАД⁺-зависимый фермент найден у представителей рода *Bacillus*, растущих на метаноле и обладающих необычным для бацилл ростовым поведением: при достижении культурой стационарной фазы споры формируются только при наличии смеси аминокислот в среде, в противном случае все клетки мгновенно лизируются.

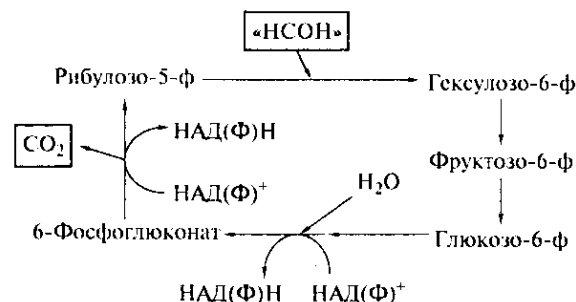


Рис. 118. Диссимиляционный цикл окисления формальдегида

Формальдегид поступает в РМФ- или сериновый циклы для биосинтеза или окисляется для получения энергии. Окисление формальдегида может происходить в диссимиляционном цикле (рис. 118), а также по пути, в котором принимают участие переносчики тетрагидрофолат (ТГФ) или тетрагидрометаноптерин (Н₄-МП) и метанофуран (МФ), свойственные метаногенам (рис. 119).

Окисление метиламинов идет с участием ряда ферментов до формальдегида и NH₃ (рис. 120). Формиат обычно окисляется НАД⁺-зависимыми дегидрогеназами.

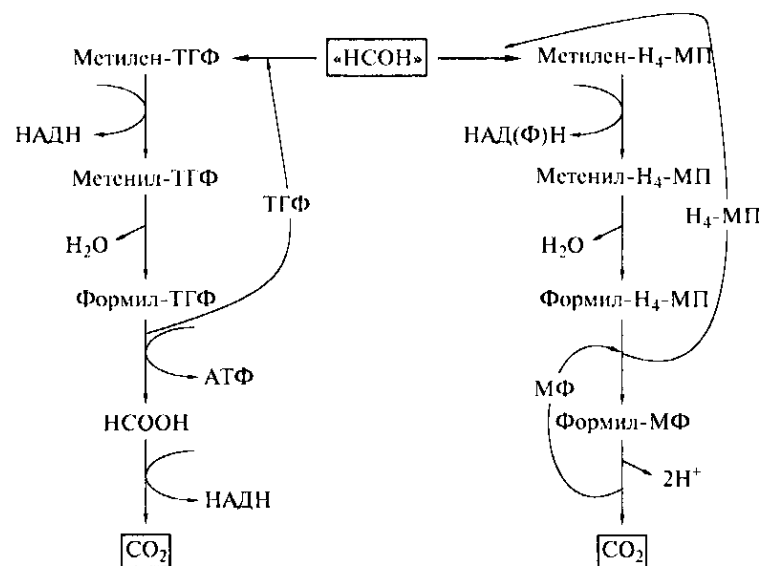


Рис. 119. Пути окисления формальдегида с участием различных переносчиков

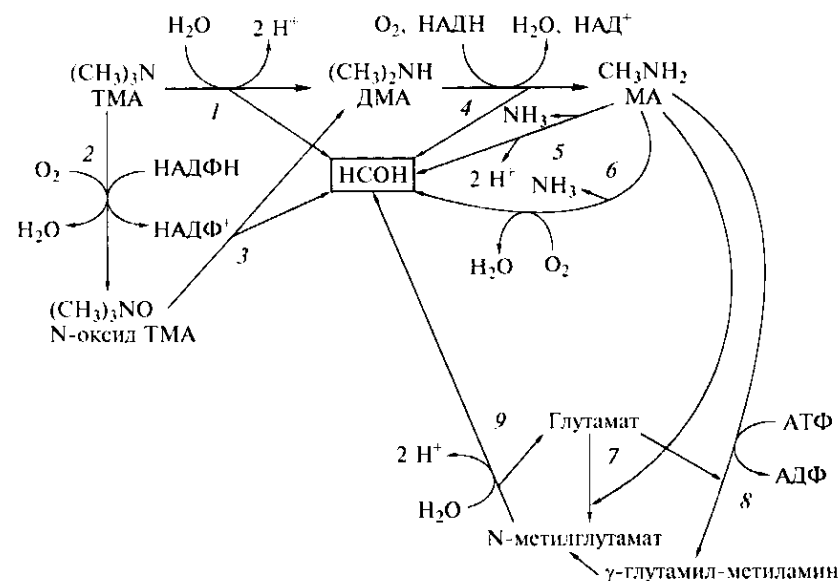


Рис. 120. Пути окисления метиламинов (ТМА — триметиламин; ДМА — диметиламин; МА — метиламин):

1 — ТМА-дегидрогеназа; 2 — ТМА-монооксигеназа; 3 — деметилаза N-оксид ТМА; 4 — ДМА-монооксигеназа; 5 — МА-дегидрогеназа; 6 — МА-оксидаза; 7 — N-метилглутаматсинтаза; 8 — γ-глутамил-МА-синтаза; 9 — N-метилглутаматдегидрогеназа цит. с или НАД⁺-зависимая

Метилотрофные дрожжи были открыты японскими исследователями в 1969 г. В природе они обитают в садовых почвах и существуют за счет метанола, образующегося при гидролизе пектина. Из представителей 39 проверенных родов дрожжей только 5 содержали виды, способные к метилотрофии. Это 18 видов рода *Candida* (наиболее изученный — *C. methylica*), 9 видов рода *Hansenula* (*H. polymorpha*, *H. capsulata*, *H. minuta* и др.), 6 видов рода *Pichia* (*P. pinus*, *P. pastoris* и др.), а также *Saccharomyces* sp. и *Rhodotorula* sp. *Sporobolomyces roseus* и *S. gracilis* могут расти на средах с метиламинами, используя их только как источник азота. Из мицелиальных грибов метилотрофами являются *Gliocladium deliquescens*, *Paecilomyces varioti*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium* sp., способные к росту на средах с метанолом.

При росте на среде с метанолом у дрожжей все пространство клетки заполнено

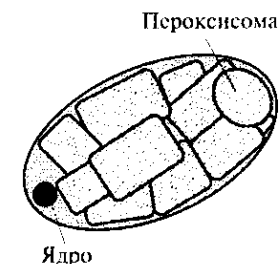


Рис. 121. Дрожжевая клетка с пероксисомами

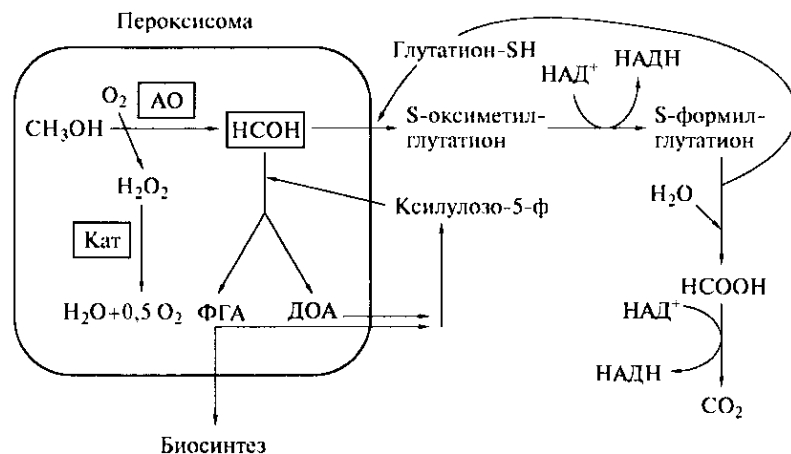
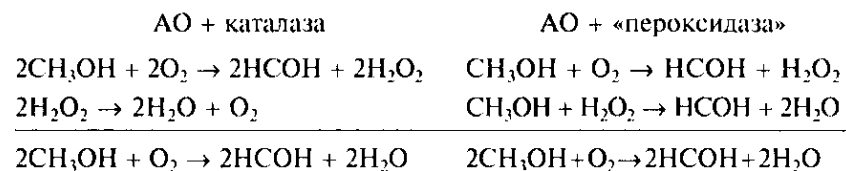


Рис. 122. Использование метанола метилотрофными дрожжами

пероксисомами, а все органеллы сдвинуты к одному из полюсов (рис. 121). Пероксисомы при рассмотрении в электронном микроскопе имеют на поверхности исчерченность в виде сеточки и содержат в закристаллизованном состоянии два фермента — алкоголь(метанол)оксидазу и каталазу. Алкогольоксидаза (АО) переносит электроны сразу на кислород с образованием перекиси, которая расщепляется каталазой (Кат), рис. 122. На первом этапе дрожжи не получают энергии, так как оксидазы не восстанавливают переносчики электронов. Поэтому дрожжи проигрывают в эффективности роста метилотрофным бактериям.

Формальдегид активно переносится из пероксисомы в цитозоль, где связывается с восстановленным глутатионом. Считается, что трехслойная мембрана пероксисомы защищает клетку от повреждающего действия перекиси. В пероксисоме также происходит и первая реакция ассимиляции формальдегида с ксилулозо-5-фосфатом.

При работе с выделенной из клеток дрожжей каталазой было замечено, что она имеет пероксидазную функцию, окисляя метанол за счет перекиси водорода:



Таким образом, предполагали, что одна молекула метанола может окисляться каталазой. Однако впоследствии было показано, что в клетке этого не происходит.

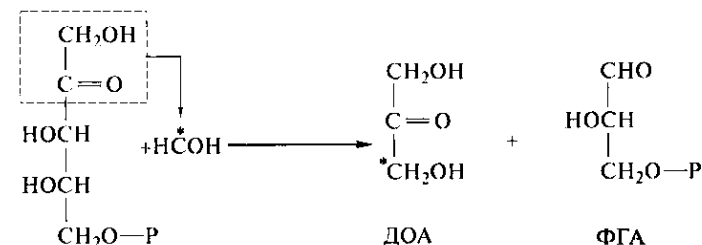


Рис. 123. Первая реакция в ДОА-цикле (ДОА — диоксиацетон)

АО имеет широкую субстратную специфичность к спиртам, что дает возможность использовать ее при определении алкоголя в крови. АО может составлять в клетке до 20 % всех белков, что указывает на мощность ее промотора. Учитывая, что *P. pinus* при выращивании в проточном ферментере на метаноле способна давать плотность до 125 г/л, клонирование под промотор этого фермента гена инсулина или интерферона человека приводит к сверхсинтезу нужного продукта.

Ассимиляция формальдегида у дрожжей происходит в ДОА-цикле. Ранее считали, что у них работает модифицированный РМФ-цикл с затратой АТФ. Однако не был обнаружен ключевой фермент этого цикла — гекулозомонофосфатдегидрогеназа. Оказывается, у дрожжей не происходит переноса одноуглеродного фрагмента на C_5 -соединение. С использованием меченых веществ была получена схема реакции, приведенная на рис. 123 (подробная схема ДОА-цикла представлена на рис. 116).

Метилотрофные дрожжи могут быть источником кормового белка, однако, поскольку дрожжевая клеточная стенка не у всех животных в пищеварительном тракте расщепляется (например, у свиней), дрожжи приходится автолизировать перед сушкой.

Если же говорить обо всех метилотрофах (и эу-, и прокариотических), то понятна их важная роль в глобальном цикле углерода. Метилотрофы в хозяйственной деятельности человека могут быть источником не только пищевого (кормового) белка, но и биотина, B_{12} , аминокислот тирозина и глутамата, природного пластика — поли- β -гидроксимасляной кислоты, полисахаридов, кофермента Q_{10} и т.д. Нельзя забывать о перспективности метилотрофов как объектов биотехнологии.

Использование неорганических соединений (хемолитоавтотрофия). Процесс хемолитоавтотрофии открыт в 1887 г. С. Н. Виноградским, работавшим в ту пору в Страсбурге в лаборатории А. де Бари. Такой образ жизни присущ только прокариотам: для получения энергии используется восстановленное неорганическое вещество, а для построения клеточного материала — CO_2 . С. Н. Виноградский открыл этот новый «modus vivendi», работая с микроорганизмами.

окисляющими восстановленные соединения серы. Такой микроб, как *Beggiatoa* — серная бактерия из водных местообитаний, окисляя H_2S , откладывает элементарную серу внутри клетки. Когда сероводород кончается, микроорганизм может окислять отложенную серу до сульфата. Окисление восстановленных соединений серы связано с получением энергии, микроорганизмы требуют небольших количеств органических соединений и способны фиксировать CO_2 , т.е. являются факультативными автотрофами. Были выделены также облигатно автотрофные виды *Beggiatoa* из морских местообитаний.

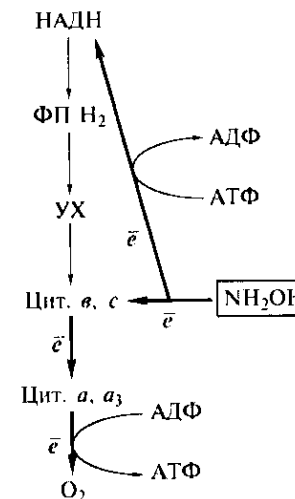
Биологическая природа процесса превращения аммиака в нитрат была известна давно и использовалась в Европе для получения селитры при изготовлении пороха: земляные валы поливали кровью животных со скотобоен, аэрировали, нейтрализовали золой (источник калия) и образовавшийся выцвет нитратов растворяли и выпаривали. С. Н. Виноградский же выделил чистые культуры нитрификаторов методом «отрицательных пластинок»: сильно разведенные суспензии высевались на агар или силикагель, и те кусочки агара, где не было роста гетеротрофов, переносились на среду с NH_4^+ . Однако сначала С. Н. Виноградский считал, что процесс идет в одну стадию ($NH_4^+ \rightarrow NO_3^-$). Его статья об этом появилась в 1890 г. В том же году Дж. и Г. Франкланды опубликовали статью о выделении микроорганизма, который осуществляет реакцию $NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$. Ясно, что вначале С. Н. Виноградский имел смешанную культуру нитрификаторов двух фаз, а супруги Франкланд выделили нитрификатор первой фазы. В 1949 г. Виноградский исправил прежнюю статью, признав, что нитрификация идет в две стадии.

Заслугой С. Н. Виноградского также является открытие железобактерий.

Процесс нитрификации происходит в две стадии: $NH_4^+ \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$, причем в природе нитрит не накапливается больше чем в 10^{-4} М, так как скорость II фазы значительно выше. Раньше считали, что нитрификация — сугубо аэробный процесс. Оказалось, что этот процесс может происходить и в анаэробных условиях. Было замечено, что в анаэробных реакторах, осуществляющих очистку стоков от соединений азота, аммоний окисляется, но лишь в присутствии нитрата: $^{15}NH_4^+ + ^{14}NO_2^- \rightarrow ^{14,15}N_2 \uparrow + H_2O$. Наличие такой реакции доказано с помощью меченых соединений и связано с работой специальной группы автотрофных бактерий, филогенетически близких к планктомицетам, проводящей процесс АнаммОкс (*anammox* — anaerobic ammonia oxidation).

Для фиксации CO_2 нитрификаторы используют цикл Кальвина, в котором затрачивается большое количество АТФ и восстановительных эквивалентов. Клетки имеют карбоксисомы с ферментами этого цикла (РуБисКО). Однако окисление аммиака приводит

Рис. 124. Схема ЭТЦ (с обратным переносом электронов) у нитрификаторов I фазы



к тому, что электроны поступают в ЭТЦ на более низком уровне, чем тот, который требуется для образования НАДН. Поэтому у нитрификаторов обнаружен механизм обратного переноса электронов с затратой энергии в виде АТФ для синтеза восстановительных эквивалентов (рис. 124).

Микроорганизмы I и II стадий нитрификации — это грамтрицательные организмы, объединенные по способности к нитрификации, а не филогенетически. Они встречаются в классах Beta-, Gamma- и Epsilonproteobacteria филума B12 Proteobacteria, а также в классе Nitrospira филума B8 Nitrospirae. Некоторые могут также использовать в небольших количествах пируват и ацетат.

В табл. 21 представлена краткая характеристика родов нитрификаторов I стадии ($NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$). Клетки имеют сеть развитых впячиваний цитоплазматической мембраны (у *Nitrosomonas* они параллельны мембране клетки, у *Nitrosococcus* — в виде стопок ламелл, у *Nitrosolobus* — в виде инвагинаций).

Истинным субстратом нитрификаторов I фазы является именно аммиак, а не ион аммония. Аммиак хорошо проникает в клетки и окисляется по монооксигеназному механизму:

1) $NH_3 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NH_2OH$ — промежуточное соединение, гидроксилламин. Эта реакция идет с затратой энергии в виде восстановителя;

2) $NH_2OH + H_2O \rightarrow HNO_2 + 4H^+ + 4e^-$ — это энергодающий процесс, электроны переносятся на уровень цитохромов *b* и *c*.

Таблица 21

Некоторые свойства клеток нитрификаторов I фазы

Род	Форма клеток	Подвижность
<i>Nitrosomonas</i>	Палочки	В активной фазе роста имеют полярные жгутики, в прикрепленном состоянии образуют биопленки
<i>Nitrosococcus</i>	Кокки или эллипсы	
<i>Nitrosospira</i>	Спирали	
<i>Nitrosolobus</i>	Плейоморфные палочки с лопастями	В фазе расселения имеют перитрихальное жгутикование, в стационарной фазе образуют биопленки
<i>Nitrosovibrio</i>	Вибрионы	

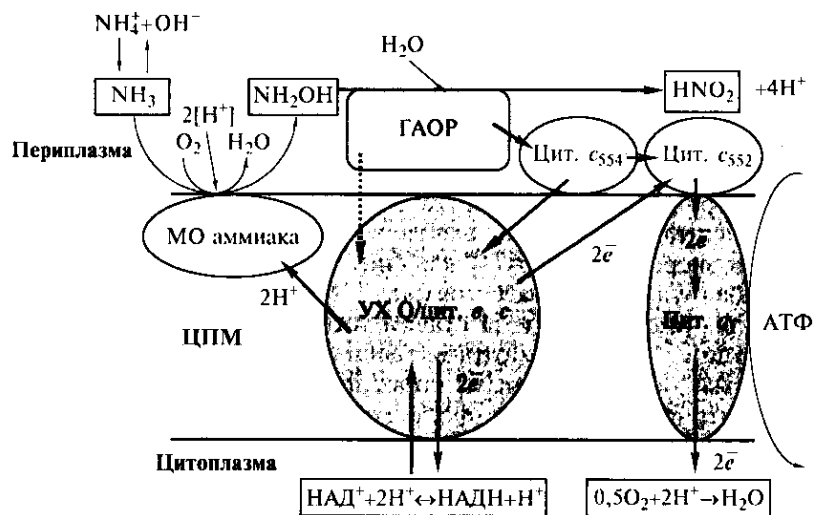
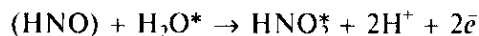


Рис. 125. Пространственная схема ЭТЦ окисления субстратов нитрификаторами I фазы (МО — монооксигеназа; ГАОР — гидроксиламин-оксидоредуктаза)

Клетка тратит большое количество субстрата для обратного переноса электронов и выработки НАДН, который используется при фиксации CO_2 (рис. 125). Именно поэтому нитрификаторы медленно растут ($g > 24$ ч) и накапливают мало биомассы. Гидроксиламин-оксидоредуктаза — это фермент с молекулярной массой около 200 кДа, имеющий структуру $\alpha_3\beta_3$ и находящийся в периплазме. С помощью меченых соединений показано, что осуществляются следующие реакции:

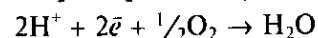
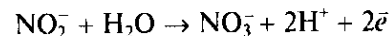


С активностью этого фермента связаны также активности монооксигеназы аммиака и цитохромоксидазы. Интересно отметить, что вырастить клетки на среде с гидроксиламином не удается (без аммиака гидроксиламин целыми клетками не окисляется).

Микроорганизмы II стадии ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) обычно поселяются рядом с микроорганизмами I стадии. Это грамотрицательные, в основном неподвижные клетки, образующие биопленки (табл. 22).

У первых двух родов имеются разрастания ЦПМ в виде тилакоидов. Организмы растут в аэробных (или микроаэробных) зонах, являются нейтрофилами (оптимум pH 7,5) и мезофилами с оптимумом температуры роста 28—30 °C. Они чувствительны к повышенной концентрации нитрата и кислорода. При низком pH (< 5,0)

нитрит диспропорционируется на нитрат и оксид азота. Если $\text{pH} \geq 7,0$, то микроорганизмы проводят реакции с участием фермента *нитритоксидоредуктазы*, мембрансвязанного белка, содержащего ион молибдена и железосерный кластер:



Подсчитано, что при окислении 14,5 моля NO_2^- в NO_3^- образуется $4 \cdot 10^7$ клеток *Nitrobacter*, при этом время генерации составляет 10—100 ч. На фиксацию 1 моля CO_2 требуется 85—115 молей NO_2^- (или для фиксации 1 г CO_2 нужно окислить 35 г NO_2^-). Установлено, что клетки *Nitrobacter* используют только 2—10 % энергии, заключенной в NO_2^- . Процесс образования карбоксисом для бактерий II фазы более редок, имеется развитая система мембран. Редокс-потенциал пары нитрит/нитрат равен +400 мВ, и электроны переносятся на уровень цитохромоксидазы, поэтому в результате генерируется 1 молекула АТФ (одно место сопряжения). АТФ также может образовываться за счет трансмембранного градиента протонов. Подсчитано, что для получения 1 моля НАДН необходимо окислить 5 молей нитрита с обратным переносом электронов.

Все нитрификаторы II фазы фиксируют углекислоту в цикле Кальвина, но способны и к миксотрофному росту. Некоторые представители *Nitrobacter* могут расти гетеротрофно.

Часть нитрификаторов способна использовать органические вещества (ацетат, казеин, пируват и т.д.), но преимуществ в росте при этом не получает. Процесс окисления аммиака в анаэробных условиях всегда идет автотрофно.

Некоторые гетеротрофные почвенные бактерии способны к так называемому процессу гетеротрофного окисления аммиака (аммония). При таком процессе ионы аммония окисляются до нитрата через гидроксиламин в качестве промежуточного соединения, а организмы не получают полезной метаболической энергии. Этот процесс наносит вред сельскому хозяйству, поскольку приводит к вымыванию связанных форм азота из почвы вследствие перевода аммонийного азота в более растворимые формы нитратного.

Водородные бактерии окисляют молекулярный водород и ассимилируют CO_2 . У аэробных форм конечным акцептором электронов служит кислород. Растут автотрофно на очень простой среде, по сути дела осуществляя реакцию «гремучего газа».

Водород — очень энергоемкий субстрат, дающий до трех молекул АТФ при прохождении электронов в ЭТЦ (рис. 126). С этим

Таблица 22

Некоторые свойства клеток нитрификаторов II фазы

Род	Форма клеток
<i>Nitrobacter</i>	Плейоморфные палочки
<i>Nitrococcus</i>	Кокки
<i>Nitrospira</i>	Спирали
<i>Nitrospina</i>	Тонкие палочки

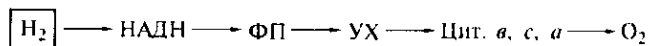


Рис. 126. ЭТЦ водородных бактерий при росте в автотрофных условиях

субстратом работают ферменты гидрогеназы, которые бывают двух типов: поглощающая (у водородоксиляющих микроорганизмов) и выделяющая (у микроорганизмов, образующих водород в процессе брожений, фототрофов и т.д.).

Обычно водород в атмосфере не накапливается, так как происходит реакция «гремучего газа»: $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$. Микроорганизмы проводят эту реакцию постепенно, в несколько стадий.

Водородиспользующие микроорганизмы найдены во многих систематических группах (табл. 23).

Alcaligenes eutrophus обладает цитохромами *a*, *b*, *c*, причем высокие концентрации цит. *c* обнаруживаются в периплазме. Этот микроорганизм имеет две плазмиды — большую и маленькую. Уста-

новлено, что некоторые компоненты гидрогеназ и ферментов цикла Кальвина закодированы в плаزمиде. Организм имеет два типа поглощающей гидрогеназы — растворимую и мембрансвязанную, содержащие в своем составе Ni^{2+} . Первая поставляет восстановленные пиридиннуклеотиды в цикл Кальвина, вторая восстанавливает НАД^+ , окисляющийся в ЭТЦ. Регуляция этих ферментов осуществляется по типу репрессии-дерепрессии. Организм является факультативным автотрофом и может аэробно расти на средах с глюкозой.

Hydrogenobacter thermophilus — типичный градиентный организм, растет при температуре 70°C на среде с $\text{H}_2:\text{CO}_2:\text{O}_2 = 75:10:15$ и при этом имеет «анаэробный» цикл фиксации CO_2 (восстановительный ЦТК, модифицированный цикл Арнона). Углекислота фиксируется в следующих реакциях цикла:

ацетил-КоА + $\text{CO}_2 \rightarrow$ пируват;

пируват + $\text{CO}_2 \rightarrow$ оксалоацетат;

сукцинил-КоА + $\text{CO}_2 \rightarrow$ оксоглутарил-КоА;

оксоглутарат + $\text{CO}_2 \rightarrow$ изоцитрат

Этот микроорганизм является облигатным автотрофом, не содержащим ферредоксина в ЭТЦ, а его пируват- и 2-оксоглутарат-дегидрогеназы — не НАД^+ -зависимые.

Bradyrhizobium japonicum имеет нитрогеназу, выделяющую H_2 , а при пониженном содержании кислорода наряду с нитрогеназой экспрессируется и гидрогеназа, связанная с мембранами и содержащая Ni^{2+} . Те диазотрофы, которые могут использовать как дополнительный источник энергии молекулярный водород, получают экологическое преимущество. Ферменты литотрофного метаболизма дерепрессируются низким содержанием (1–2 %) кислорода. Когда клетки растут в виде бактериоидов в клубеньках, они синтезируют цит. P_{420} , цит. *c* и флавопротеин-цитохромоксидазу, а в чистой культуре — цит. *a*, при этом конечные звенья ЭТЦ разветвлены.

Применение водородных бактерий связано с получением белка в качестве кормовой добавки. Молекулярный водород при этом получают электролизом воды, естественно, затрачивая энергию гидроэлектростанций. Водородные бактерии могут использоваться как поглотители углекислоты в замкнутых системах (подводные лодки, космические корабли и станции). Эти микроорганизмы интересны и как источник природных полимеров. Такие вещества (самое известное и распространенное — поли-β-оксимасляная кислота) синтезируются в качестве запасного продукта до 90 % по массе при росте водородных бактерий на глюкозе. Природные термопластики легко разрушаются микроорганизмами, поэтому они перспективны для применения в качестве добавок к упаков-

Таблица 23

Некоторые представители водородиспользующих микроорганизмов

Группа микроорганизмов	Микроорганизм	Путь фиксации CO_2
Автотрофы и миксотрофы	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Цикл Кальвина
	<i>A. hydrogenophilus</i>	Цикл Кальвина
	<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	Цикл Кальвина
	<i>Arthrobacter</i> sp. 11/x	Цикл Кальвина
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Цикл Кальвина
	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Цикл Арнона
	<i>Micrococcus ebruneus</i>	?
	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Цикл Кальвина
Ацетогены	<i>Paracoccus denitrificans</i>	Цикл Кальвина
	<i>Acetobacterium wieringae</i>	Ацетил-КоА-путь
	<i>A. woodii</i>	Ацетил-КоА-путь
	<i>Acetogenium kivui</i>	Ацетил-КоА-путь
Метаногены	<i>Clostridium acetium</i>	Ацетил-КоА-путь
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	Ацетил-КоА-путь
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	Ацетил-КоА-путь
Сульфидогены	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	Ацетил-КоА-путь
	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	Ацетил-КоА-путь

вочным материалам. Если такое вещество добавить к полиэтилену или полипропилену, то их разложение в природе пойдет значительно быстрее.

Есть микроорганизмы, способные использовать в своем метаболизме угарный газ (*карбоксидобактерии*). СО появляется, в основном, за счет антропогенного воздействия, горения лесов, извержения вулканов и в атмосфере подвергается фотоокислению до CO_2 .

Карбоксидобактерии похожи на водородных, часто эти активности пересекаются. Аэробные карбоксидобактерии обладают оксидазными системами, малочувствительными к угарному газу, а у анаэробов оксидазы отсутствуют. Многие фототрофы могут использовать СО в своем метаболизме.

Если СО служит микроорганизмам донором электронов, то акцептором может быть O_2 , S^0 , SO_4^{2-} , NO_3^- , Fe^{3+} , CO_2 .

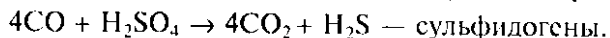
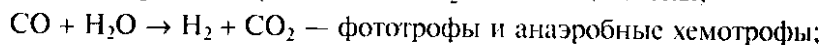
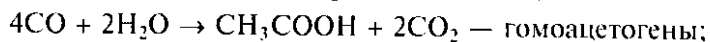
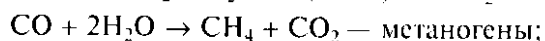
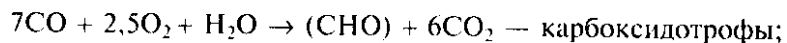
Некоторые микроорганизмы, растущие на СО, приведены в табл. 24.

При этом некоторые представители СО-окислителей — уникальны. Так, выделен анаэробный ацетоген, способный расти на 100 %-м угарном газе.

Окисление СО кислородом происходит в соответствии со следующей реакцией:



Разные группы микроорганизмов используют угарный газ различными путями:



У карбоксидотрофов обнаружен фермент СО-дегидрогеназа (обычно НАД⁺-зависимая) молекулярной массой 300 кДа, состоящая из трех субъединиц и содержащая молибден и FeS-кластер. Иногда гены, кодирующие этот фермент, находятся в плазидах.

Следующая группа хемолитоавтотрофов — *металлоокисляющие микроорганизмы*. Наиболее изученными представляются железоокисляющие организмы, использующие Fe^{2+} и окисляющие его до Fe^{3+} . Такие микроорганизмы легко обнаруживаются в природных водоемах в виде обрастаний нижней части водных растений. Например, *Galionella ferruginea* — это бобовидные клетки на ножке, состоящей из слизи, инкрустированной $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Fe^{2+} в аэробных условиях при pH 7,0 нестабилен, поэтому такие микроорганизмы обычно растут при низком содержании кислорода.

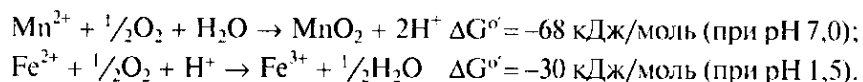
Микроорганизмы, использующие в метаболизме СО

Физиологическая группа	Организм
Типичные карбоксидотрофы	<i>Acinetobacter</i> sp.
	<i>Alcaligenes carboxydus</i>
	<i>Arthrobacter</i> sp. 11/x
	<i>Bacillus</i> sp. OMT2
	<i>B. schlegelii</i>
	<i>Pseudomonas carboxydoflava</i>
	<i>P. carboxydohydrogena</i>
	<i>P. carboxydovorans</i>
	<i>P. gazotropha</i>
	<i>P. thermocarboxydovorans</i>
Аутофиксаторы	<i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>
	<i>Azovorans</i> sp.
	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	<i>Azotobacter</i> sp. A1
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Метанотрофы	<i>Methylomonas methanica</i>
	<i>Methylosinus trichosporium</i>
	<i>Methylococcus capsulatus</i>
Ацетогены	<i>Acetobacterium woodii</i>
	<i>Clostridium formicoaceticum</i>
	<i>C. pasteurianum</i>
	<i>C. thermoaceticum</i>
	<i>Natroniella</i> sp. (100 % CO)
Метаногены	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
	<i>Methanosarcina barkeri</i>
	<i>Methanobrevibacter arbori philus</i>
	<i>Methanosaeta soehngenii</i>
Фототрофы	<i>Rhodocyclus gelatinosa</i>
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
	<i>Spirulina platensis</i>
Сульфатредукторы	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>
	<i>Desulfotomaculum acetoxydans</i>
	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> subsp. <i>cholonicus</i>
	<i>D. orientis</i>
	<i>D. vulgaris</i>

Большой вклад в изучение железоокисляющих микроорганизмов внесли С. Н. Виноградский и М. Бейеринк. *G. ferruginea* впервые выделена Х. Г. Эренбергом в 1836 г. Большинство железоокисляющих микроорганизмов — мезофилы, экстремальные термофилы встречаются только среди архей. Все они аэробы и ацидофилы, только *G. ferruginea* растет при нейтральном значении pH. Это градиентный микроорганизм, микроаэрофил, растущий на выходе подземных ключей. В остальных экологических нишах с pH < 7,0 (кислые шахтные воды) развиваются кислотоустойчивые железоокислители. Растущие в чехлах микроорганизмы рода *Leptothrix*, образуя слизь и Fe³⁺, постепенно выползают из чехла и инкрустируют его гидроксидом железа (III). В местообитаниях с низкой кислотностью среды (pH < 5,0), где Fe²⁺ стабилен, растут *Acidithiobacillus thiooxidans* и *A. ferrooxidans*. Развитие железоокисляющих микроорганизмов в трубах приводит к их забиванию слизью и Fe(OH)₃.

Следует учесть, что при окислении Fe²⁺ до Fe³⁺ энергии получается мало, поэтому субстрата должно быть окислено очень много. Для фиксации 1 М СО₂ требуется окислить 50 М Fe²⁺ (или для фиксации 48 г СО₂ необходимо окислить 2,8 кг Fe²⁺). Фермент Fe²⁺-оксидоредуктаза в качестве кофактора, вероятно, содержит рустицианин, небольшой голубой Cu-белок из класса купредоксина с E_h = +680 мВ. Однако более вероятно, что в природе идет такой процесс: 4FeS₂ + 2H₂O + 15O₂ → 4Fe³⁺ + 8SO₄²⁻ + 4H⁺. При pH 2,0 E_h_{Fe³⁺/Fe²⁺} = +650 мВ, т. е. электроны от Fe²⁺-оксидоредуктазы восстанавливают цитохром aa₃, ЭТЦ получается короткой с одним пунктом сопряжения, и запасается мало энергии.

Выделены микроорганизмы, способные окислять и другие металлы, например, Mn²⁺, устойчивый при щелочных pH, до Mn⁴⁺. Только для *Sulfolobus acidocaldarius* доказана четкая автотрофия при окислении марганца, при этом СО₂ фиксируется в цикле Кальвина. Окисление Mn²⁺ в Mn⁴⁺ более выгодно, чем окисление Fe²⁺ в Fe³⁺:



Окисление марганца термодинамически выгодно в интервале pH от 6 до 8, поэтому такие микроорганизмы растут в этом диапазоне кислотности среды. Окисление марганца с понижением pH становится менее выгодным, а для окисления железа зависимость обратная.

Ряд микроорганизмов при окислении металлов не получает энергии, а просто откладывает их оксиды в своих слизистых чехлах. Например, так накапливает оксид марганца *Crenothrix manganifera*.

Окислены могут быть металлы с переменной валентностью (Cu²⁺, U⁴⁺, As³⁺, Sb³⁺, Mo⁴⁺, Se⁰, Zn²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Au⁰ и т. д.). Такое окисление с получением энергии показано для ряда накопительных культур.

В табл. 25 приведены некоторые металлоокисляющие микроорганизмы.

Довольно большое число микроорганизмов способно окислять восстановленные соединения серы. Тиобациллы были выделены А. Натансоном в 1902 г., а в 1904 г. М. Бейеринк показал, что *Thiobacillus thioparus* и *T. thiooxidans* (в настоящее время относимый к роду *Acidithiobacillus*) используют в своем метаболизме сероводород. Эти микроорганизмы принимают участие в глобальном цикле серы, окисляя ее восстановленные соединения до сульфатов. В основном, это аэробы. В анаэробных условиях они проводят серозависимую нитратредукцию, но существовать без кислорода могут короткий период, активно покидая такие местообитания.

Сероводород образуется везде под действием аммонифицирующих микроорганизмов. Достигая аэробной зоны, он попадает в зону действия микроорганизмов, окисляющих серусодержащие соединения (например, *Beggiatoa*). Из застойных вод С. Н. Виноградским был выделен представитель рода *Beggiatoa*. Только в 1983 г. было показано, что *Beggiatoa* — факультативный автотроф. Один штамм, обладающий строгой автотрофией, недавно выделен из морских глубин в районе «черных курильщиков». Природные выходы серы на поверхность Земли (сульфатары) имеются в районах с вулканической активностью.

Традиционно организмы, окисляющие восстановленные соединения серы, подразделяют на две группы: 1) окисляют сероводород и откладывают элементарную серу в виде капель внутри клеток; 2) никогда серу внутри клеток не откладывают. К первой группе относятся морфологически своеобразные микроорганизмы: представители родов *Beggiatoa**, *Thiothrix**, *Thioploca*, *Thiospirillopsis*, *Achromatium*, *Thiobacterium*, *Macromonas**, *Thiospira*, *Thiovulum*, *Bilophococcus**. Это граммотрицательные бесцветные организмы, растущие на средах с H₂S, откладывающие серу в клетках, которая затем может использоваться для окисления после исчерпания сероводорода. Некоторые микроорганизмы движутся с помощью скольжения или жгутиков, представители родов *Achromatium* и *Thiobacterium* — неподвижны, многие образуют нити и чехлы. Клетки *Macromonas* достигают длины 100 мкм. Тяготеют к микроаэрофилии, растут на границе аэробной и анаэробной зон. Обладают отрицательным свето- и аэротаксисом, некоторые имеют магнитосомы. Только для отдельных представителей четко установлен тип метаболизма, поскольку лишь в четырех из десяти родов получены чистые культуры (в списке родов отмечены *). Выделение затруднено из-за того, что в слизистых чехлах часто растут микро-

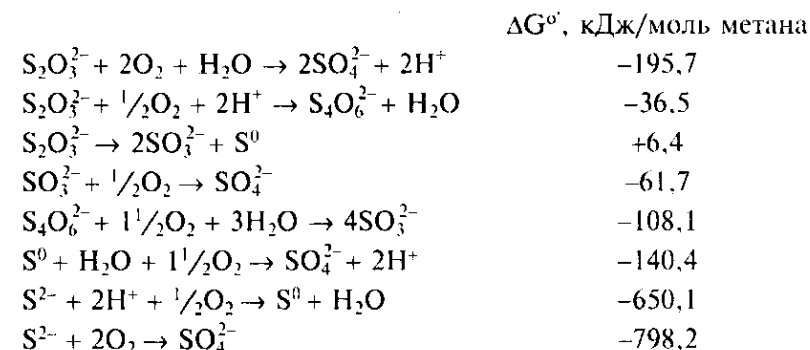
Примеры микроорганизмов, окисляющих металлы

Микроорганизм	Неорганический субстрат	Форма клеток	Место обитания
Бактерии			
<i>Автотрофы:</i>			
<i>Galionella ferruginea</i>	Fe ²⁺	Бобовидные палочки	Пресная вода
<i>Leptospirillum ferruginea</i>	Fe ²⁺	Изогнутые и спиральные палочки	Кислые шахтные воды
<i>Stibiobacter senarmontii</i>	Sb ³⁺	Плейоморфные палочки	Пресные воды
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Fe ²⁺ , S ⁰ , Se ⁰ , U ⁴⁺	Палочки	Кислые шахтные воды
<i>Гетеротрофы:</i>			
<i>Arthrobacter</i> sp.	Mn ²⁺ (?)	Плейоморфные палочки	Почва
<i>Bacillus megaterium</i>	Se ⁰ (?)	Палочки	Почва
<i>Bacillus</i> sp.	Mn ²⁺	Палочки	Пресные воды
<i>Citrobacter</i> sp.	Mn ²⁺ (?)	Палочки	Почва
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	Mn ²⁺ (?)	Почкующиеся палочки	Пресные и морские воды
<i>Leptothrix discophora</i>	Mn ²⁺ (?)	Искривленные палочки	Пресные воды
<i>Metallogenium personatum</i>	Mn ²⁺ (?)	Искривленные палочки	Пресные воды
<i>M. symbioticum</i>	Mn ²⁺ (?)	Искривленные палочки	Пресные воды
<i>Oceanospirillum</i> sp.	Mn ²⁺	Искривленные и спиральные палочки	Морские воды
<i>Pedomicrobium</i> sp.	Mn ²⁺ (?)	Почкующиеся палочки	Почва
<i>Pseudomonas</i> sp. S-36	Mn ²⁺	Палочки	Пресные воды
<i>Vibrio</i> sp.	Mn ²⁺	Искривленные палочки	Морские воды
Археи			
<i>Автотрофы:</i>			
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Mn ²⁺ , S ⁰ , Fe ²⁺	Лопастные и кокковидные клетки	Горячие источники

бы-спутники, от которых трудно избавиться. Считается, что тионовые бактерии — гетеротрофы или миксотрофы, склонные к олиготрофии. Предельная концентрация органических кислот для роста бесцветных нитчатых серных бактерий — 20 мМ (для ацетата это 1,2 г/л). Растут в зоне хемоклина стратифицированных озер, образуют налет на донных осадках. Оптимальная концентрация кислорода для роста 0,6—6 %. Формируют бактериальный фильтр на поверхности раздела фаз, не пропуская H₂S в атмосферу. В зоне «черных курильщиков» иногда формируются монокультуры *Beggiatoa*, а первичная продукция органического вещества в этом случае обеспечивается за счет хемолитоавтотрофии. Также серные бактерии участвуют в образовании матов толщиной до 60 см и диаметром до 32 м, где толстые и длинные клетки *Beggiatoa* служат структурообразующим элементом.

Вторая группа (тиобациллы) представлена наиболее изученными родами *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, проводящими процесс до образования сульфата. Микроорганизмы первых двух родов отличаются по отношению к pH: первые растут при слабокислых значениях pH, а ацидитиобациллы — при pH < 4,0 (до 1,5). Большинство представителей этой группы — мезофилы, имеющие широкое распространение. Обитают они в почвах, соленых болотах, в зоне термоклина стратифицированных озер, в сольфатарах, там, где на выходе горячих серных источников на поверхности образуются желтые осадки элементарной серы, в сточных водах, в кислых шахтных водах (pH 2,5—1,5). Иногда для «исправления» щелочных почв в них вносят серу, и находящиеся в почвах тиобациллы подкисляют среду, образуя SO₄²⁻. При температуре выше 50 °C серу окисляют археи (*Sulfolobus*, *Acidianus*) или представители рода *Sulfobacillus*.

Возможные реакции окисления восстановленных соединений серы характеризуются разными значениями свободной энергии:



В 1987 г. было показано, что у *Desulfovibrio* и *Desulfobacter* может идти реакция диспропорционирования тиосульфата:

Фотосинтез

Общая характеристика процесса. Принципиально иным способом энергетического метаболизма в мире микробов можно считать использование световой энергии, или фотосинтез. Многие микроорганизмы могут поглощать энергию света и использовать ее для синтеза АТФ и восстановительных эквивалентов. Этот процесс, в котором световая энергия поглощается и преобразовывается в химическую энергию, и называется фотосинтезом. Фотосинтез — один из наиболее важных метаболических процессов на Земле, так как почти вся наша энергия происходит от энергии Солнца. Эта энергия дает возможность фотосинтезирующим организмам образовывать органический материал для роста. В то же время фотосинтетики являются первичными продуцентами в пищевых цепях в биосфере. Фотосинтез также восполняет наши потребности в кислороде. Способность к фотосинтезу наблюдается в разных систематических группах, как среди эукариот, так и среди прокариот. Это, прежде всего, высшие растения, а также многоклеточные зеленые, бурые, красные и одноклеточные эвгленовые, диатомовые и динофлагеллятные водоросли (эукариоты). Среди прокариот к фотосинтезу способны цианобактерии и прохлорофиты, зеленые серные и несерные бактерии, пурпурные серные и несерные бактерии, гелиобактерии и галоархеи. Следует учесть, что больше половины фотосинтетических реакций Земли проводят микроорганизмы.

Возбужденная светом молекула пигмента может энергию рассеивать, передавать и преобразовывать в химическую связь. Фотосинтетический аппарат состоит из светособирающих ловушек (антенн), реакционных центров (РЦ), электронтранспортной цепи (ЭТЦ) и локализован в мембранных структурах. Эти структуры усложняются от гелиобактерий (ЦПМ), через пурпурные бактерии (внутриклеточные выросты ЦПМ различной формы) до зеленых (хлоросомы и ЦПМ) и цианобактерий (фикобилисомы и тилакоиды), рис. 129. РЦ и антенна составляют фотосинтетическую единицу. Время перехода электрона в другие энергетические состояния равно $\sim 10^{-9} - 10^{-12}$ с.

Процесс фотосинтеза делится на две стадии. В световых реакциях энергия света поглощается и преобразуется в химическую энергию. В темновых реакциях эта энергия используется для восстановления или фиксации CO_2 и синтеза клеточных компонентов.

Основными фотосинтетическими пигментами, участвующими в световых реакциях у эукариот и цианобактерий, являются хлорофиллы. Разновидности хлорофилла, наиболее важные из которых хлорофиллы *a* и *b* (Chl *a*, Chl *b*), различаются своими свойствами и максимумами поглощения (Chl *a* — 665 нм, Chl *b* — 645 нм

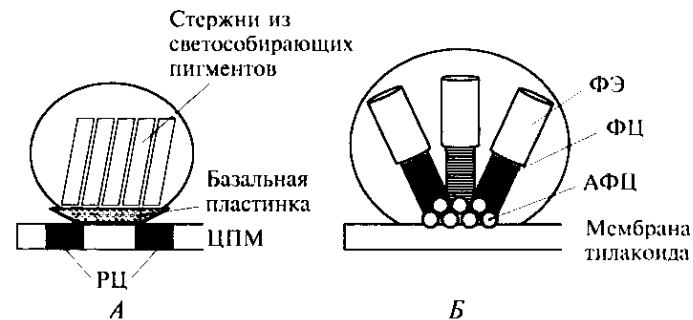


Рис. 129. Мембранные структуры фотосинтетического аппарата у зеленых бактерий (А) и цианобактерий (Б) (РЦ — реакционный центр; АФЦ — аллофикоцианин; ФЦ — фикоцианин; ФЭ — фикоэритрин);

А — хлоросома; Б — фикобилисома

«красный свет» и 430 нм «голубой свет»). Другие широко распространенные пигменты — каротиноиды (β -каротин у прохлорофит и большинства водорослей и фукоксантин у динофлагеллят, диатомовых и бурых водорослей). Красные водоросли и цианобактерии имеют фикобилипротеины — фикоэритрин (красный пигмент с максимумом поглощения 550 нм) и фикоцианин (синий пигмент с максимумом поглощения 620—640 нм). Их также называют вспомогательными пигментами, поглощающими свет там, где хлорофиллы не могут эффективно адсорбировать энергию ($\lambda = 470 - 630$ нм), и затем передающими поглощенную энергию к хлорофиллу. Это позволяет использовать более широкий спектр световых волн. Вспомогательные пигменты также защищают клетки от высокой интенсивности солнечного света, приводящей к окислению и повреждению фотосинтетического аппарата.

Хлорофиллы и вспомогательные пигменты объединены в высокоорганизованные образования, называемые антеннами, цель которых уловить как можно больше фотонов. В антенну входит около 300 молекул хлорофилла. Световая энергия улавливается антеннами и передается от одного хлорофилла к другому, пока не достигнет специального хлорофилла реакционного центра, непосредственно включенного в фотосинтетический транспорт электронов. У эукариот и цианобактерий имеется два вида антенн, ассоциированных с двумя разными фотосистемами. Фотосистема I (ФС I) адсорбирует более длинноволновый свет ($\lambda \geq 680$ нм) и энергия попадает к хлорофиллу *a*, обозначаемому P_{700} . Фотосистема II (ФС II) поглощает свет более коротковолновый ($\lambda \leq 680$ нм) и передает энергию на специальный хлорофилл P_{680} .

Когда антенны ФС I передают световую энергию к хлорофиллу P_{700} реакционного центра, он переходит в возбужденное состояние и передаст высокоэнергетичный электрон специфическому

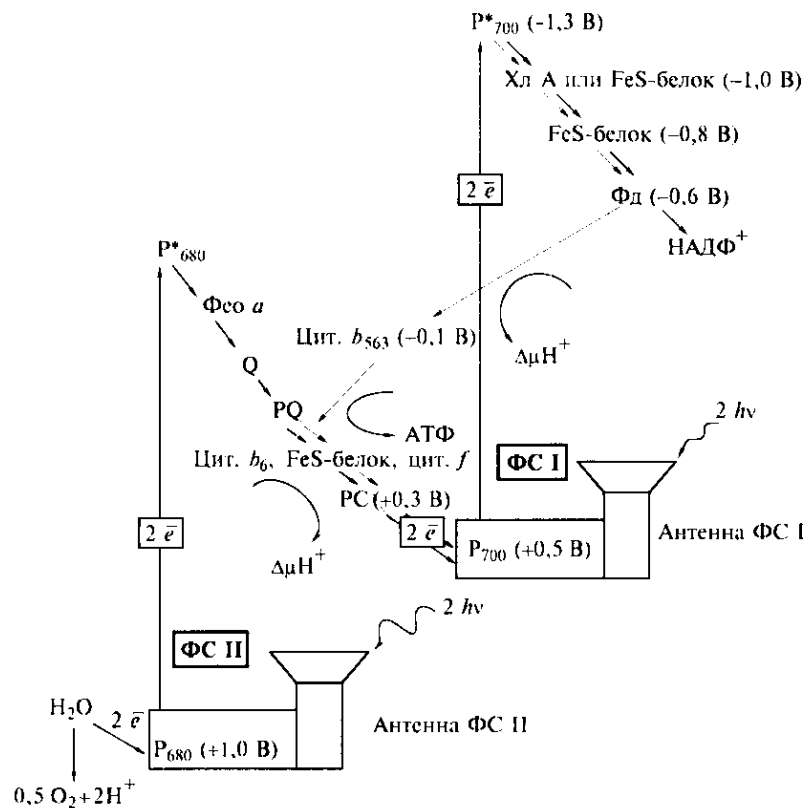


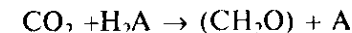
Рис. 130. Схема световых реакций фотосинтеза у эукариот и цианобактерий (--- — циклический путь; — — нециклический путь; ФС I и ФС II — фотосистемы I и II соответственно; P_{680} и P_{700} — хлорофиллы-пигменты фотосинтеза; Фео — феофитин; Q — хинон; PQ — пластохинон; PC — пластоцианин; Хл А — хлорофилл А; Фд — ферредоксин)

акцептору (специальному хлорофиллу А или FeS-белку, рис. 130). Далее электрон передается ферредоксину, а потом может пойти по двум путям. При циклическом пути электрон движется через ряд переносчиков обратно к окисленному P_{700} . При этом на участке цитохрома b_6 синтезируется АТФ. Этот процесс называется *циклическим фотофосфорилированием* (работает только ФС I).

При нециклическом пути задействованы две фотосистемы. P_{700} возбуждается и передает электрон на ферредоксин, как и в циклическом пути. Однако здесь ферредоксин восстанавливает НАДФ⁺ до НАДФН. Так как электрон потрачен на восстановительный эквивалент и не может восстановить окисленный P_{700} , необходимо участие ФС II. Именно она дает электроны для восстановления P_{700} . Антенны ФС II поглощают свет и передают энергию на P_{680} .

который переходит в возбужденное состояние и восстанавливает феофитин а (хлорофилл а, в котором центральный атом магния замещен двумя атомами водорода). Электроны последовательно передаются через хиноны (пластохинон) и ряд переносчиков к P_{700} . Хлорофилл-пигмент P_{680} получает необходимые электроны из окисления воды с выделением O_2 (*кислородный фотосинтез*). Таким образом, при движении двух электронов от воды до НАДФ⁺ синтезируется 1 молекула АТФ путем *нециклического фотофосфорилирования*. Фотосинтетический транспорт электронов происходит в мембранах (рис. 131).

Световая стадия фотосинтеза у зеленых и пурпурных бактерий происходит несколько иначе. К. Б. ван Ниль на их примере показал существование *аноксигенного фотосинтеза*, когда донором электронов является не вода, а другие вещества (H_2S , S^0 , H_2 , органика). Тогда уравнение фотосинтеза в общем виде может быть записано так:



Пурпурные бактерии не образуют НАДФН непосредственно в световых реакциях фотосинтеза, а зеленые бактерии могут восстанавливать НАДФ⁺ во время световой стадии. Чтобы синтезировать восстановительные эквиваленты, зеленые и пурпурные бактерии должны использовать доноры электронов с более отрицательным потенциалом, чем вода, и, таким образом, легче окисляемые. Наконец, зеленые и пурпурные бактерии имеют другие фотосинтетические пигменты, называемые бактериохлорофиллами (Bchl), с максимумами поглощения при более длинных волнах. *In vivo* Bchl а поглощает при 830—890 нм, а Bchl b — от 1020

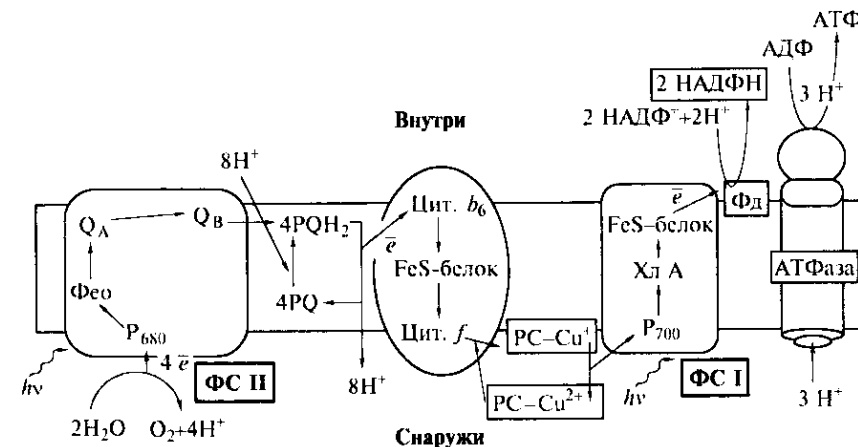


Рис. 131. Транспорт электронов при фотосинтезе (обозначения см. на рис. 130)

до 1040 нм. Такие пики поглощения помогают лучшей адаптации этих микроорганизмов в их экологических нишах. Все бактериохлорофиллы имеют в центре молекулы Mg^{2+} , связанный координационными связями с четырьмя тетрапиррольными кольцами, а отличаются заместителями при этих кольцах.

Все эти различия являются следствием отсутствия у них ФС II: они не могут использовать воду как донор электронов в нециклическом электронном транспорте, образовывать кислород из воды при фотосинтезе и обладают только циклическим фотофосфорилированием. Почти все пурпурные и зеленые бактерии — строгие анаэробы.

Схема фотосинтеза у пурпурных несерных бактерий представлена на рис. 132. Бактериохлорофилл *a* реакционного центра возбуждается и передает электрон на бактериофеофитин. Электрон проходит через хинон и ряд переносчиков назад к R_{870} , восстанавливая его. При этом на уровне цитохромов образуется АТФ. Чтобы синтезировать восстановительные эквиваленты, необходимо либо использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, который может напрямую восстановить $НАД^+$, либо осуществить обратный перенос электронов с затратой АТФ.

Схема фотосинтеза у зеленых серных бактерий несколько иная (рис. 133). Из схемы видно, что есть различие в переносчиках электронов, а также что восстановительные эквиваленты могут синтезироваться путем простого нециклического процесса от ферредоксина, если внешние доноры электронов (H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$ и др.) будут восстанавливать R_{840} . Подобная принципиальная схема фотосинтеза обнаружена у еще одной группы фототрофных микроорганизмов — гелиобактерий.

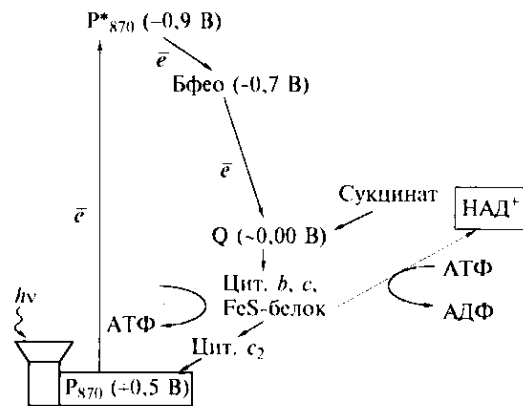


Рис. 132. Схема фотосинтеза у пурпурных несерных бактерий (----> — обратный перенос электронов; P_{870} — бактериохлорофилл *a*; Бфео — бактериофеофитин; Q — хинон)

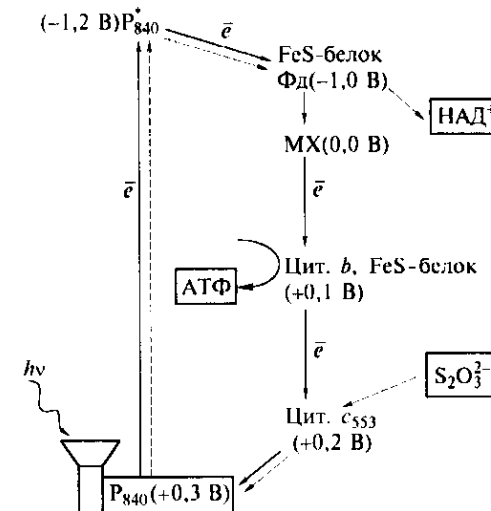


Рис. 133. Схема фотосинтеза у зеленых серных бактерий (—> — циклический путь; ----> — нециклический путь; МХ — менахинон)

Запасенная в световых реакциях энергия и восстановители затрачиваются затем в *темновых реакциях ассимиляции* CO_2 , которая может происходить неодинаково у разных микроорганизмов.

Группы фототрофных микроорганизмов. Если расположить группы фототрофов в порядке их открытия, то получится следующая последовательность: пурпурные бактерии, зеленые серные бактерии, цианобактерии, галобактерии (галоархеи), зеленые несерные бактерии, прохлорофиты, аэробные аноксигенные бактерии (эритробактерии, «квазифототрофы») и гелиобактерии. Микроорганизмы, осуществляющие бактериальный фотосинтез, сгруппированы в определенные кластеры на филогенетическом древе (рис. 134).

Пурпурные бактерии относятся к классам Alpha-, Beta- и Gammaproteobacteria (рис. 135). Это достаточно разнородная группа. Сем. Chromatiaceae включает микроорганизмы, способные к автотрофии и откладывающие элементарную серу внутри клеток. В качестве доноров электронов для фотосинтеза используют H_2S и S^0 . Фотосинтетические пигменты — Bchl *a*, *b* и каротиноиды четырех типов. Организмы сем. Ectothiorhodospiraceae также используют H_2S и S^0 и могут расти автотрофно, но элементарную серу откладывают вне клеток. Среди них много морских и алкалофильных видов. Порядки Rhodospirillales, Rhodobacterales, Rhodocyclales объединяют так называемые пурпурные несерные бактерии, которые не накапливают серу внутри клеток и растут преимущественно фотогетеротрофно. В микроаэрофильных и аэробных условиях способны расти в темноте. Все пурпурные бактерии одно-

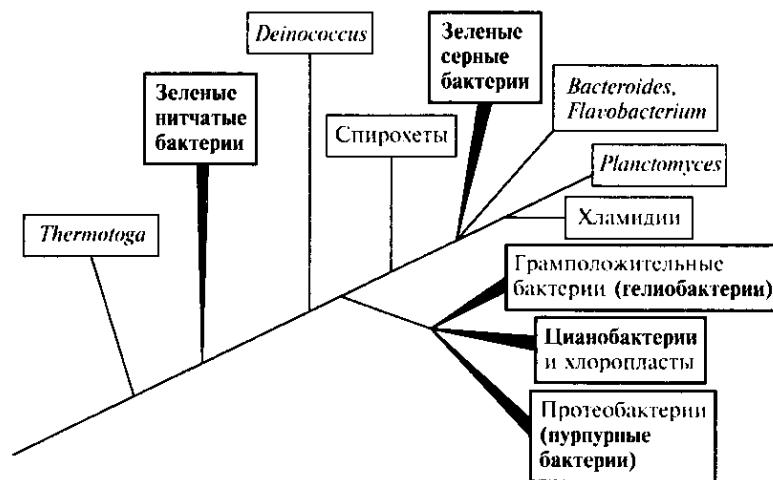


Рис. 134. Расположение групп фототрофных микроорганизмов на филогенетическом древе

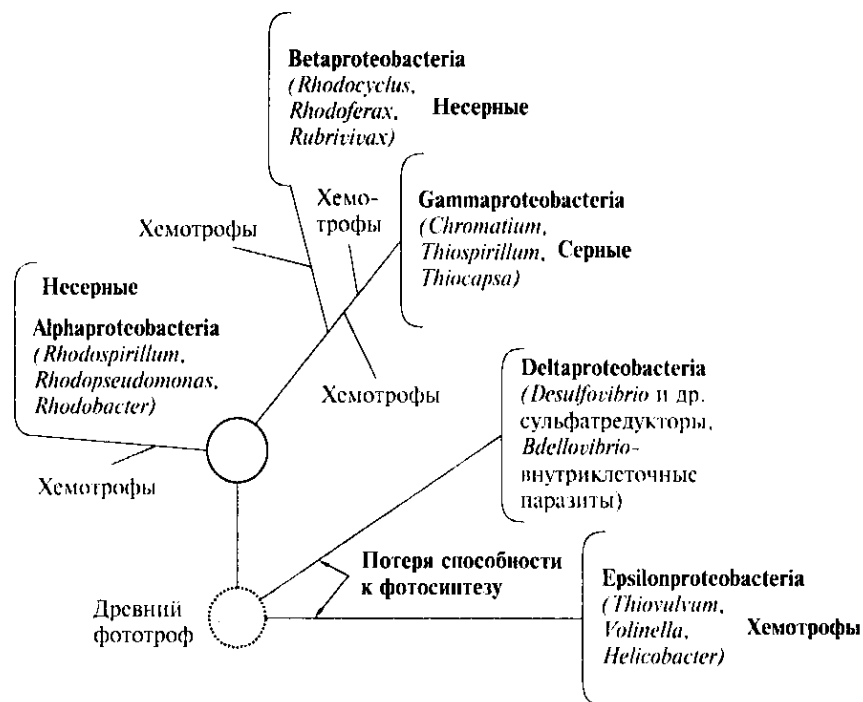


Рис. 135. Место пурпурных бактерий в филуме Proteobacteria

клеточные, но могут образовывать устойчивые сочетания клеток (диплококки, тетрады, сеточки, таблички и т.д.). Клетки разной формы и размеров. Есть неподвижные и имеющие жгутики. Ряд водных форм содержит газовые вакуоли. Подвижные виды обладают активным фототаксисом. Размножаются бинарным делением или почкованием. Некоторые могут образовывать цисты и экзоспores. Клеточная стенка грамтрицательного типа, покрытая слизистым слоем или капсулой, у некоторых представителей имеется S-слой из гексагонально расположенных белков. В качестве запасных веществ у них обнаружены поли-β-гидроксиалканойаты и гликоген. Синтез бактериохлорофиллов подавляется кислородом, но может идти в темноте. Из переносчиков у пурпурных бактерий обнаружены цитохромы, FeS-белки и тиоредоксины, убикиноны и менахиноны.

Предпочитают расти на свету в анаэробных условиях, к росту в темноте способны в основном пурпурные несерные бактерии. Для большинства представителей необходима высокая интенсивность света (~500 лк), только род *Amoebobacter* требует низкой освещенности (50—100 лк) при пониженных температурах роста. Большинство видов мезофилы, психроактивные организмы включают *Amoebobacter* и *Lamprocystis*, а термофильные виды относятся к родам *Halorhodospira*, *Rhodocista*, *Thermochromatium*. Экстремальных термофилов среди пурпурных бактерий не обнаружено. В основном, это нейтрофильные микроорганизмы (pH 6—8), но есть кислото- (*Rhodobacter acidophila*) и щелочелюбивые (*Ectothiorhodospira*, *Halospira*). Эти же роды содержат экстремально галофильных представителей, синтезирующих осмопротекторы (глицин-бетаин, эктоин, трегалозу).

Пурпурные несерные бактерии нуждаются в витаминах, пурпурные серные — прототрофы. Используют широкий спектр соединений азота, многие способны к азотфиксации. Источниками углерода могут быть углекислый газ и органические вещества (в том числе C₁-соединения). Для *Thiocapsa* и *Chromatium* показан хемолитоавтотрофный рост с молекулярным водородом и сульфидом в качестве доноров электронов. При автотрофном росте CO₂ фиксируется в цикле Кальвина, активность которого подавляется добавлением органики. В темноте роль органических веществ как источника энергии увеличивается, происходят брожения разного типа. Энергия может также получаться путем анаэробного дыхания с сульфатом, нитратом, серой, Fe³⁺, CO и органическими соединениями в качестве акцепторов электронов. Сахара используют через гликолиз или КДФГ-путь. Имеют полный или незамкнутый ЦТК и глиоксислатный шунт. У ряда пурпурных несерных бактерий без глиоксислатного шунта (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*) обнаружен цитрамалатный цикл, в котором ацетил-KoA превращается в глиоксислат в цепи

реакций: ацетил-КоА + пируват → цитрамалил-КоА → цитрамалат → мезаконат → мезаконил-КоА → 3-метилмалил-КоА → глиоксилат + пропионил-КоА. Образованный глиоксилат включается в ЦТК при участии малатсинтазы, а пируват регенирирует из пропионил-КоА через карбоксилазную реакцию: пропионил-КоА → метилмалонил-КоА → сукцинил-КоА → сукцинат → фумарат → малат → оксалоацетат → ФЕП → пируват.

Зеленые бактерии подразделяют на два филума: В6 — Chloroflexi (зеленые несерные бактерии) и В11 — Chlorobi (зеленые серные бактерии). Зеленые серные бактерии — это филогенетически однородная группа.

Филум В11. Chlorobi

Класс 1. Chlorobia

Порядок 1. Chlorobiales

Семейство 1. Chlorobiaceae

Род 1. *Chlorobium*

Род 2. *Ancalochloris*

Род 3. *Chloroherpeton*

Род 4. *Pelodictyon*

Род 5. *Prosthecochloris*

Микроорганизмы относят к строгим анаэробам, осуществляющим анаэробный фотосинтез. Большинство — фотоавтотрофы, использующие H_2S и S^0 в качестве доноров для фотосинтеза. Содержат Bchl *a*, *c*, *d* или *e* и каротиноиды циклического типа. Светособирающие пигменты находятся в хлоросомах (хлоробиум-везикулах). Хлоросомы покрыты белковой оболочкой и прикреплены к внутренней стороне ЦПМ базальной пластинкой.

Это граммотрицательные организмы, неподвижные или скользящие палочки, вибрионы или нити, не содержащие внутрицитоплазматических мембран. Многие имеют простеки, которые увеличивают всасывающую и светособирающую поверхности. Некоторые содержат газовые вакуоли. Накапливают в клетках гликоген, а элементарную серу откладывают снаружи. Из переносчиков электронов обнаружены цитохромы *c* и *b*, а также менахины. Облигатные анаэробы и фототрофы. Основное число видов — мезофилы и нейтрофилы, ряд форм относится к галотолерантным. По отношению к интенсивности света делятся на две группы: первая требует высокой освещенности, а вторая способна существовать на глубинах до 80 м при очень слабом освещении. Некоторым необходим витамин B_{12} . Микроорганизмы предпочитают соли аммония, так как лишь у немногих есть способность к ассимиляционной нитратредукции. Нуждаются в восстановленных соединениях серы, поскольку ассимиляционная сульфатредукция у этих бактерий отсутствует. Имеют незамкнутый ЦТК, глиоксилатного шунта нет. Органические вещества используют ограниченно. Анапле-

ротические функции в этих случаях выполняют многочисленные реакции карбоксилирования. Ассимиляция CO_2 происходит через цикл Арнона, или *восстановительный ЦТК* (рис. 136). Он считается анаэробным циклом, поскольку включает много ферментов и восстановителей (ферредоксинов), которые чувствительны к O_2 (из аэробных бактерий таковой обнаружен только у *Hydrogenobacter*). Общая формула ассимиляции имеет вид



Ассимиляция углекислоты в этом цикле идет с большой затратой АТФ и восстановительных эквивалентов.

Зеленые нитчатые (несерные) бактерии филогенетически далеко отстоят от зеленых серных бактерий.

Филум В6. Chloroflexi

Класс 1. Chloroflexi

Порядок 1. Chloroflexales

Семейство 1. Chloroflexaceae

Род 1. *Chloroflexus*

Род 2. *Chloronema*

Род 3. *Heliothrix*

Семейство 2. Oscillochloridaceae

Род 1. *Oscillochloris*

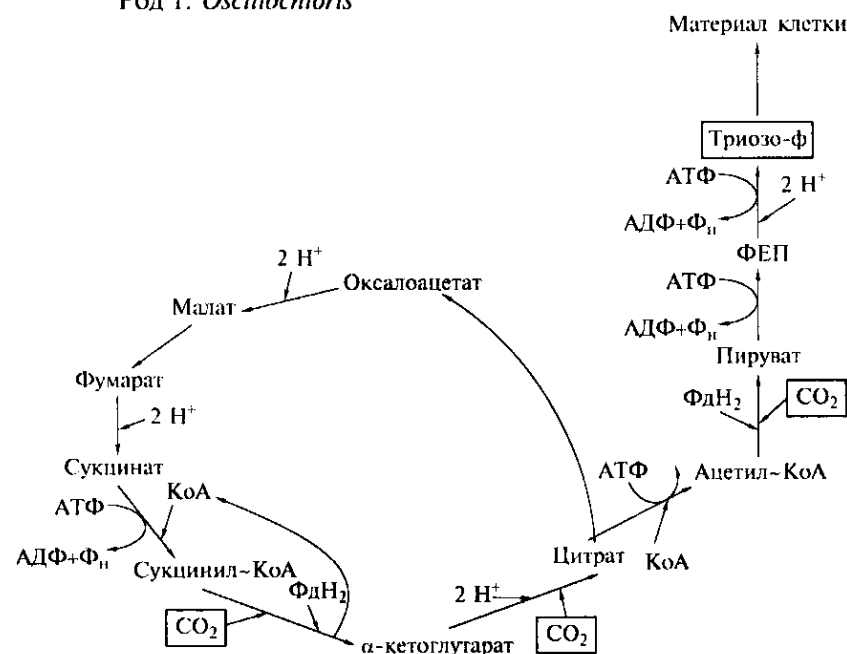


Рис. 136. Цикл Арнона у зеленых серных бактерий

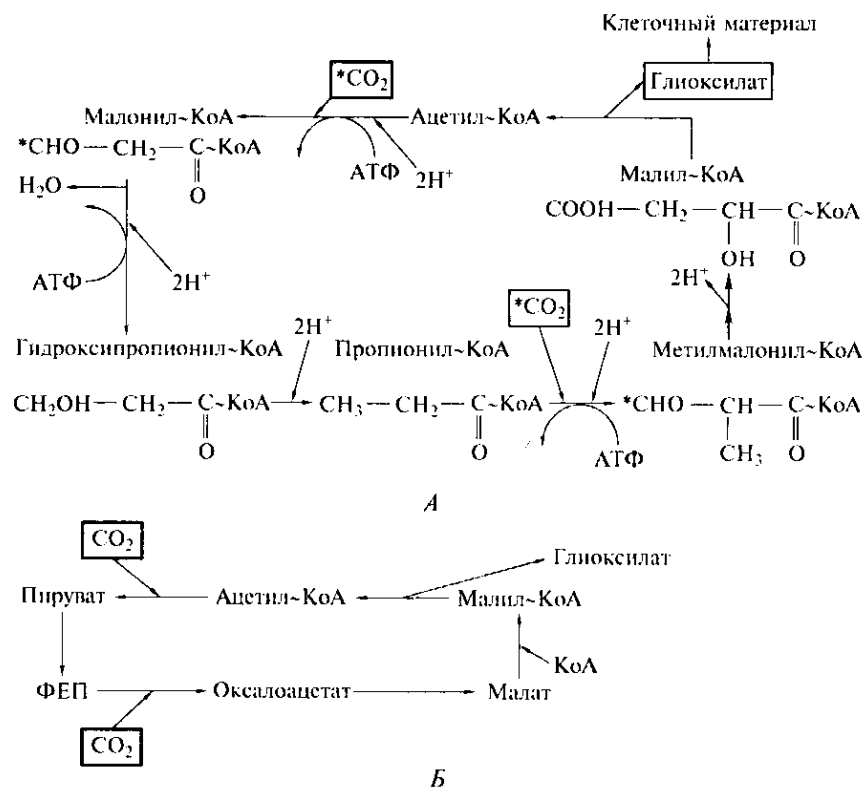


Рис. 137. Ассимиляция углекислоты у зеленых несерных бактерий: А — гидроксипропионатный цикл; Б — восстановительный цикл дикарбоновых кислот

Микроорганизмы второго порядка *Herpetosiphonales* не способны к фотосинтезу.

Зеленые несерные бактерии имеют палочковидные клетки, собранные в нити, с чехлами или без них, передвигающиеся скольжением и обладающие рядом таксисов. Некоторые обладают газовыми вакуолями. Запасают поли-β-гидроксиалканаты и полиглюканы. Клеточные стенки содержат значительные количества ненасыщенных и неразветвленных жирных кислот. Вспомогательные пигменты представлены β-, γ-каротином или миксобактином. Фотосинтетический аппарат локализован в хлоросомах и ЦПМ. Из переносчиков найдены цитохромы *b*, *c*, менахины 8 и 9, FeS-белки. Бактериохлорофиллы синтезируют на свету и в темноте, но в отсутствие кислорода. Представители этой группы требуют для фотосинтеза высокой интенсивности света, донорами при фотосинтезе могут быть сероводород и молекулярный водород.

Способны к фотоавтотрофии, но предпочитают фотогетеротрофный образ жизни. Имеют полный ЦТК и глиоксилатный шунт и могут использовать широкий набор органических субстратов. Среди зеленых несерных бактерий есть мезофильные и термофильные формы. Растут при pH 7,0—9,0, некоторые требуют повышенной концентрации NaCl (5—12 % по массе). Отдельные представители нуждаются в наборе витаминов. Азот потребляют в виде солей аммония и органических соединений. Все зеленые несерные бактерии обладают значительной толерантностью к H₂S. *Chloroflexus* способен к ассимиляционной сульфатредукции. У зеленых несерных бактерий обнаружен необычный цикл фиксации CO₂ — гидроксипропионатный путь, с суммарным уравнением $2CO_2 + 4H^+ + 3ATP \rightarrow$ глиоксилат (рис. 137, А). У отдельных штаммов *Chloroflexus* имеется и более простой цикл — восстановительный цикл дикарбоновых кислот (рис. 137, Б). У ряда организмов, не имеющих глиоксилатного шунта, при росте на органических субстратах эти пути могут играть роль анаплеротических реакций.

У представителей рода *Oscillochloris* показана фиксация углекислоты в цикле Кальвина и азотфиксация. Существенные отличия этих микроорганизмов от других зеленых нитчатых бактерий привели к выделению их в отдельное семейство.

Следует заметить, что для многих представителей этого филума вопрос о способе питания и метаболических путях остается открытым, поскольку выделение нитчатых организмов в чистые культуры представляет значительную трудность из-за существования в их слизистых чехлах многочисленных микроорганизмов-спутников.

Гелиобактерии по молекулярно-биологическим критериям отнесены к грамположительным бактериям с низким содержанием Г + Ц в ДНК.

Филум B13. Firmicutes

Класс 1. Clostridia

Порядок 1. Clostridiales

Семейство 6. Heliobacteriaceae

Род 1. *Heliobacterium*

Род 2. *Heliobacillus*

Род 3. *Heliophilum*

Род 4. *Heliorestis*.

Эти микроорганизмы имеют атипичную клеточную стенку: муреин по строению близок к грамположительному типу, у них отсутствуют липополисахариды, наличие белкового слоя варьирует, а клетки красятся по Граму отрицательно. В природных местообитаниях способны образовывать эндоспоры, но в лабораторной культуре это свойство теряется. Одноклеточные плейоморф-

ные палочковидные или спиральные организмы могут передвигаться путем скольжения или с помощью жгутиков. Фотосинтетический аппарат локализован в ЦПМ и построен по принципу ФС I. Содержат Bchl *g* и минорные количества окисленной формы Chl *a* в реакционном центре. Каротиноиды представлены C₃₀-производными нейроспорина. Из переносчиков найдены цитохромы *c*, *bc*, и менахиноны. На свету растут только в анаэробных условиях при высокой интенсивности света. В темноте могут существовать как микроаэрофилы. Предпочитают фотогетеротрофный образ жизни. В качестве доноров электронов могут использовать восстановленные соединения серы и молекулярный водород. У некоторых показана ассимиляционная сульфатредукция. В темноте способны к серному дыханию, активные азотфиксаторы. Ассимиляция небольшого числа органических субстратов происходит в реакциях карбоксилирования. Цикл Кальвина не обнаружен и пока не доказана фиксация углекислоты через какой-либо другой цикл. В темноте способны к сбраживанию пирувата с образованием ацетата.

Одной из обширнейших групп фотосинтезирующих микроорганизмов являются *цианобактерии*, особенности фотосинтетического аппарата которых были отмечены выше. Затруднения в переходе к их бактериологической систематике объясняются во многом сложностями получения чистых культур этих микроорганизмов. Поэтому в настоящее время классификация традиционно базируется на «ботанических» принципах.

Филум B10. Cyanobacteria

Подсекция I — одноклеточные или живущие в агрегатах организмы. Скопления окружены чехлами или слизью (*Gloeotheca*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Microcystis*, *Chroococcus*, рис. 138, А). По современной классификации сюда же относят и роды *Prochloron*, *Prochlorococcus*.

Подсекция II — организмы, размножающиеся с помощью *баеоцитов*, когда содержимое большой клетки претерпевает множественное деление на маленькие, часто подвижные клеточки, которые необходимы для освоения пространства, затем достигающие до размеров материнской клетки (*Pleurocapsa*, *Dermocarpella*, *Cyanocystis*, *Stanieria*, рис. 138, Б).

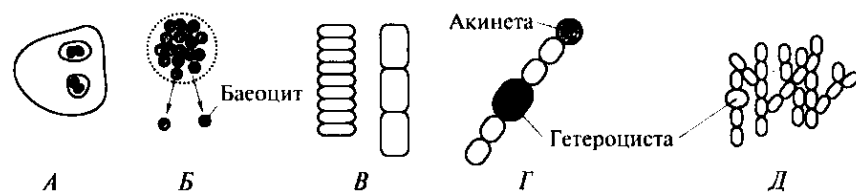


Рис. 138. Типичная морфология цианобактерий разных подсекций (А—Д)

Подсекция III — нитчатые организмы без специализированных клеток (*Spirulina*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Trichodesmium*, *Prochlorothrix*, рис. 138, В).

Подсекция IV — неветвящиеся нити со специализированными клетками (*Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Cylindrospermum*, рис. 138, Г).

Подсекция V — нити с истинным ветвлением и специализированными клетками, формирующие многоядные трихомы (*Fischella*, *Stigonema*, *Mastigocladus*, *Geitleria*, рис. 138, Д).

Цианобактерии — самые древние из организмов, способных к окислительному фотосинтезу, — имеют отдаленное родство с грамположительными бактериями. У цианобактерий другие жирные кислоты (с двумя двойными связями). Клеточные стенки — грамотрицательные, состоящие из четырех слоев (муреин и три прозрачных слоя). На поверхности может присутствовать белковый S-слой. Морфология очень разнообразна. Многие представители имеют внешние оболочки, способствующие агрегации клеток. Чехлы могут быть структурированными и инкрустированными различными веществами, поэтому часто сохраняются в виде окаменелостей и образуют строматолиты. В трихомах поверхностные структуры могут быть общими для всех клеток, связанных плазмодесмами. У цианобактерий наблюдается большое разнообразие внутриклеточных структур. Это и газовые вакуоли у водных форм, способствующие их флотации, и фотосинтетические мембраны. Фотосинтетический аппарат локализован в тилакоидах, а светособирающие пигменты собраны в фикобилисомы. В реакционных центрах содержится только Chl *a* (P₇₀₀ и P₆₈₀). Фикобилисомы, имеющие полусферическую или полудисковидную форму, располагаются на наружной стороне тилакоидов и содержат фикоэритрин (565 нм), фикоцианин (600 нм), а также их модификации, каротиноиды разных типов и светособирающие формы хлорофиллов. ЭТЦ построена по Z-схеме, причем переносчики электронов похожи по составу на растительные (пластохинон и пластоцианин, НАД⁺ и НАДФ⁺, флавопротеиды, цитохромы, в том числе *f*).

Некоторые цианобактерии образуют специализированные клетки с утолщенной клеточной стенкой — *гетероцисты* — основное место азотфиксации. Здесь отсутствует ФС II, а в качестве восстановителей используются сахара, транспортируемые через плазмодесмы из соседних клеток. В гетероцистах не функционирует цикл Кальвина, но имеется пентозофосфатный путь. Через плазмодесмы передаются также соединения азота и регуляторные вещества (L-метионин). У *Gloeotheca* азотфиксация идет в обычных вегетативных клетках, в которых также нет ФС II. Некоторые безгетероцистные цианобактерии фиксируют азот в обычных клетках, но только в анаэробных условиях. У нитчатых цианобактерий могут

образовываться *гормогонии* — части нити для размножения, с активным скользящим движением. Другой способ размножения — образование множества мелких, часто подвижных клеток — *баеоцитов*. Цианобактерии также размножаются бинарным делением и почкованием. Для переживания неблагоприятных условий цианобактерии образуют *акинеты* — круглые толстостенные клетки, аналогичные спорам бактерий, имеющие зернистую структуру и содержащие в качестве запасных веществ цианофицин и глюкан. Как запасное вещество (до 10 % от массы вегетативной клетки) может откладываться *цианофицин* — запасной пул азота, разветвленный сополимер аргинина и аспартата. В условиях голодания цианофицин может стать энергодающим веществом: $\text{аргинин} + \text{АДФ} + \text{F}_n + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{орнитин} + \text{CO}_2 + \text{АТФ} + \text{NH}_3$. Реакция катализируется ферментом аргининдегидролазой, а АТФ синтезируется путем субстратного фосфорилирования. Фикобилины также могут накапливаться (до 10 % от массы всего вещества) и потребляться в условиях голодания. В отличие от акинет, вегетативные клетки могут запасать и полифосфаты.

Ни у одного представителя филума во взрослом состоянии не обнаружены жгутики.

Многие цианобактерии передвигаются путем скольжения, иногда движение сопровождается вращением, скручиванием. Эти микроорганизмы обладают *фототаксисом*, некоторые способны к хемотаксису. Им присущи также *фотокинезис* (изменение скорости движения в зависимости от интенсивности света) и *фотофобная реакция* (резкое изменение направления движения при внезапном изменении интенсивности освещения). В зависимости от интенсивности света у цианобактерий может меняться количество тилакоидов и фотосинтетических пигментов, но их соотношение от освещенности не зависит. При низкой интенсивности света может работать только ФС I. Цианобактерии, имеющие разные фикобилины, способны к хроматической адаптации и могут синтезировать различные пигменты в ответ на изменение спектрального состава света. Длинноволновый свет поддерживает активность ФС II, что позволяет получать АТФ и расти за счет ассимиляции органических веществ.

По мере усложнения строения увеличивается объем и копия генома. У цианобактерий найдены плазмиды и цианофаги.

Обычно цианобактерии для роста не требуют витаминов, азот потребляют в аммонийной или нитратной форме, некоторые способны к фиксации молекулярного азота. Как правило, способны к ассимиляционной сульфатредукции. Облигатные фототрофы. Автотрофная фиксация CO_2 происходит в цикле Кальвина. Отдельные представители способны ассимилировать на свету глюкозу или другие простые органические субстраты. В основном нитчатые формы могут расти в темноте, окисляя органические соединения.

ЦТК — неполный, с или без глиоксилатного шунта, основной путь использования органики — пентозофосфатный путь. В анаэробных условиях в темноте могут осуществлять гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение и ацетогенез. Возможность анаэробного дыхания не показана, однако элементарная сера иногда используется как сток электронов.

Цианобактерии способны осуществлять *аноксигенный фотосинтез* с сероводородом в качестве донора электронов, при этом в клетках не синтезируется ФС II. Переход на аноксигенный фотосинтез требует индукции для синтеза сульфидхиноноксидоредуктазы. Цианобактерии различаются по устойчивости к сероводороду. Многие из них тяготеют к местам с высокой восстановленностью и небольшим количеством H_2S . При оксигенном фотосинтезе, когда образуется много активных форм кислорода, сероводород способствует защите от перекисления. Есть данные о том, что донором для ФС II может быть двухвалентное железо.

Большинство цианобактерий — мезофилы (иногда термотолерантные), но есть психрофильные и психроактивные представители, живущие во льдах Арктики (*Chroococcidiopsis* sp.). Термофильные виды (60—64 °C) обитают в горячих источниках и часто входят в состав циано-бактериальных матов (*Mastigocladus laminosus*, *Phormidium laminosum*). Многие цианобактерии предпочитают микроаэробные условия. Основная масса цианобактерий — алкалофилы (pH 8—9). В горячих источниках и болотах обитают ацидотолерантные (pH 4,5—5,0) *Fischerella* и *Synechococcus*. Солелюбивые формы (например, *Spirulina subsalsa*, выдерживающая до 10—12 % NaCl) синтезируют осмопротекторы. При «распреснении» такие вещества выбрасываются из клетки и «подбираются» микроорганизмами-спутниками.

Интересно, что некоторые цианобактерии способны образовывать нейротоксины, а также геосмин (транс-1,10-диметил-транс-9-декалол). Это вещество аналогично таковому у актиномицетов и имеет запах почвы. В частности, в период цианобактериального «цветения» воды ее земляной запах определяется этим соединением. Опасность такой воды для животных связана с выделением цианобактериальных нейротоксинов.

Микроорганизмы, ранее выделенные в порядок Prochlorales (*прохлорофиты*), а теперь причисленные к цианобактериям, — еще одна группа фототрофов, способных к *оксигенному фотосинтезу*, но отличающаяся от других цианобактерий составом пигментов. Эти организмы представлены тремя родами:

1) род *Prochloron* включает симбионтов асцидий диаметром 10—30 мкм. Кокковидные клетки имеют развитую систему внутрицитоплазматических мембран. В клеточной стенке найден пептидогликан. Фотосинтетический аппарат содержит хлорофиллы *a* и *b* в соотношении 4,7 : 1, не имеет фикобилинов и локализован в

тилакоидах. Гены, кодирующие белки светособирающих комплексов, гомологичны цианобактериальным, а не хлоропластным. Это мезофилы, имеющие карбоксисомы и фиксирующие углекислоту в цикле Кальвина, но способные использовать небольшие количества органики, как правило, в виде ацетата. Азот потребляют в аммонийной форме, однако способны и к азотфиксации;

2) род *Prochlorothrix* — это обитатели мелких озер, свободно-живущие нитчатые неподвижные организмы. В нитях присутствует от 20 до 100 клеток. Мембранная система менее развита. Имеют хлорофиллы *a* и *b* в соотношении 8—9:1, фикобилипротеинов не содержат. Фотосинтетический аппарат локализован в стопках тилакоидов. Фиксация CO_2 происходит в карбоксисомах через цикл Кальвина. Могут переключаться на аноксигенный фотосинтез в присутствии сероводорода. Азотфиксация не обнаружена, азот потребляется в виде нитратов и солей аммония;

3) род *Prochlorococcus* — очень мелкие кокки размером 0,5—0,7 мкм, содержащие хлорофиллы *a* и *b*, а также дивинил-хлорофиллы *b* и *c* и фикоэритрин. Вместо β -каротина образуют α -каротин. Подсчитано, что в 1 мл воды присутствует 10^4 — 10^5 клеток этих прохлорофит, которые являются первичными продуцентами в сумеречной зоне океанов. Распределены по глубине от поверхности до 200 м с изменением интенсивности света от 100 до 0,01 %. Это олиготрофные микроорганизмы с $g > 24$ ч.

Ранее предполагали, что эукариотическая клетка возникла путем симбиоза с цианобактерией, которая превратилась в хлоропласт. Однако цианобактерии не образуют хлорофилла *b*, присущего фототрофам-эукариотам. В то же время показано, что по анализу 16S рРНК хлоропласты и цианобактерии (в том числе, прохлорофиты) имеют одного общего предка. Поэтому симбионтом, превратившимся в хлоропласт, скорее является представитель прохлорофит, синтезирующий хлоропластный тип хлорофилла.

Уникальный тип фотосинтеза, не связанный с хлорофиллами или бактериохлорофиллами, обнаружен у галобактерий. Галобактерии относятся к археям и классифицируются в 14 родов.

Домен Archaea

Филум A2. Euryarchaeota

Класс 3. Halobacteria

Порядок 1. Halobacteriales

Семейство 1. Halobacteriaceae

Род 1. *Halobacterium*

Род 2. *Haloarcula*

Род 3. *Halobaculum*

Род 4. *Halococcus*

Род 5. *Haloferax*

Род 6. *Halogeometricum*

Род 7. *Halorubrum*

Род 8. *Haloterrigena*

Род 9. *Natrialba*

Род 10. *Natrinema*

Род 11. *Natronobacterium*

Род 12. *Natronomonas*

Род 13. *Natronococcus*

Род 14. *Natronorubrum*

Это аэробные хемотротрофы с дыхательным метаболизмом и сложными пищевыми потребностями (обычно для роста нужны белки и аминокислоты). Являются хорошими гидролитиками. Углеводы используют по пути Энтнера — Дудорова. У отдельных представителей обнаружена азотфиксация. Ряд организмов способен фиксировать углекислоту через цикл Кальвина. Некоторые способны к анаэробному дыханию с нитратом, фумаратом и окисленными соединениями серы в качестве акцепторов электронов.

Клетки неподвижны или движутся с помощью лофотрихальных жгутиков. Все организмы — одноклеточные, разной морфологии, часто плейоморфные, некоторые имеют газовые вакуоли. Размножаются бинарным делением, отдельные представители могут образовывать «галоцисты». В качестве запасного вещества отмечено наличие поли- β -гидроксимасляной кислоты.

Характерная черта этого семейства — его абсолютная зависимость от высоких концентраций NaCl (до 20—30 %). Микроорганизмы подразделяются на две группы: 1) нуждающиеся в высоких концентрациях соли и Mg^{2+} и растущие при pH ~7,0 и 2) нуждающиеся в высоких концентрациях соли и OH^- и растущие при pH ~8,0. Клетки синтезируют внутриклеточные осморегуляторы — сахароспирты, гликозилглицериды, бетаины, глицерол, некоторые аминокислоты, а также активно выкачивают из клетки Na^+ , заменяя его на K^+ (с 800-кратной разницей). Галобактерии (галоархеи) растут только в местах с высокой соленостью (морские солтерны, соленые озера, соленые продукты). Клеточные стенки (белковые, полисахаридные или сульфополисахаридные) стабилизируются ионами Na^+ . Гликопротеины галоархей, а также белки-ферменты содержат много «кислых» аминокислот.

Пигментация галоархей часто бывает красно-желтой из-за большого количества каротиноидов, которые, возможно, используются микроорганизмами для защиты от излишней инсоляции. Основными каротиноидами являются бактериоруберин, ликопин, α - и β -каротины. Галоархеи на свету при низком содержании кислорода образуют модифицированные клеточные мембраны, содержащие несколько видов пигментов — бактериородопсин, галородопсин, медленный родопсин, фобородопсин и археродоп-

син. С помощью таких «пурпурных мембран» клетки проводят уникальный процесс фотосинтеза с образованием АТФ. При этом бактериородопсин отвечает за транслокацию протонов и создание $\Delta\mu_{H^+}$, галеродопсин закачивает K^+ в обмен на Na^+ , а медленный фобо- и археродопсины служат фоторецепторами на красный и синий свет, управляют активностью жгутиков и отвечают за фототаксис.

Бактериородопсин (или ретиналь) образуется в присутствии небольшого количества O_2 из каротиноидов ($C_{40} \rightarrow 2C_{20}$) с присоединением к белковой молекуле через лизин. Это соединение имеет темно-пурпурный цвет. Ретиналь мигрирует в ЦПМ, образуя там агрегаты. Под действием света бактериородопсин изменяет свою конформацию, что сопровождается выбросом протонов из клетки и наведением трансмембранного потенциала. Такая фотосинтетическая активность полезна микроорганизмам, так как кислород плохо растворяется в концентрированных растворах соли, в результате могут создаться даже анаэробные условия. Тогда галоархеи используют световую энергию, чтобы синтезировать достаточное количество АТФ и пережить неблагоприятные условия. Постоянно расти анаэробно клетки не могут, поскольку кислород необходим для синтеза ретиналя, но с помощью фотосинтеза галоархеи могут переживать стресс, вызванный недостатком кислорода.

У галоархей ДНК делится на основную и минорную, которая может составлять до $1/3$ от общего количества и отличаться по содержанию Г + Ц. Клетки имеют крупные плазмиды, содержащие высокоповторяющиеся последовательности.

Еще одной интересной особенностью галоархей является высокая степень изменчивости (частота мутаций у них в 1 тыс. раз больше обычной).

Аэробные аноксигенные бактерии (эритробактерии) — это спорная группа, открытая в конце 70-х годов XX в. Пигменты фотосинтеза были обнаружены у розовых метилотрофных бактерий (ppmb — pink pigmented methylotrophic bacteria) рода *Methylobacterium*, выделяемых из филлосферы растений и кишечника кольчатых червей. Они синтезируют каротиноиды и небольшое количество бактериохлорофилла *a*.

Вторая группа таких организмов представлена морскими бактериями, обитающими на поверхности водорослей. Это облигатные аэробы родов *Erythrobacter* и *Roseobacter*, имеющие фотосинтетические пигменты и обладающие реакциями на свет.

Представители рода *Photorhizobium* — типичные азотфиксаторы, образующие клубеньки на стеблях высших растений, близки к почвенным бактериям рода *Bradyrhizobium*.

Из водоемов с разной температурой были выделены микроорганизмы родов *Porphyrobacter*, *Erythromicrobium*, *Roseococcus*, *Sandara-cinobacter*, *Rubrimonas*, *Acidiphilium rubrum* — спутник тионовых бак-

терий — способен синтезировать кроме обычного бактериохлорофилла с атомом Zn^{2+} , более устойчивый в кислой среде.

Все вышеприведенные микроорганизмы относятся к классу Alphaproteobacteria. *Roseateles depolymerans*, выделенный в одной из рек Индии и способный к разложению ксенобиотиков, относится к классу Betaproteobacteria. Эти микроорганизмы изучены в разной степени, но у всех обнаружены компоненты фотосинтетического аппарата, хотя он развит в 5—50 раз хуже (по содержанию фотосинтетических пигментов), чем у типичных пурпурных бактерий. Все они — аэробы, в большинстве облигатные. Фотосинтетический аппарат, в особенности бактериохлорофилл *a* синтезируется только в аэробных условиях, причем наличие света не обязательно, а сами микроорганизмы не могут расти при постоянном освещении. Их метаболизм рассматривают либо как промежуточную стадию между анаэробным фотосинтезом и аэробной гетеротрофией, либо как результат латерального переноса генов.

По морфологии это одноклеточные палочки и кокки, многие могут образовывать неправильные формы и ветвиться, способны размножаться бинарным делением или почкованием, иногда формируют V-образные структуры, движутся с помощью жгутиков, имеют внутриклеточные ламеллярные мембранные образования. Бактериохлорофилл *a* этерифицирован фитолом. Представлено большое разнообразие каротиноидов, более 70 % которых не участвуют в фотосинтезе и имеют защитную функцию. Найдены цитохромы и убихиноны.

Большинство этих микроорганизмов — мезофилы и нейтрофилы. Есть пресноводные, морские, галотолерантные и галофильные. Это облигатные гетеротрофы, растущие на сложных средах. Имеют либо полный ЦТК, либо незамкнутый ЦТК с глиоксилатным шунтом. У некоторых обнаружен КДФГ-путь. Отдельные представители способны окислять восстановленные соединения серы для получения энергии (например, *Roseococcus thiosulfatophilus* является хемолитогетеротрофом). Установлено, что свет подавляет дыхание и «включает» фотосинтетические реакции. Наблюдается светозависимое поглощение углекислоты, хотя цикл Кальвина не обнаружен. Однако при постоянном освещении происходит окисление цитохромов и фотовыцветание бактериохлорофиллов. Предполагают, что на свету хиноны легко «перевосстанавливаются», поэтому необходим сток электронов на дыхание (рис. 139).

Представители группы *Photorhizobium* образуют клубеньки ярко-зеленого цвета на стеблях тропических растений *Aeschynomene* и *Sesbania*. При росте на агаризованных средах формируют розовые колонии и обладают типичным дыхательным метаболизмом. Синтез пигментов интенсивнее на более бедных субстратах, т. е. возможно, что фотосинтез помогает «добирать» энергию. Считают,

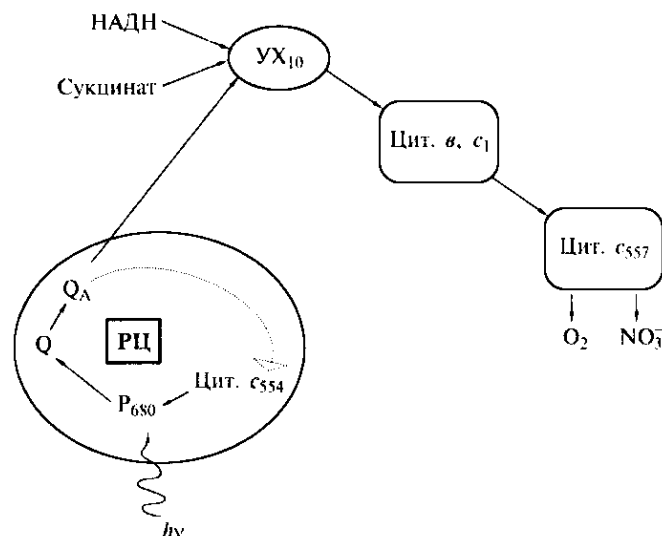


Рис. 139. Гипотетическая ЭТЦ эритробактерий (РЦ — реакционный центр; УХ — убикинон)

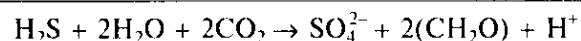
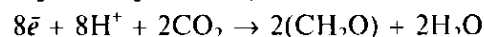
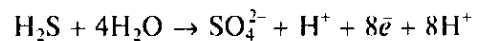
что энергия света идет, в основном, на обеспечение фиксации молекулярного азота.

Сравнение основных свойств фотосинтезирующих микроорганизмов разных групп. Наличие пигментов и способ их упаковки являются систематическими признаками для фототрофных бактерий. В табл. 26 суммированы такие признаки для больших групп фотосинтезирующих прокариот.

Систематическое положение разных фотосинтезирующих микроорганизмов приведено в табл. 27.

Сравнение некоторых основных свойств фотосинтетиков приведено в табл. 28.

Окисление серных соединений у фототрофов может происходить по схеме, представленной на рис. 140. При этом суммарная реакция фотосинтеза выглядит следующим образом:



Экология фототрофов. Фототрофные микроорганизмы часто образуют настолько устойчивые симбиозы, что им присваивают латинское название как индивидуальному организму. Например, «*Chlorochromatium aggregatum*» состоит из одной большой клетки нефототрофной бактерии и 12—20 мелких палочек зеленых сер-

Таблица 26

Организация фотосинтетического аппарата у разных групп фототрофных прокариот

Группа	Фотосинтетические пигменты и их максимумы поглощения	Фотосинтетические мембранные системы
Кианобактерии (включая прохлорофит)	Chl <i>a</i> — 665 нм Chl <i>b</i> — 645 и 430 нм	Тилакоиды с фикобилисомами или без них
Пурпурные бактерии	Bchl <i>a</i> — 800—810, 830—890 нм Bchl <i>b</i> — 835—850, 1020—1040 нм	Ламеллы, трубочки или везикулы, связанные с ЦПМ
Зеленые бактерии	Bchl <i>c</i> — 745—755 нм Bchl <i>d</i> — 705—740 нм Bchl <i>e</i> — 719—726 нм Bchl <i>a</i> — 807, 830—890 нм (минорный)	Хлоросомы, связанные с мембраной, но не представляющие из себя непрерывную цепь, и ЦПМ
Гелиобактерии	Bchl <i>g</i> — 670 и 788 нм	ЦПМ
Галоархеи	Бактериородопсин	«Пурпурные мембраны» в ЦПМ

ных бактерий *Chlorobium limicola*. Симбионты синхронно делятся. Зеленые бактерии могут быть выделены в чистую культуру, а большой микроорганизм — нет. Схожие ассоциации представлены на рис. 141.

Интересным макрообразованием является *циано-бактериальный мат*. В его состав входят кианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии, а также сульфатредукторы. Такие ассоциации обычно развиваются в горячих кислых источниках и достигают толщины 4—5 см.

Кианобактерии часто существуют в симбиозах с высшими растениями (водный папоротник *Azolla* + *Anabaena*) и грибами (лишайники), а представители рода *Prochloron* являются симбионтами асцидий.

Пурпурные бактерии — это в основном водные микроорганизмы. Они обнаружены также в почве, но там их роль невелика. Развиваются обычно в бескислородных водах с сероводородом, куда проникает свет, в редких случаях обнаруживаются на больших глубинах. Пурпурные несерные бактерии предпочитают богатые органикой воды и болотистые почвы, при этом редко образуют скопления, придающие воде окраску. Иногда развиваются в прибрежных морских водах.

Пурпурные серные бактерии, наоборот, создают видимые скопления в прозрачных водоемах на границе анаэробной зоны. Такие

Краткая характеристика анаэробных фототрофов
(исключая эритробактерии и галоархеи)

Характеристика	Род	Число видов	Систематическое положение
Несерные пурпурные бактерии			
Спириллы с полярными жгутиками	<i>Rhodospirillum</i>	9	Филум B12. Proteobacteria Класс 1. Alphaproteobacteria
Палочки с полярными жгутиками, размножаются почкованием	<i>Rhodopseudomonas</i>	9	Там же
Палочки, размножаются бинарным делением	<i>Rhodobacter</i>	6	Там же
Яйцеобразные клетки	<i>Rhodovulum</i>	4	Там же
Овальные клетки с перитрихальным жгутикованием, образуют гифы, размножаются почкованием	<i>Rhodomicrobium</i>	1	Там же
Большие сферические клетки, ацидофилы (pH 5.0)	<i>Rhodopila</i>	1	Там же
Кольцеобразные изогнутые клетки	<i>Rhodocyclus</i>	2	Филум B12. Proteobacteria Класс 2. Betaproteobacteria
Искриленные палочки	<i>Rubrivivax</i>	1	Там же
Искривленные палочки	<i>Rhodoferrax</i>	1	Там же
Пурпурные серные бактерии			
<i>A. Откладывают серу снаружи</i>			

Спириллы с полярными жгутиками	<i>Ectothiorhodospira</i>	6	Филум B12. Proteobacteria Класс 3. Gammaproteobacteria
Спириллы, экстремальные галофилы	<i>Halorhodospira</i>	3	Там же
<i>Б. Откладывают серу внутри клетки</i>			
1. Нет газовых вакуолей			
Овальные палочки с полярными жгутиками	<i>Chromatium</i>	12	Там же
Диплококки и тетрады, неподвижны	<i>Thiocapsa</i>	3	Там же
Сферические или овальные клетки с полярными жгутиками	<i>Thiocystis</i>	2	Там же
Большие спириллы с полярными жгутиками	<i>Thiospirillum</i>	1	Там же
Маленькие спириллы	<i>Thiorhodovibrio</i>	1	Там же
Крупные палочки-веретенца (1,5 — 1,7 мкм × 16 — 32 мкм)	<i>Rhabdobchromatium</i>	1	Там же
2. Есть газовые вакуоли			
Неправильные сферические или овальные клетки, неподвижны	<i>Amoebobacter</i>	4	Там же
Палочки с полярными жгутиками	<i>Lamprobacter</i>	1	Там же
Сферические или овальные клетки с полярными жгутиками	<i>Lamprocystis</i>	1	Там же
Неподвижные палочки, образующие сетку	<i>Thiodictyon</i>	2	Там же
Неподвижные сферические клетки в плоских тетрадах	<i>Thiopedia</i>	1	Там же

Характеристика	Род	Число видов	Систематическое положение
Зеленые бактерии			
1. Нет газовых вакуолей			
Неподвижные прямые или изогнутые палочки	<i>Chlorobium</i>	6	Филум B11, Chlorobi Класс I, Chlorobia
Сферические клетки с простеками	<i>Prosthecochloris</i>	2	Там же
Нитчатые скользящие	<i>Chloroflexus</i>	2	Филум B6, Chloroflexi Класс I, Chloroflexi
Нитчатые скользящие, оранжевого цвета	<i>Heliothrix</i>	1	Там же
Нитчатые скользящие, имеют большой диаметр (2 — 5 мкм)	<i>Oscillochloris</i>	1	Там же
2. Есть газовые вакуоли			
Ветвящиеся неподвижные палочки, образующие сеть	<i>Pelodictyon</i>	4	Филум B11, Chlorobi Класс I, Chlorobia
Сферические клетки с простеками	<i>Ancalochloris</i>	1	Там же
Скользящие палочки	<i>Chlorohelpton</i>	1	Там же
Нитчатые скользящие, имеют большой диаметр (2 — 2,5 мкм)	<i>Chloronema</i>	1	Филум B6, Chloroflexi Класс I, Chloroflexi
Гелиобактерии			
Палочки, скользящие или с полярными жгутиками	<i>Heliobacterium</i>	3	Филум B13, Firmicutes Класс I, Clostridia
Палочки-перитрихи	<i>Heliobacillus</i>	1	Там же
Палочки в агрегатах, обладающих общей подвижностью	<i>Heliophilum</i>	1	Там же

Таблица 28

Свойства фототрофных микроорганизмов

Свойство	Пурпурные бактерии	Зеленые бактерии	Циано-бактерии	Гелио-бактерии	Гало-археи	Хлоропласт
Локализация фотосинтетического аппарата	Выросты ЦПМ	Хлоробиум-везикулы и ЦПМ	Тилакоиды	ЦПМ	ЦПМ	Тилакоиды
ФС I	+	+	+	+	-	+
ФС II	-	-	+	-	-	+
Доноры электронов	H ₂ S, H ₂ , органика	H ₂ S, H ₂	H ₂ O	H ₂ S, H ₂	Органика	H ₂ O
Источник углерода	CO ₂ , органика	CO ₂ , органика	CO ₂	CO ₂ , органика	Органика	CO ₂
Способ питания	Авто- и гетеротрофия	Авто- и гетеротрофия	Автотрофия	Гетеро- и автотрофия	Гетеротрофия	Автотрофия

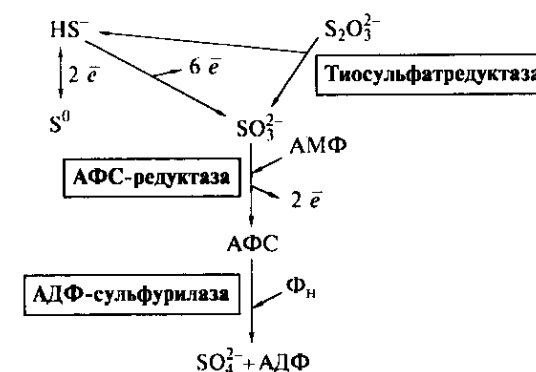


Рис. 140. Пути окисления соединений серы у фототрофных прокариот (АФС — аденозинфосфосульфат)

слои лучше формируются в меромиктических (с более высокой придонной соленостью) или в голомиктических (с сезонной стратификацией) водоемах и по берегам морей в лиманных областях. В прибрежных зонах морей могут образовывать «красные прили-

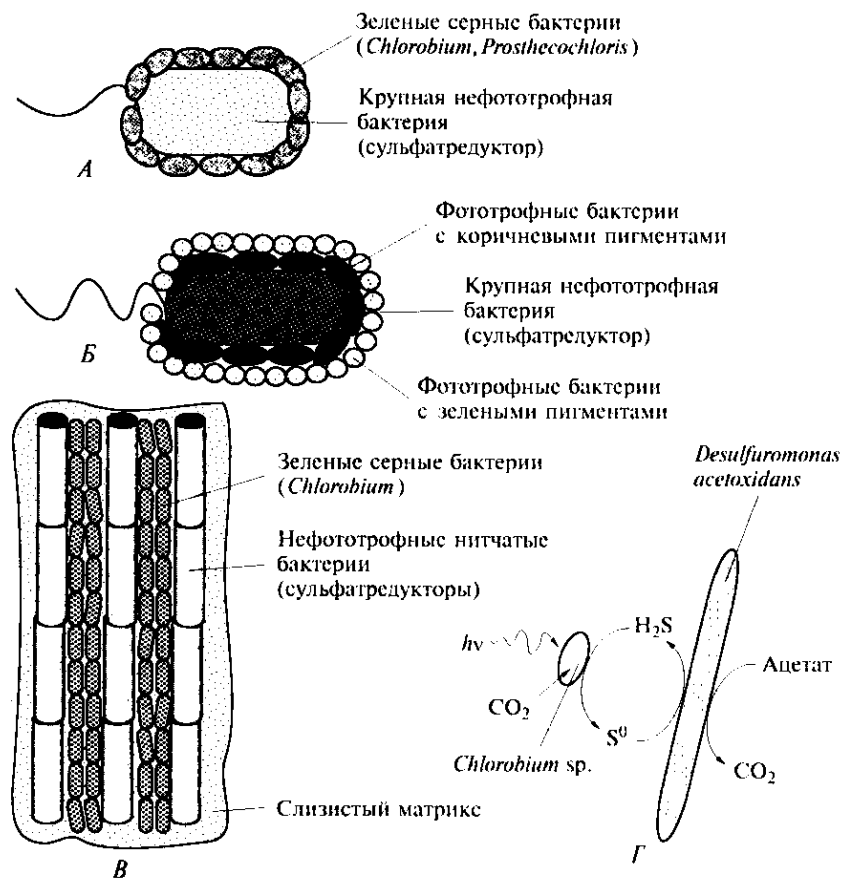


Рис. 141. Устойчивые симбиозы с участием фототрофных микроорганизмов:

А — *Chlorochromatium*; Б — *Pelochromatium*; В — *Chloroplana*; Г — синтрофная по H_2S ассоциация с серуредуктором

вы». Представители *Ectothiorhodospira* тяготеют к соленым и щелочным местообитаниям, морским эстуариям. В глобальном круговороте серы функционально тесно связаны с сульфатредукторами.

Для пурпурных бактерий отмечено сосуществование аналогичных видов в одном и том же слое водосема за счет «разобщения» их активностей во времени. Например, *Chromatium okenii* и *C. vinosum* различаются по константе сродства и скорости окисления сульфида. В периодической культуре второй организм вытесняет первый, а в природе они сменяют друг друга в течение суток: утром, когда сульфида много, *C. okenii* быстро окисляет сероводород, концентрация которого снижается, вечером *C. vinosum* начинает мед-

ленно окислять малые количества H_2S , а первый микроорганизм рост прекращает.

Зеленые серные бактерии редко образуют скопления. Они растут в илах в зоне хемоклина под слоем пурпурных бактерий. С глубокой зелеными видами замещаются коричневыми. Для них характерно образование консорциумов на основании синтрофии по сероводороду. Зеленые несерные бактерии предпочитают горячие серные и пресные воды.

Гелиобактерии обитают в почвах (часто сухих), которые обогащают азотом. Нередко связаны с растениями. Живут также в горячих источниках и содовых озерах, где предпочитают зону метаногенеза, а не сульфатредукции. Обнаружены в *циано-бактериальных матах*.

Цианобактерии относятся к водным микроорганизмам, пресноводным и морским, причем в морях разнообразие видов беднее. Обнаружены как в планктоне, нектоне, так и в бентосе, где могут формировать обрастания. Цианобактерии считаются структурообразующими элементами *циано-бактериальных матов* — сообществ цианобактерий и других бактерий. Маты, в составе которых не обнаружены эукариотические организмы, считаются реликтовыми. Возможно, эти сообщества сформировали современную атмосферу, так как газы, поднимаясь со дна и проходя через мат, существенно изменяли свой состав. В гиперсоленых сообществах образуются строматолиты, литифицированные ассоциации, сформировавшиеся за счет отложений нерастворимых веществ и дошедшие до наших дней в виде окаменелостей. Типичная структура *циано-бактериального мата* толщиной около 1 см слоистая: первый (верхний) слой — это цианобактерии (обычно ярко-зеленого цвета), второй слой — пурпурные бактерии, третий слой — зеленые бактерии (между вторым и третьим слоями могут находиться бесцветные слои из *Beggiatoa* и *Flexibacter*). Это зона хемоклина с отложениями элементарной серы. Четвертый слой составляют сульфатредукторы, а ниже могут обитать метаногены. В качестве спутников во всех слоях могут существовать тионовые бактерии и метилотрофы. Нижележащие слои, как правило, мертвые, литифицированные.

Другие местообитания цианобактерий связаны с наземными системами (кора, стены, асфальт, поверхность скал, трещины и внутренние полости камней, почва). Цианобактерии играют большую роль в почвообразовании и обогащении почв азотом («живые азотные удобрения»). Они наиболее устойчивы к изменениям в природе, часто доминируют в экстремальных местообитаниях. После природных катаклизмов (извержений вулканов) первыми безжизненную лаву заселяют цианобактерии, затем появляются водоросли, образуется плодородный слой, развиваются травы, поселяются птицы, дающие удобрения, и только потом вырастают деревья.

Использующие свет галоархеи обитают в засоленных и содовых водах и почвах, в солесварнях, на соленых продуктах, являясь основными агентами их порчи. Участвуют в пищевых цепях как деструкторы-гидролитики. Рядом с ними часто растут *Dunaliella* и *Ectothiorhodospira*.

Контрольные вопросы

1. Назовите особенности использования микроорганизмами высокомолекулярных веществ.
2. Сравните параметры процессов пассивной и облегченной диффузии.
3. Перечислите виды активного транспорта. В чем его отличие от диффузии?
4. Сформулируйте принцип биохимического единства.
5. Перечислите основные этапы катаболизма глюкозы у микроорганизмов. В чем особенности катаболизма анаэробных организмов?
6. Дайте определение процессу брожения. Перечислите наиболее известные виды брожения и группы микроорганизмов, их вызывающие.
7. Что такое гетеротрофная фиксация CO_2 ?
8. Перечислите основные виды анаэробного дыхания и назовите микроорганизмы, способные осуществлять такой процесс.
9. Назовите субстраты метаногенеза и проанализируйте возможности метаногенных архей в условиях конкуренции с сульфатредуцирующими микроорганизмами.
10. Сравните процессы полного и неполного окисления субстрата. Каковы особенности окисления биологических полимеров?
11. Что такое биолюминесценция и какие микроорганизмы способны ее осуществлять?
12. Назовите особенности ассимиляции углерода у метилотрофных микроорганизмов.
13. Перечислите группы хемолитоавтотрофных микроорганизмов.
14. Сравните группы фототрофных микроорганизмов по организации фотосинтетического аппарата и метаболическим возможностям.

Глава 7

ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

Значение процесса азотфиксации

Азотфиксация — это уникальный процесс, присущий только прокариотическим микроорганизмам. Под азотфиксацией понимается способность некоторых групп бактерий и архей к энзиматическому восстановлению атмосферного N_2 до аммония (с образованием водорода), который затем включается в клеточное вещество.

Азотфиксация по своему значению сопоставима с фотосинтезом, так как для подавляющего большинства живых организмов азот может быть доступен только в связанной форме. Молекулярный азот составляет в атмосфере Земли около 78 % по массе. Связанный азот, «выносимый» из почвы растениями (порядка 110 млн т в год), частично восполняется за счет внесения минеральных и органических азотных удобрений (около 30 млн т в год). Основное связывание азота происходит путем микробной азотфиксации. Таким образом замыкается глобальный цикл азота.

Микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот

Давно было замечено, что севооборот с бобовыми растениями повышает урожай злаков. В 1888 г. М. Бейеринк выделил первую чистую культуру клубеньковых бактерий из рода *Rhizobium*. В 1893 г. С. Н. Виноградским был описан свободноживущий анаэробный микроорганизм *Clostridium pasteurianum*, фиксирующий молекулярный азот, а в 1901 г. М. Бейеринк обнаружил аэробный свободноживущий азотфиксатор рода *Azotobacter*. В начале XX в. была доказана способность к азотфиксации у цианобактерий рода *Nostoc*.

Азотфиксирующие микроорганизмы выделяют на средах без связанных форм азота. В настоящее время наиболее распространенными методами изучения азотфиксации являются изотопный (по включению N^{15} — нерадиоактивного, стабильного и N^{13} — радиоактивного, с периодом полужизни ~0,5 ч, изотопов в клет-

ку) и ацетиленовый (основан на способности азотфиксирующих микроорганизмов осуществлять реакцию ацетиленредукции $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$).

Большое число микроорганизмов — представители 80 родов из 27 семейств бактерий и по крайней мере три термофильных рода архей — обладают способностью к азотфиксации.

Такие микроорганизмы подразделяют на свободноживущие и симбиотические. *Свободноживущие азотфиксаторы* относятся к хемотрофам (это анаэробные клостридии и сульфатредукторы, факультативно анаэробные бациллы и представители сем. *Enterobacteriaceae*, аэробные метанотрофы и представители сем. *Azotobacteriaceae*) и к фототрофам (это ряд пурпурных и зеленых бактерий и многие цианобактерии).

В настоящее время свободноживущие азотфиксаторы подразделяют на *истинно свободноживущие* и *ассоциативные*, т.е. предпочтительно встречающиеся в *ризосфере* некоторых высших растений (злаков). К ассоциативным *дiazотрофам* (другое название *азотфиксаторов*) относятся представители сем. *Enterobacteriaceae* и *Azotobacteriaceae*.

Симбиотические diaзотрофы включают прежде всего так называемые клубеньковые бактерии сем. *Rhizobiaceae*, образующие разрастания на корнях бобовых растений, а также родственные стрептомицетам микроорганизмы рода *Frankia*, живущие в клубеньках на корнях и листьях некоторых покрытосеменных кустарников (ольха, облепиха). Эти микроорганизмы фиксируют азот в стадии эндосимбионтов-*бактероидов*.

Интересно, что при симбиотической азотфиксации изменяется как растение (разрастание тканей), так и микроорганизм (меняется строение клетки). Возможно, мы наблюдаем образование новой эукариотической органеллы путем симбиоза.

К симбиотическим азотфиксаторам также относятся некоторые цианобактерии в лишайниках (*Anabaena*, *Nostoc*) и симбионты водного папоротника *Azolla* (*A. azollae*), растущие в пазухах листьев.

Считалось, что такие diaзотрофы способны фиксировать азот только в симбиозе. В настоящее время показано, что если снизить парциальное давление кислорода, то симбионты смогут фиксировать азот и в чистой культуре, без растения-хозяина. Однако симбиотическая азотфиксация значительно эффективнее. Возникает вопрос, как симбионты находят друг друга? Обнаружено, что растения выделяют белковые аттрактанты-*лектины*, имеющие сродство к микробным полисахаридам, а микроорганизмы могут синтезировать *стимуляторы роста растений* (гетероауксины, индолилуксусную кислоту).

Подробнее процесс «узнавания» симбионтами друг друга и механизм образования клубеньков описан в гл. 11.

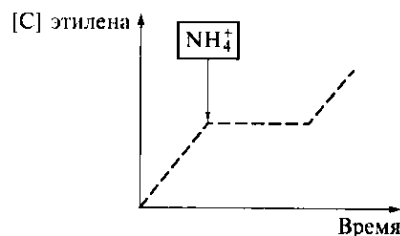
Процесс фиксации молекулярного азота

Несмотря на разнообразие микроорганизмов, осуществляющих азотфиксацию, ферментный комплекс *нитрогеназы* одинаков и у анаэробов, и у аэробов. Один из ее отличительных признаков — чрезвычайная чувствительность к наличию кислорода. Поэтому у аэробных микроорганизмов существует проблема защиты нитрогеназы от кислорода. Разные микроорганизмы решают ее разными путями. У цианобактерий имеются специализированные клетки-*гетероцисты*, в которых нет ФС II и поэтому при фотосинтезе не образуется кислород, а толстая клеточная стенка препятствует его диффузии снаружи. Активная оксидазная система тут же восстанавливает проникший кислород. У азотобактера сильно развита слизистая капсула, препятствующая проникновению кислорода, и уникальная оксидазная система с очень высоким сродством к O_2 ($K_M = 10^{-7} - 10^{-6}$, т.е. в 10—100 раз выше обычной), не допускающая метаболический кислород к нитрогеназе. Обнаружено, что некоторые свободноживущие аэробы обладают нитрогеназой, белковая часть которой имеет особую конформацию, менее чувствительную к O_2 . Некоторые аэробные азотфиксаторы выбирают микроаэрофильные местообитания или сосуществуют в экосистемах с организмами, активно потребляющими кислород. Факультативные анаэробы фиксируют азот только в анаэробных условиях. Наиболее изощренная защита нитрогеназы обнаружена у клубеньковых бактерий, которые снабжают растение связанным азотом. Растение же защищает *бактероиды* и дает им продукты фотосинтеза — органические вещества. Для защиты нитрогеназы в клубеньках синтезируется *леггемоглобин* — самый высокочувствительный к кислороду белок-оксидаза. Леггемоглобин реагирует с наномольными количествами кислорода. Интересно, что синтез этого соединения происходит совместно — белковую часть образует растение, а гем синтезирует бактериоид. На срезах клубеньков леггемоглобин выделяется красным цветом.

Фиксация азота жестко регулируется наличием его связанных форм. Нитрогеназа репрессируется, если в среде есть NH_4^+ (рис. 142).

Итак, газ азот — это химически инертное и очень стабильное вещество. Чтобы разорвать тройную связь в его молекуле, необходимо много энергии. Реакция $3H_2 + N_2 \rightarrow 2NH_3$ — эндотермическая. Для ее осуществления требуется по крайней мере 8 электронов и 16 молекул АТФ. На самом деле АТФ затрачивается больше, поскольку часть ее нужна для поддержания анаэробных условий.

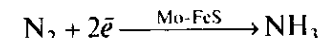
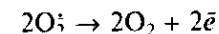
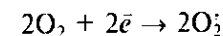
Нитрогеназный ферментный комплекс состоит из двух компонентов: Mo-Fe-белок с молекулярной массой 220 кДа и Fe-белок — 64 кДа (рис. 143). Mo-Fe-белок содержит два атома молибдена и 28—32 атома железа, в Fe-белке — 4 атома железа. Для проявления нитрогеназной активности необходимы оба компонента,



но они взаимозаменяемы у разных микроорганизмов. Мо-Fe-белок состоит из четырех субъединиц: 2α (кодируются *nifD*-геном) и 2β (*nifK*-ген). Fe-белок состоит из двух субъединиц. Ферредоксин восстанавливается либо в реакциях фотосинтеза у фототрофов, либо при дыхании у аэробных diaзотрофов, или при брожении у анаэробов. При фиксации азота всегда выделяется молекулярный водород:

trophicus — автотроф, аэроб, термофил (температура роста — до 70 °C), азотфиксатор.

Нитрогеназа этого организма зависит от O_2 , CO и супероксид-радикала:



Эта нитрогеназа не способна восстанавливать ацетилен в этилен, менее требовательна к АТФ (4—12), по субъединичному составу не похожа ни на один известный фермент, хотя также содержит Mo^{2+} .

В настоящее время *nif*-гены успешно «пересажены» из *Klebsiella* в *E. coli*, но, к сожалению, они там «не работают», так как у организма-реципиента нет стратегии защиты нитрогеназы от кислорода. С открытием устойчивой к кислороду нитрогеназы эта проблема может быть решена.

Практическое применение diaзотрофов в деятельности человека заключается, в основном, во внесении этих микроорганизмов либо в почву (свободноживущие бактерии — в виде удобрения азотобактерина), либо на корни или семена растений (симбиотические бактерии — в виде нитрагина). Цианобактерии эффективно «работают» на рисовых полях, а во Вьетнаме хорошим «зеленым» удобрением служит водный папоротник *Azolla* в симбиозе с *Anabaena*. Продолжаются работы по внедрению *nif*-генов в другие полезные микроорганизмы.

Контрольные вопросы

1. Какое значение имеет процесс азотфиксации?
2. Охарактеризуйте группы свободноживущих, ассоциативных и симбиотических азотфиксаторов.
3. Перечислите известные способы защиты нитрогеназного комплекса от кислорода.
4. Как функционирует нитрогеназный комплекс и насколько универсально его строение?
5. Опишите свойства микроорганизма, образующего нитрогеназу, не чувствительную к кислороду.

БИОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У МИКРООРГАНИЗМОВ

Общие понятия

Многие реакции ассимиляции подробно описаны при рассмотрении различных физиологических групп микроорганизмов, поэтому здесь будет дан краткий обзор конструктивных процессов в мире микробов.

Итак, *анаболизм* — это совокупность реакций построения сложных молекул и структур из более простых и небольших предшественников с использованием метаболической энергии. *Катаболические* и *анаболические* пути могут различаться ферментами, их регуляцией, внутриклеточной локализацией и использованием кофакторов и переносчиков. Многие ферменты *амфиболических* путей участвуют как в реакциях анаболизма, так и в катаболических реакциях. Например, большинство гликолитических ферментов принимает участие как в синтезе, так и в катаболизме глюкозы, тогда как жирные кислоты синтезируются из ацетил-КоА и малонил-КоА путем, совершенно отличным от β -окисления. В активных клетках всегда поддерживается равновесие между процессами анаболизма и катаболизма. На рис. 144 изображена простейшая схема, показывающая за счет чего можно амфиболические ферменты заставлять работать либо в сторону биосинтеза («включая» E_2 -фермент), либо в сторону деградации («активируя» E_1 -фермент).

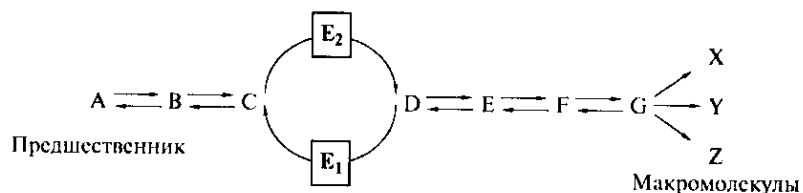


Рис. 144. Простейшая схема регуляции амфиболических путей (активация фермента E_2 приводит к сдвигу реакций в сторону биосинтеза, E_1 — в сторону расщепления)

Ассимиляция углерода

Источником углерода для автотрофов служит CO_2 , для гетеротрофов — органические соединения.

Фиксация CO_2 . Основные пути ассимиляции углекислоты автотрофами следующие:

- *рибулозобисфосфатный цикл* (цикл Кальвина, рис. 145) с ключевым ферментом РБФ-карбоксилазой (может работать как оксигеназа, рис. 146), функционирующий в том числе у растений;

- *восстановительный цикл трикарбоновых кислот* (цикл Арнона) с ключевым ферментом цитратлиазой найден у зеленых серных бактерий и у аэробов рода *Hydrogenobacter* (см. рис. 136);

- *гидроксипропионатный путь* и *восстановительный цикл дикарбоновых кислот* у зеленых несерных бактерий (см. рис. 137);

- *ацетил-КоА-путь* (путь Вуда—Льюнгдала) у метаногенов, сульфатредукторов и гомоацетогенов (см. рис. 98, 99).

Гетеротрофы не могут осуществлять полное построение вещества клетки за счет CO_2 , однако и у них возможна фиксация углекислоты. Это, например, известная *реакция Вуда—Вермана*, когда ФЕП или пируват путем карбоксилирования достраивается до C_4 -кислоты (оксалоацетата). Карбоксилированию могут подвергаться также C_2 -кислоты в форме ацетил-КоА, C_3 -соединения в форме ФЕП, пирувата, пропионил-КоА, C_4 -соединения в форме сукцинил-КоА, 2-оксoglутарата и соединения с большим числом атомов углерода, например, в форме фенилацетата. Ниже приведены некоторые реакции гетеротрофной фиксации CO_2 с указанием катализирующих их ферментов:

ацетил-КоА + $CO_2 \rightarrow CO-CH_2-CO-CoA$ (малонил-КоА-карбоксилаза)

ацетил-КоА + $CO_2 + \Phi dH_2 \rightarrow$ пируват + Φd (пируватсинтаза)

ФЕП + $CO_2 + H_2O \rightarrow$ оксалоацетат + Φ_n (ФЕП-карбоксилаза)

ФЕП + $CO_2 + АдФ \rightarrow$ оксалоацетат + АТФ (ФЕП-карбоксикиназа)

ФЕП + $CO_2 + \Phi_n \rightarrow$ оксалоацетат + $\Phi\Phi_n$ (ФЕП-карбокситрансфераза)

пируват + $CO_2 + АТФ + H_2O \rightarrow$ оксалоацетат + АДФ + Φ_n (пируваткарбоксилаза)

пируват + $CO_2 + НАД(\Phi)Н \rightleftharpoons$ малат + $НАД(\Phi)^+$ (малатдегидрогеназа карбоксилирующая, «малик-фермент»)

пропионил-КоА + $CO_2 + \Phi dH_2 \rightarrow$ 2-оксобутират + Φd (2-оксобутиратсинтаза)

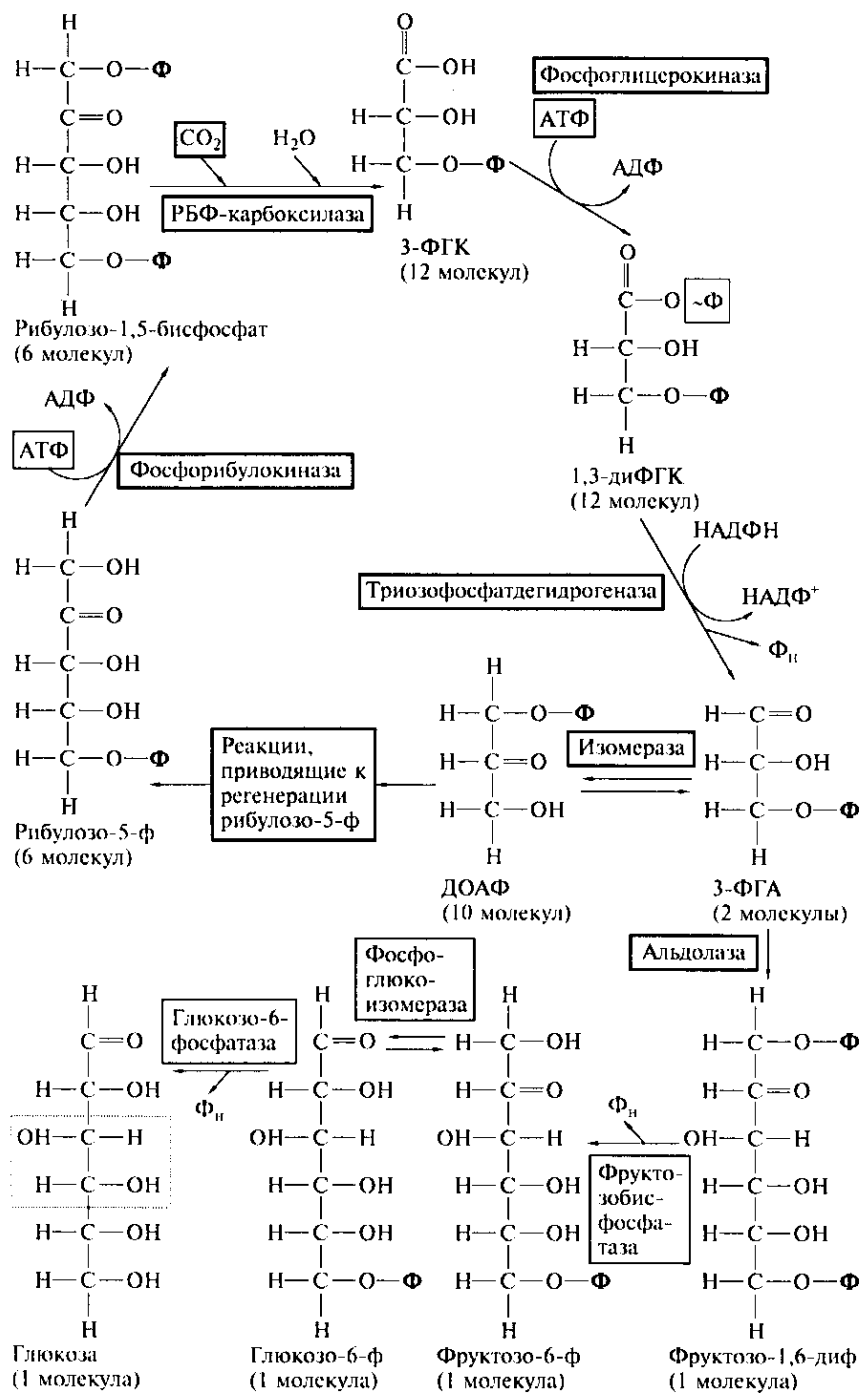


Рис. 145. Рибулозобисфосфатный цикл (цикл Кальвина)

сукцинил-КоА + CO₂ + ФдН₂ → 2-оксоглутарат + Фд (2-оксоглутаратсинтаза)

2-оксоглутарат + CO₂ + НАД(Ф)Н + Н⁺ ⇌ изоцитрат + НАД(Ф)⁺ (изоцитратдегидрогеназа)

фенилацетат + CO₂ + ФдН₂ → фенилпируват + Фд (фенилпируватсинтаза)

Фиксация CO₂ в таких реакциях обычно составляет 2—6 % от общего потребления углерода клеткой, а на бедных средах может достигать 30 %. Чем проще среда культивирования, тем больше *гетеротрофная фиксация углекислоты*. Таким путем удлиняются углеродные скелеты, а также поддерживается окислительно-восстановительный потенциал среды.

Ассимиляция C₁-соединений. Итак, CO₂ — соединение углерода в самой окисленной форме, поэтому не может быть источником энергии. Другие одноуглеродные соединения — метан, метанол, формальдегид, формиат, метилированные амины, СО, цианиды и т. д. — могут быть *амфиболитами*, т. е. источниками и углерода, и энергии. Такие соединения используются *метилотрофами*. Особенностью их подготовительного метаболизма является то, что одноуглеродные соединения они должны превратить в формальдегид, который затем и фиксируется в одном из циклов (рибулозомонофосфатном, сериновом или диоксиацетоновом).

Анаболизм углеводов. Многие микроорганизмы должны синтезировать сахара из более восстановленных, чем CO₂, соединений. Синтез глюкозы из неуглеводных предшественников называют *глюконеогенезом*. На первый взгляд, этот путь является как бы обратным гликолитическим путем, однако на трех его стадиях работают совершенно другие ферменты. Пируват превращается в

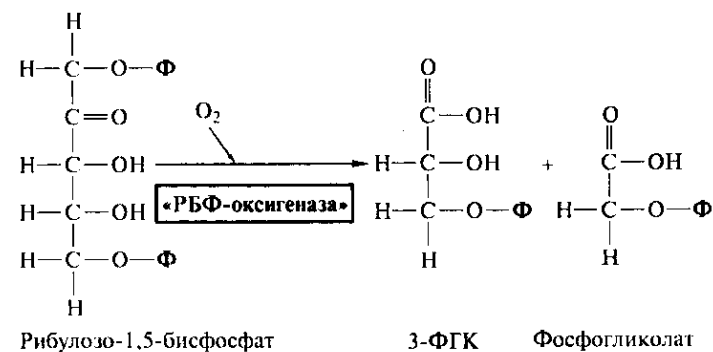
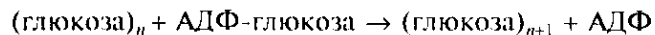
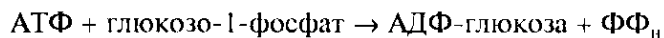


Рис. 146. Оксигеназная функция РБФ-карбоксилазы

ФЕП с помощью пируваткарбоксилазы и ФЕП-карбоксикиназы, фруктозо-1,6-бисфосфат преобразуется во фруктозо-6-фосфат с помощью фруктозобисфосфатазы, глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозу под действием глюкозо-6-фосфатазы.

Полисахариды синтезируются с помощью нуклеозиддифосфат-сахаров:



Метаболизм азота

Для осуществления биосинтеза микроорганизмам в больших количествах необходимы также сера и азот. Соединения азота, используемые в конструктивных целях, — это молекулярный азот, аммоний, нитрит, нитрат, гидроксиламин, метиламины, аминокислоты, мочевина, пурины, пиримидины, белки. Надо заметить, что возможности использования соединений азота у микроорганизмов значительно шире, чем у животных и растений. Процесс *азотфиксации* подробно описан в гл. 7.

Ассимиляция нитрата и нитрита. В отношении использования нитрата микроорганизмы похожи на растения. Процесс *ассимиляционной нитратредукции* (рис. 147) проходит в два этапа:

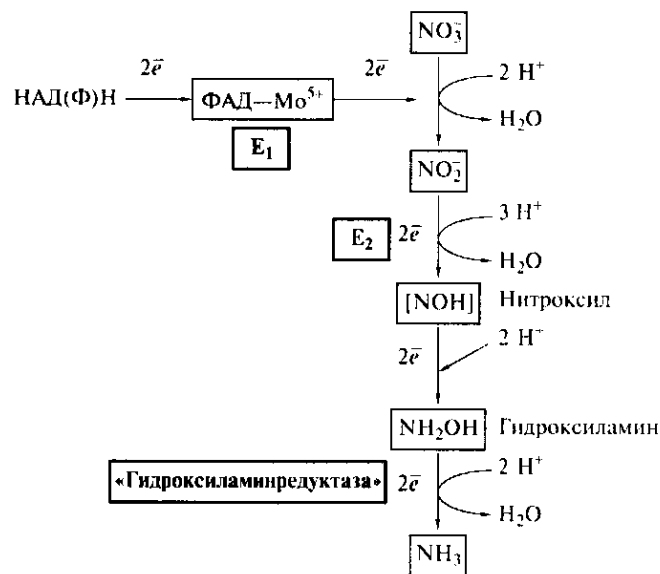


Рис. 147. Последовательность реакций при ассимиляционной нитратредукции (E_1 — ассимиляционная нитратредуктаза; E_2 — ассимиляционная нитритредуктаза)

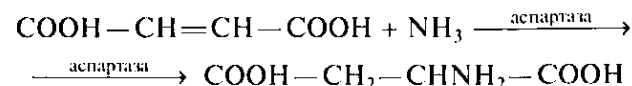
$\text{NO}_3^- \xrightarrow{\text{E}_1} \text{NO}_2^- \xrightarrow{\text{E}_2} \text{NH}_4^+$. На первом этапе нитратредуктаза (E_1) переносит два электрона, на втором — последовательно переносится шесть электронов под действием ферментного комплекса нитритредуктазы (E_2). Ассимиляционная нитратредуктаза — растворимый фермент, и реакция происходит в цитоплазме. Фермент содержит ион Mo^{5+} и ФАД. Строение ассимиляционной и диссимиляционной нитритредуктазы похоже. Возможно, также присутствует и другой фермент, восстанавливающий гидроксиламин.

Ассимиляция аммония. Часто источником аммония для микроорганизмов служит мочевина. Реакцию разложения мочевины проводит фермент уреазы:



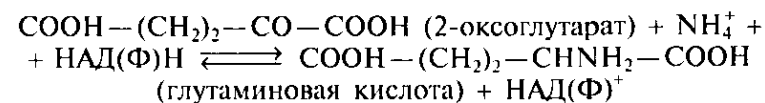
У микроорганизмов обнаружено несколько систем ассимиляции NH_4^+ :

■ у факультативных анаэробов семейства *Enterobacteriaceae* — аминирование фумарата с образованием аспарагиновой кислоты под действием фермента *аспартазы*:



(у некоторых клостридий происходит аминирование метилмалеиновой кислоты);

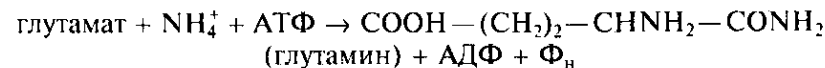
■ восстановительное аминирование кетокислот (встречается значительно чаще):



Тот же фермент *глутаматдегидрогеназа* осуществляет и обратную реакцию окислительного дезаминирования;

■ аминирование пирувата с образованием аланина, глиоксилата с образованием глицина и оксалоацетата с образованием аспарагиновой кислоты под действием соответствующих *дегидрогеназ*; у некоторых бацилл есть только аланиндегидрогеназа, у других микроорганизмов систем утилизации аммония может быть несколько;

■ образование амидов под действием фермента *глутаминсинтетазы*

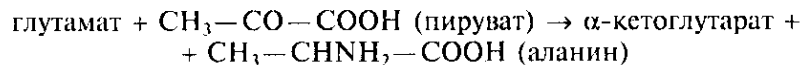


■ образование *карбамоилфосфата*



Это соединение участвует в дальнейшем образовании цитрулина, орнитина, а также нуклеотидов у пурпурных бактерий и некоторых стрептококков.

Для формирования других аминокислот микроорганизмы имеют систему *переаминирования*:



В реакции участвует фермент *трансаминаза* с пиридоксинфосфатом (B_6) в качестве кофермента. В реакции переаминирования глутаминовая кислота служит донором аминогруппы. В этой роли может выступать и амид:



Реакция происходит под действием фермента *глутаматсинтазы*. При недостатке NH_4^+ микроорганизмы синтезируют аминокислоты по *глутамин/глутаматному* пути, т.е. при сочетании реакций образования амида и переаминирования его с α -кетоглутаратом. При избытке аммония работает глутаматдегидрогеназа и происходит *восстановительное аминирование кетокислот*.

Метаболизм серы

Сера входит в состав метионина, цистеина, глутатиона, кофермента А, сульфополипидов и сульфополисахаридов. Некоторые соединения серы используются в катаболизме. Сера входит в состав этих соединений в восстановленной форме (S^{2-}). Все микроорганизмы делятся на способных расти только при наличии S^{2-} и на способных к восстановлению окисленных соединений серы. Процесс *ассимиляционной сульфатредукции* может проходить в двух вариантах, различающихся конечными стадиями (рис. 148). Сульфополипиды и сульфополисахариды образуются при участии ФАФС.

Пути синтеза основных органических соединений

Аминокислоты и белки. Белки синтезируются из двадцати аминокислот, предшественниками которых являются различные интермедиаты катаболизма. Все аминокислоты делятся на группы в соответствии со своим биосинтетическим происхождением. Синтез аминокислот *группы глутаминовой кислоты* (глутаминовая кислота, глутамин, аргинин, пролин) берет начало от α -кетоглу-

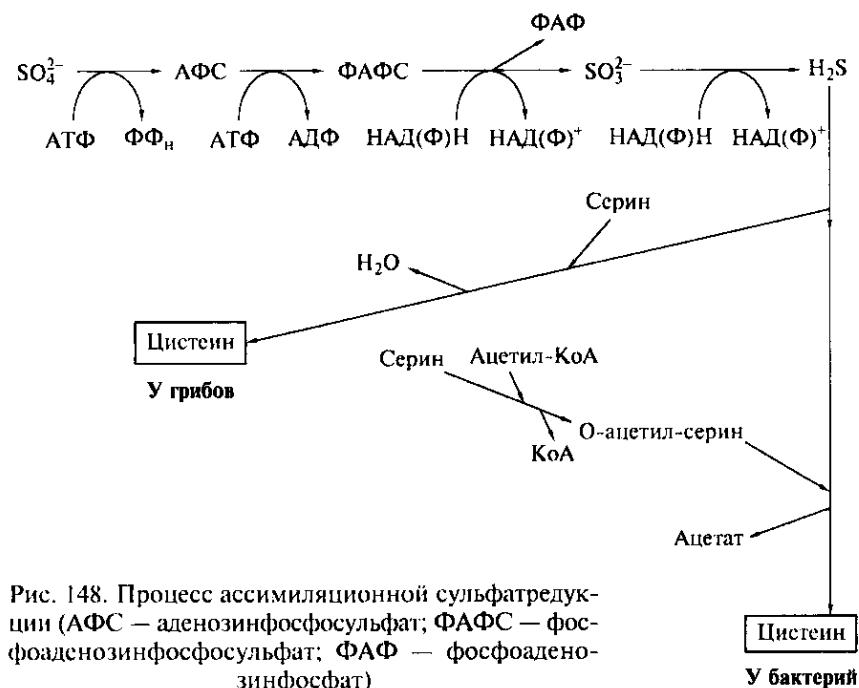


Рис. 148. Процесс ассимиляционной сульфатредукции (АФС — аденозинфосфосульфат; ФАФС — фосфоаденозинфосфосульфат; ФАФ — фосфоаденозинфосфат)

тарата, интермедиата цикла Кребса. Другой интермедиат ЦТК, оксалоацетат, дает начало цепи реакций, приводящих к образованию аспарагиновой кислоты, аспарагина, метионина, треонина, изолейцина и лизина (*группа аспарагиновой кислоты*). Синтезы *группы ароматических аминокислот* (триптофана, фенилаланина и тирозина) начинаются с конденсации ФЕП из гликолитического пути и эритрозо-4-фосфата из пентозофосфатного пути. Другие интермедиаты гликолиза — 3-ФГК и пируват — дают начало реакциям, приводящим к синтезу аминокислот *группы серина* (серин, глицин, цистеин) и *группы пировиноградной кислоты* (аланин, валин, лейцин) соответственно. Биосинтез *гистидина* сильно отличается от синтеза других аминокислот и тесно связан с путями образования пуринов. Два атома углерода пятичленного имидазольного кольца и три атома углерода боковой цепи происходят из фосфорибозилпирофосфата. Фрагмент С—N этого кольца образуется из пуринового ядра АТФ, а другой атом азота — из глутамина.

С путями биосинтеза аминокислот связано образование ряда важных *азотсодержащих соединений* клетки. Так, *пара*-оксибензойная и *пара*-аминобензойная кислоты образуются на путях биосинтеза группы ароматических аминокислот, полиамины (путресцин, спермидин, спермин) — группы глутаминовой кислоты, диаминопимелиновая и дипиколиновая кислоты — группы аспараги-

новой кислоты, пантотеновая кислота — группы пировиноградной кислоты, а пурины и порфирины — группы серина.

Для биосинтеза *белков* требуется присутствие не только ферментов и мономеров (аминокислот), но и *матрицы* (молекулы иРНК), задающей последовательность присоединения аминокислот к растущей цепи, а также специфического переносчика для активирования мономера и отбора его в соответствии с заданным кодом (тРНК). Реакция образования новой пептидной связи происходит на рибосоме и катализируется ферментом пептидилтрансферазой. Полипептидная цепь растет в направлении от N- к C-концу.

Липиды. Липиды — это группа соединений, разнообразных по химическому составу, но нерастворимых в воде. Условно их можно разделить на вещества, содержащие *жирные кислоты*, связанные эфирной связью (нейтральные жиры, фосфолипиды, гликолипиды, липополисахариды, полиалканоаты и т.д.), и вещества, содержащие *изопrenoвые фрагменты* (полиизопрены, каротиноиды, стеролы, хлорофиллы, хиноны и т.д.).

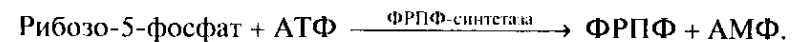
Важную роль в синтезе *жирных кислот* играет *ацилпереносящий белок* (АПБ), на котором происходит наращивание углеродной цепи образуемой жирной кислоты. Синтез жирных кислот с четным числом атомов углерода начинается с образования ацетил-АПБ и малонил-АПБ и их последующей конденсации. При этом происходит образование ацетоацетил-АПБ, выделение CO_2 и освобождение одной молекулы АПБ. Далее следует ряд последовательных реакций восстановления с образованием бутирил-АПБ. Каждый последующий акт взаимодействия с малонил-АПБ приводит к удлинению растущего АПБ-соединения на два атома углерода. Синтез жирных кислот с нечетным числом атомов отличается только первой реакцией, где происходит конденсация пропионил-АПБ с малонил-АПБ. Двойные связи образуются в молекуле жирной кислоты либо путем десатурации уже полностью синтезированных насыщенных жирных кислот с участием молекулярного кислорода (аэробный путь), либо с помощью реакции дегидратации во время роста цепи жирной кислоты (анаэробный путь).

В синтезе *фосфолипидов* принимает участие интермедиат гликолиза диоксиацетонфосфат, который восстанавливается до 3-фосфоглицерола и присоединяет два остатка жирных кислот, связанных с АПБ. При этом образуется фосфатидная кислота и регенерируется свободный АПБ. К активированной с помощью ЦТФ фосфатидной кислоте затем присоединяются через фосфатную группу серин, α -глицерофосфат, инозит и другие вещества, образуя фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, кардиолипин, фосфатидилинозит и т.д.

При образовании *изопrenoидных липидов* первые стадии связаны с последовательной конденсацией трех молекул ацетил-КоА в разных положениях и перегруппировкой полученного соедине-

ния. В результате синтезируется разветвленная мевалоновая кислота, которая претерпевает два последовательных фосфорилирования и декарбоксилирование с образованием активированного C_5 -соединения, являющегося предшественником сложных изопrenoидных веществ. В основе таких синтезов лежат реакции элонгации линейных изопренов и конденсация молекул с разным числом углеродных атомов в различных положениях («голова к хвосту», «хвост к хвосту» и т.д.).

Нуклеиновые кислоты. Нуклеиновые кислоты синтезируются из пурин- и пиримидиннуклеозидтрифосфатов, которые имеют в целом сходное строение. В них пуриновое или пиримидиновое основание соединено с пентозой через атом азота (*нуклеозид*), а фосфатные группы находятся в 5'-положении (*нуклеотид*). *Дезоксирибонуклеотиды* образуются из рибонуклеотидов путем восстановления. Синтез *рибонуклеотидов* начинается с образования 5-фосфорибозил-1-пирофосфата (ФРПФ) в соответствии с реакцией



Рибозо-5-фосфат является промежуточным продуктом пентозофосфатного пути, и это еще раз демонстрирует тесную связь энергетических и конструктивных процессов метаболизма микроорганизмов.

Пуриновые рибонуклеотиды далее синтезируются путем последовательного присоединения amino- и углеродсодержащих групп к ФРПФ с образованием девятичленного пуринового кольца. Наоборот, в случае *пиримидиновых* рибонуклеотидов сначала происходит конденсация аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата с образованием шестичленного пиримидинового кольца, а затем присоединение рибозофосфатного остатка.

Образование *нуклеиновых кислот* осуществляется путем *матричного синтеза* в процессах *репликации* и *транскрипции*. Репликация ДНК происходит на каждой цепи двунитевой материнской ДНК в качестве *матрицы* при участии ферментов *ДНК-полимераз* с дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатами в качестве субстратов. Матрицей для транскрипции служит одна из цепей ДНК, а субстратами — рибонуклеотид-5'-трифосфаты. Синтез РНК происходит с помощью ферментов *РНК-полимераз*.

Пути синтеза некоторых сложных веществ

Порфирины. Порфины — это сложные азотсодержащие вещества, служащие простетическими группами ряда ферментов и хлорофиллов. Конденсация сукцинил-КоА и глицина и ряд последующих модификаций приводят к образованию пятичленного азотсодержащего кольца с тремя заместителями (порфобилиногена),

четыре молекулы которого далее объединяются в тетрапиррольное ядро протопорфирина IX. Последующие реакции могут приводить к синтезу *гема* (при введении в молекулу атома железа) или образованию *хлорофилла* (при введении в молекулу магния). Различные формы хлорофиллов синтезируются в дальнейшем с помощью реакций периферического метаболизма определенных групп фототрофных микроорганизмов.

Пептидогликан (муреин). Пептидогликан — структурный полимер, входящий в состав клеточных оболочек большинства прокариотических микроорганизмов. Он состоит из линейных молекул гликана, соединенных между собой поперечно пептидами, содержащими 3—6 аминокислотных остатков. Гликан муреина образован остатками N-ацетил-N-глюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных β -1,4-связями. Пептиды содержат чередующиеся L- и D-аминокислоты и часто — мезо-диаминопимелиновую кислоту (ДАП). Незанятые в пептидных связях карбоксильные и аминогруппы аминокислот могут оставаться свободными или образовывать поперечные связи между пептидными мостиками. Аминокислотный состав и строение пептидов муреина имеют большое значение при идентификации грамположительных микроорганизмов.

Начальные этапы синтеза пептидогликана происходят в цитоплазме, где N-ацетилглюкозамин присоединяется к УДФ. В та-

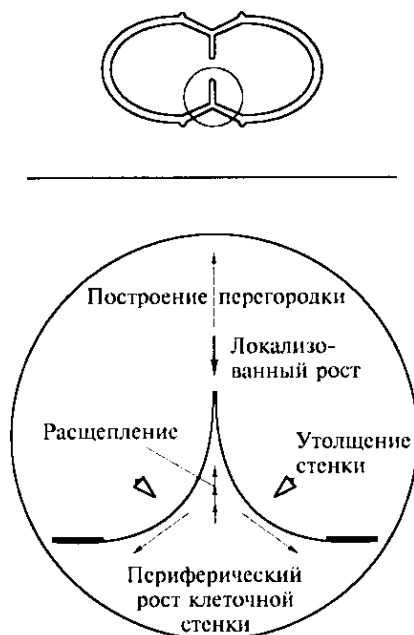


Рис. 149. Схема нарастания клеточной стенки (перегородки или перетяжки) при делении бактериальной клетки. Часть делящегося кокка, обведенная окружностью, показана детально на нижней части рисунка. Черная стрелка обозначает место нарастания нового материала переднего конца септы. Группа из трех небольших стрелок показывает места действия гидролаза муреина, которые разделяют вновь образованный материал. В результате новый материал выталкивается наружу, увеличивая поверхности двух дочерних клеток. Две белые стрелки указывают места утолщения, три пунктирные стрелки показывают направления увеличения периферических стенок и нарастания центральной перегородки. Старый слой пептидогликана показан черным

ком связанном с УДФ состоянии он реагирует с ФЕП, образуя N-ацетилмурамовую кислоту. Далее последовательно присоединяются аминокислоты пептидного мостика, каждая при участии специфического фермента, с затратой энергии АТФ и при наличии ионов Mn^{2+} . Продукт реакции УДФ-N-ацетилмурамилпептид и УДФ-N-ацетилглюкозамин вступают в реакцию трансгликозилирования в ЦПМ при участии промежуточного гидрофобного переносчика — специфического фосфолипиды. В цитоплазматической мембране могут происходить также реакции присоединения различных групп, в том числе остатков аминокислот, к свободным карбоксильным и аминогруппам аминокислот пептида. Образовавшаяся структурная единица пептидогликана переносится на растущую в оболочке цепь муреина и присоединяется к ней путем трансгликозилирования и транспептидирования. В процессе созревания вновь синтезированного муреина увеличивается число пептидных швов.

При нарастании клеточной стенки в процессе роста и деления распределение вновь образованного пептидогликана происходит с участием гидролаз муреина (рис. 149, 150).

Запасные вещества. Это продукты клеточного метаболизма, образующиеся при избытке экзогенных питательных веществ и использующиеся в условиях голодания или в период адаптации клеток к новым субстратам. Основной их функцией считают обеспечение клеток энергией и необходимыми элементами. Химически инертное состояние запасных веществ в клетке и наличие в ряде случаев белковой оболочки вокруг них способствует сохранению осмотаза клеточного содержимого. Наиболее распространенными запасными веществами у микроорганизмов являются полисахариды, липиды (полиалканоаты), волютин.

Запасные *липиды* прокариот чаще всего представлены *поли- β -гидроксимасляной кислотой* (ПОМ), которая откладывается при из-

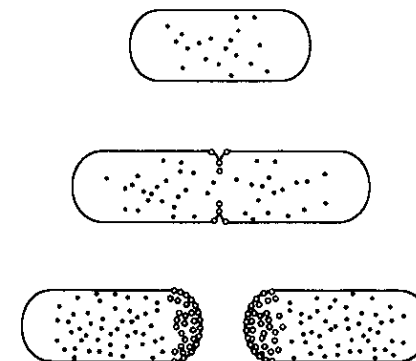


Рис. 150. Схема преимущественного нарастания клеточной стенки при делении палочковидной бактерии. Черные кружки показывают места случайного включения нового материала в цилиндрическую часть клетки при ее удлинении (диаметр клетки при этом не меняется); белые кружки — места включения нового материала стенки в зонах деления клетки. В результате формируются «полярные шапки», состоящие только из муреина, синтезированного в зоне деления клетки

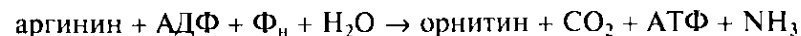
бытке углеродных энергетических субстратов и недостатке азота. В клетках ПОМ присутствует в виде округлых гранул, окруженных белковой мембраной. Запасание ПОМ характерно для микроорганизмов родов *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Zooglea*, *Rhodospirillum* и др. В условиях голодания распад гранул ПОМ происходит за счет их гидролиза при участии специфической деполимеразы.

Микроорганизмы запасают гликоgeno- или крахмалоподобные *полисахариды* при избытке источника углерода и энергии и недостатке азота в виде сферических или неправильной формы гранул. Полисахариды построены из остатков D-глюкозы, соединенных разными связями. *Гликоген*оподобные *запасные полисахариды* характерны для дрожжей, бактерий кишечной группы, стрептококков и других и широко распространены. *Крахмал*оподобный *полисахарид* *гранулеза* присущ более узкой группе микроорганизмов (клостридиям).

Накопление *волкутина* широко распространено среди разных групп микроорганизмов (например, *Spirillum*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*) и происходит в среде, богатой фосфатами. Волкутиновые гранулы состоят из полифосфатов, являющихся депо фосфора и, возможно, имеющих энергетическое значение. Полифосфаты синтезируются за счет реакции: $АТФ + (HPO_3)_n = АДФ + (HPO_3)_{n+1}$, катализируемой фосфаткиназой.

Включения серы наблюдаются у микроорганизмов, способных использовать соединения серы в своем метаболизме (тионовые и анакисгенные фототрофные бактерии). Элементарная сера является интермедиатом окисления сероводорода и при его избытке накапливается в клетке. Недостаток H_2S в среде стимулирует использование запасов серы и окисление ее до сульфата. В клетках элементарная сера содержится в виде гранул, окруженных однослойной белковой мембраной.

У цианобактерий в условиях голодания по азоту расходуется специфическое запасное вещество *цианофицин*, являющийся сополимером аргинина и аспартата (мультиаргининполиаспартат). Цианофицин может быть и энергетическим субстратом за счет реакции:



Реакция катализируется ферментом аргинингидролазой, а АТФ синтезируется путем субстратного фосфорилирования.

Вторичные метаболиты

Вторичные метаболиты — это вещества микробного (или растительного) происхождения, не существенные для роста и репродукции образующего их организма. Каждый вторичный метаболит производится относительно ограниченным числом видов. Эти

соединения синтезируются в конце экспоненциальной или в течение стационарной фаз роста, и их формирование в значительной степени зависит от условий роста, особенно состава питательной среды. Многие вторичные метаболиты имеют химическую структуру, необычную для биологической материи. Это соединения, относящиеся к разнообразным классам органических веществ, — аминокислоты, кумарины, эпоксиды, нерибосомальные пептиды, полиены, пирролы, терпеноиды, тетрациклины. На рис. 151 изображена схема, показывающая связь первичного и вторичного метаболизма. Все вторичные метаболиты получаются из интермедиатов первичного метаболизма с помощью четырех классов биосинтетических реакций:

- 1) преобразование первичного метаболита в специфический предшественник для вторичного метаболизма;
- 2) реакции модификации или активации, уводящие предшественник на путь вторичного метаболизма;
- 3) полимеризация и конденсация;
- 4) поздние реакции модификации.

К вторичным метаболитам относятся антибиотики (см. гл. 5), токсины (например, эрготоксин спорыньи), поликетиды (вещества с антибиотической и иммунодепрессантной активностью ши-

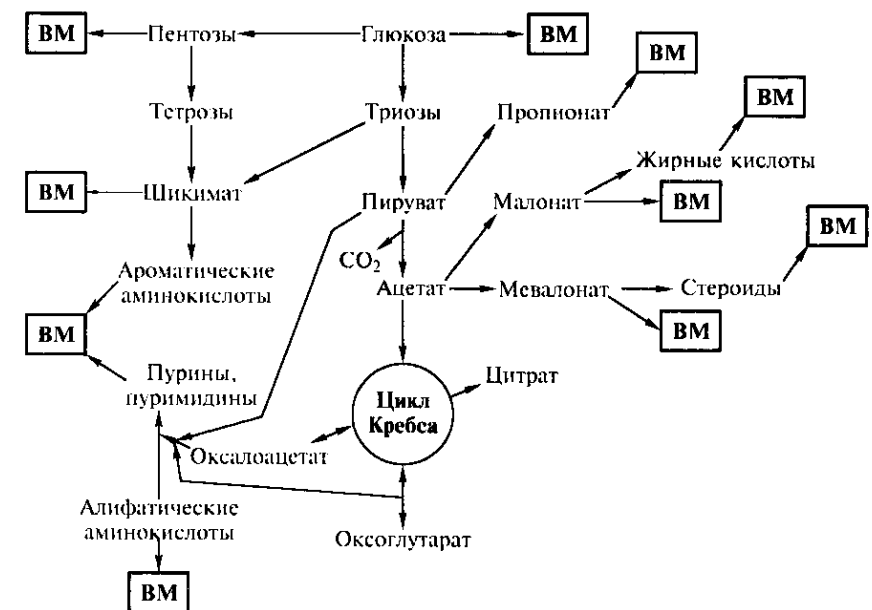


Рис. 151. Связь вторичного и первичного метаболизма (ВМ — вторичные метаболиты)

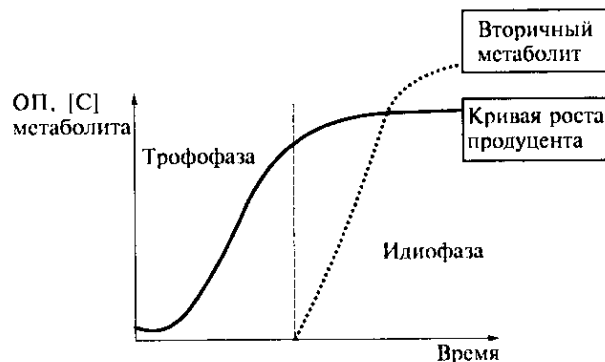


Рис. 152. Развитие культуры и синтез вторичного метаболита (ОП — оптическая плотность суспензии продуцента)

рокого спектра действия), изопреноиды (каротиноиды, стероиды, гиббереллины, фитоалексины, антираковые антибиотики). Сюда же можно отнести и некоторые запасные вещества типа *полигидрокси-алканоев*. Если образование первичного метаболита происходит одновременно с ростом и размножением культуры, то для продуцента вторичных метаболитов принято говорить о *трофофазе* (когда культура растет и размножается) и *идиофазе* (когда рост замедляется или останавливается и начинается синтез продукта) (рис. 152). Вообще, о механизмах переключения путей метаболизма с первичного на вторичный и о физиологической роли вторичных метаболитов в жизни собственного продуцента достоверно известно очень мало. Неизвестно, насколько распространен вторичный метаболизм в природе. Само понятие «вторичный метаболит» достаточно расплывчатое и многие исследователи его не признают.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные пути ассимиляции углекислоты микроорганизмами. Какое значение в метаболизме имеет реакция Вуда—Веркмана?
2. Назовите основные процессы метаболизма азота и серы у микроорганизмов.
3. Каковы основные этапы синтеза биологических полимеров у микроорганизмов?
4. Перечислите стадии синтеза порфиринов и пептидогликана.
5. Когда и как в клетках микроорганизмов образуются запасные вещества?
6. Назовите особенности вторичного метаболизма и перечислите наиболее известные вторичные метаболиты.

Глава 9

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА У МИКРООРГАНИЗМОВ

Значение процессов регуляции

Для самого существования жизни важны как регуляция активности отдельных путей метаболизма, так и координация деятельности этих путей. Дезорганизация без адекватного контроля метаболизма приводит к гибели клетки.

Задача регуляторных механизмов необычайно сложна. Все пути метаболизма должны регулироваться и координироваться так эффективно, чтобы клеточные компоненты присутствовали в данный момент в точно необходимых количествах. К тому же микробные клетки должны эффективно «отвечать» на изменения окружающей среды использованием имеющихся на данный момент питательных веществ и включением новых катаболических путей, когда другие вещества становятся доступными. Поскольку композиция химических соединений окружающей среды постоянно меняется, регуляторные процессы должны постоянно соответствовать новым условиям. Регуляция важна для поддержания баланса между энергодающими и синтетическими реакциями в клетке.

Основные способы регуляции микробного метаболизма

Поток углерода через тот или иной путь может регулироваться следующими основными способами:

- локализацией метаболитов и ферментов в разных частях клетки;
- стимуляцией или ингибированием активности определенных ферментов, позволяющей быстро менять путь метаболизма;
- контролем количества молекул фермента у микроорганизмов обычно на уровне транскрипции. Этот способ более медленный, ферменты синтезируются только в случае, когда в них есть необходимость.

Пространственное и временное разделение ферментов и метаболитов. Достигается в основном за счет *компартиментализации*, т. е. распределения ферментов и метаболитов в разных клеточных струк-

турах или органеллах. Компартментализация особенно распространена у эукариотических микроорганизмов, у которых много оргanelл с собственными мембранами. Например, окисление жирных кислот локализовано в митохондриях, тогда как синтез жирных кислот происходит в цитоплазматическом матриксе. Компартментализация делает возможным одновременное, но раздельное регулирование анаболических путей. Далее активность данного пути может координироваться в общем метаболизме путем регуляции транспорта метаболитов и коферментов между клеточными компартментами. Неоднородность клеточной внутренней среды позволяет создавать градиенты метаболитов около определенных ферментных систем.

Контроль активности ферментов. Контроль осуществляется несколькими способами.

Аллостерическая регуляция предполагает наличие у молекулы фермента двух сайтов — каталитического и регуляторного. Под действием **эффектора** — небольшой молекулы, обратимо нековалентно связывающейся с регуляторным сайтом фермента, происходит конформационное изменение его каталитического сайта (рис. 153). Примером может служить аспартаткарбомойлтрансфераза из *E. coli*, для которой ЦТФ (конечный продукт биосинтеза пиримидинов) — негативный эффектор, а АТФ — позитивный эффектор. Эффекторы изменяют K_M , но не максимальную скорость реакции (рис. 154).

Ковалентная модификация ферментов — это обратимый процесс, заключающийся в ковалентном связывании или удалении определенной группы, что изменяет активность фермента. Напри-

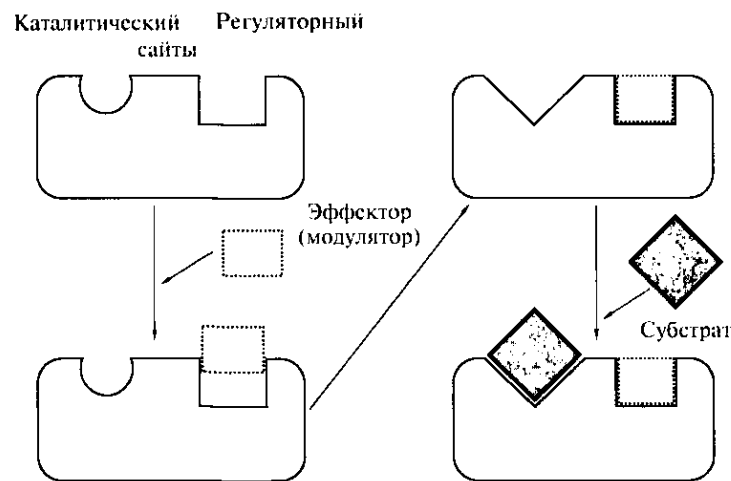


Рис. 153. Схема аллостерической регуляции активности фермента

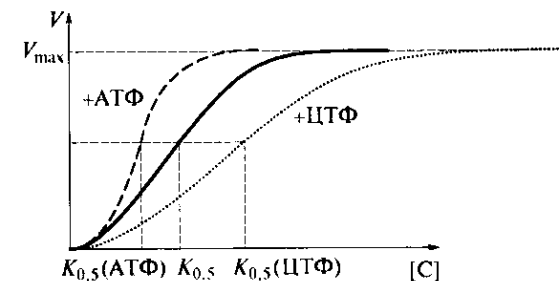


Рис. 154. Влияние негативного (ЦТФ) и позитивного (АТФ) эффекторов на кинетические характеристики (V_{max} и K_M) аспартаткарбомойлтрансферазы из *E. coli*

мер, для активирования гликогенфосфоорилазы из *Neurospora crassa* необходима ковалентная модификация молекулы фермента (рис. 155). У *E. coli*, наоборот, модифицированная форма глутаминсинтетазы менее активна.

Каждый путь имеет хотя бы один фермент, определяющий скорость всего процесса, так как катализирует самую медленную, лимитирующую скорость реакцию. Обычно таким «узким местом» является первая стадия процесса. Фермент «узкого места» обычно подвергается **ингибированию** конечным продуктом пути. Разветвленные биосинтетические пути достигают баланса между конечными продуктами через регулирование ферментов в точках разветвления. Регуляция сильно разветвленных путей основана на наличии **изоферментов**, разных ферментов, катализирующих аналогичные реакции. В таких условиях один из конечных продуктов уменьшает активность процесса, но не блокирует его полностью, поскольку некоторые изоферменты остаются активными.

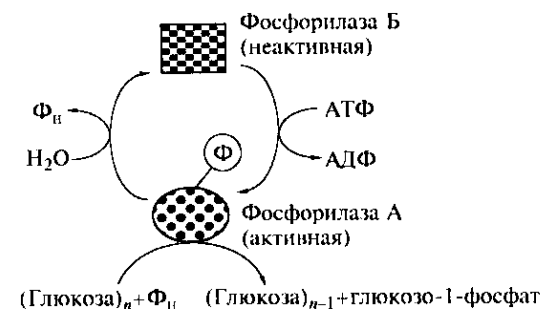


Рис. 155. Схема ковалентной модификации гликогенфосфоорилазы из *Neurospora crassa*

Управление синтезом ферментов. Ферменты, синтезирующиеся независимо от условий выращивания микроорганизма, называются *конститутивными* (например, ферменты утилизации глюкозы), а синтезирующиеся при наличии определенного доступного субстрата — *индуцибельными* (ферменты утилизации лактозы у *E. coli*, ферменты деградации аминокислотных соединений у *Pseudomonas*).

РНК-полимераза нуждается в наличии *сигма-фактора* для связывания *промотора* и инициации *транскрипции*. Сложный процесс, требующий радикальных изменений в транскрипции или синтезе продуктов разных генов в определенной последовательности, может регулироваться серией сигма-факторов. Каждый сигма-фактор дает возможность *кор-ферменту* узнавать специфическую последовательность и транскрибировать именно эти гены. Замена сигма-фактора немедленно изменяет экспрессию генов. Бактериофа-

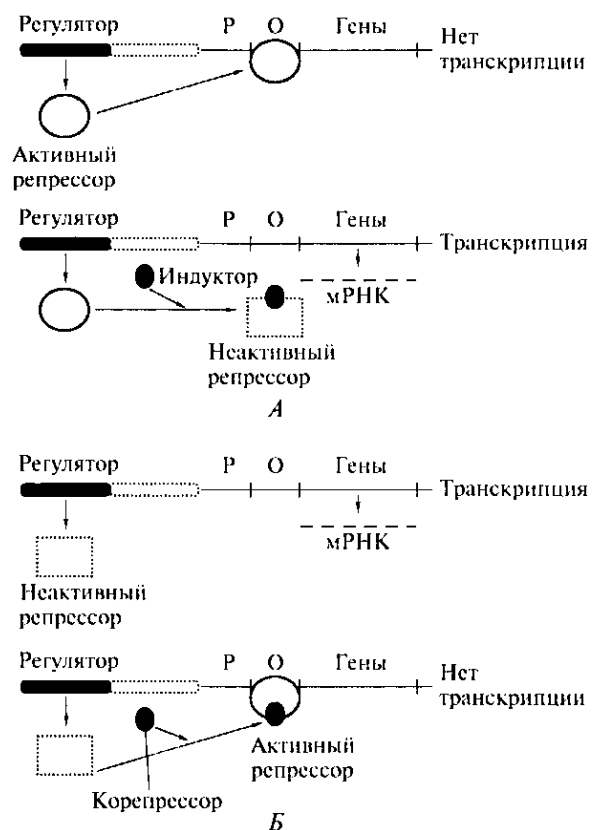


Рис. 156. Схемы индукции (А) и репрессии (Б) синтеза фермента (Р — промотор; О — оператор)

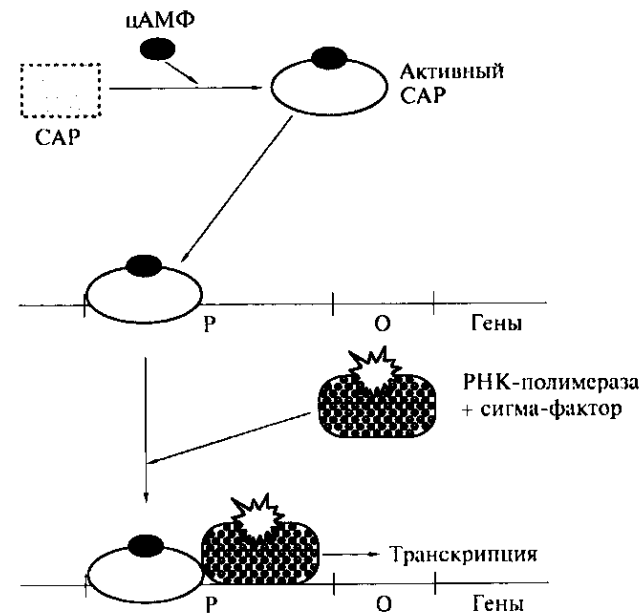


Рис. 157. Регуляция *lac*-оперона *E. coli* CAP-белком и цАМФ

ги часто используют сигма-факторы для контроля синтеза иРНК в своем жизненном цикле. Этот регуляторный механизм распространен как среди грамотрицательных, так и среди грамположительных бактерий. Например, *E. coli* синтезирует несколько сигма-факторов. При нормальных условиях РНК-полимеразную активность направляет σ^{70} . Для выработки *белков-флагеллинов* *E. coli* образует σ^F . При высоких температурах появляется σ^H и стимулирует формирование 17 *белков теплового шока* для защиты клетки от термической деструкции.

Другой механизм управления синтезом нужного фермента — это *индукция и репрессия* (рис. 156). Например, фермент β -галактозидаза — индуцибельный фермент у *E. coli*, уровень которого повышается в присутствии небольшой молекулы (аллолактозы), называемой *индуктором*. Аминокислоты, присутствующие в окружающей среде, могут снижать образование ферментов, ответственных за их биосинтез. Тогда эти ферменты относят к *репрессибельным*, а метаболиты, вызывающие снижение синтеза такого фермента, называют *корепрессорами*.

Примером оперона под позитивным контролем может служить *lac*-оперон. Такие опероны функционируют только в присутствии контролирующего фактора. *Lac*-оперон регулируется CAP-белком (catabolite activator protein) или цАМФ (рис. 157). Если *E. coli* растет в среде с глюкозой и лактозой, то наблюдается явление *диаук-*

сии: сначала используется вся глюкоза, а затем после короткого лаг-периода начинает потребляться лактоза. Ферменты катаболизма глюкозы конститутивны, поэтому САР-белок на них не влияет. Когда бактерии растут на глюкозе, уровень цАМФ падает, что приводит к дезактивации САР-белка, и *lac*-оперон не экспрессируется (*катаболитная репрессия*). Уменьшение количества цАМФ может быть следствием влияния *ФЕП-фосфотрансферазной системы* (см. рис. 77) на активность *аденилатциклазы*. Фосфорилированная форма фермента Е3 этой системы может донировать фосфат глюкозе во время ее транспорта в клетку либо активировать аденилатциклазу. Если глюкозы в среде много и она активно транспортируется, то количество фосфорилированного Е3 мало, аденилатциклаза неактивна и уровень цАМФ падает. К тому же преобладающая нефосфорилированная форма Е3 связывает пермеазу лактозы, аллостерически ингибируя ее и таким образом блокируя поглощение лактозы из среды. Активный катаболизм глюкозы приводит к возрастанию *энергетического заряда* клетки, так как среди аденозинфосфатов преобладает АТФ, поэтому можно сказать, что чем больше энергетический заряд клетки, тем меньше образуется цАМФ.

Энергетический заряд клетки рассчитывают по формуле

$$\frac{[\text{АТФ}] + \frac{1}{2}[\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

Теоретически он может колебаться от 1 (только АТФ) до 0 (только АМФ). В растущей культуре его значение приблизительно равно 0,8. При значении энергетического заряда < 0,5 клетки погибают. АМФ и АДФ являются положительными эффекторами энергодающих процессов, а АТФ — отрицательным эффектором. Можно сказать, что интенсивность катаболических процессов регулируется внутриклеточным содержанием АТФ.

Бактерии также могут регулировать транскрипцию с помощью механизма *аттенуации* (рис. 158). Примером может служить процесс синтеза триптофана у *E. coli*. Если триптофан в среде есть, то в клетке имеется много триптофанил-тРНК. Трансляция и транскрипция тесно связаны: если после транскрипции РНК-полимеразой лидерной последовательности и нескольких сегментов до гена *trpE* не начинается трансляция, то РНК-полимераза диссоциирует от ДНК. Для продолжения транскрипции необходимо, чтобы шла трансляция уже образованного участка иРНК. При наличии большого количества триптофанил-тРНК трансляция быстро проходит через *trp*-кодоны и останавливается на сегменте 2, что позволяет сегментам 3 и 4 сформировать «*терминаторную шпильку*» (см. рис. 158, Б). РНК-полимераза диссоциирует с ДНК, и транскрипция прекращается. Если триптофана и, соответствен-

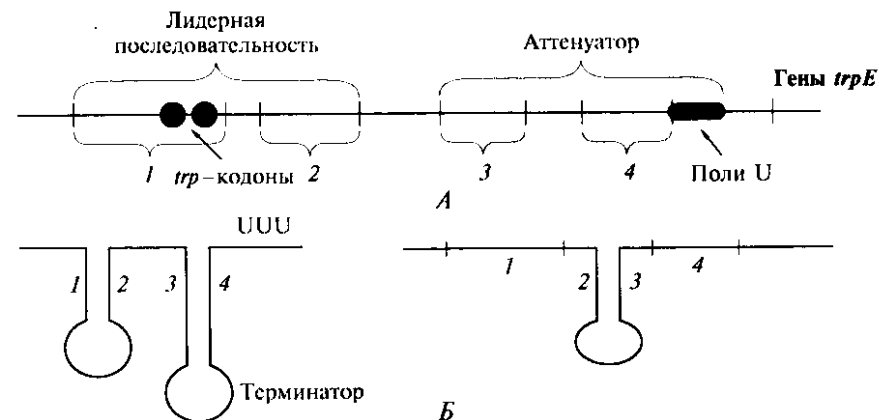


Рис. 158. Расположение групп нуклеотидов в ДНК (А) и разные варианты образования «шпильки» (Б) при аттенуации (1—4 — сегменты ДНК)

но, триптофанил-тРНК в клетке мало, то трансляция идет медленно и рибосома останавливается на *trp*-кодонах в сегменте 1, что позволяет образоваться петле из сегментов 2 и 3, а сегмент 4 остается свободным (см. рис. 158, Б) и «*терминаторная шпилька*» не образуется. Транскрипция продолжается, и транскрибируется триптофановый оперон, содержащий структурные гены пяти ферментов биосинтетического пути триптофана. Таким образом, аттенуацией называется контроль продолжения транскрипции специфическими аминокислот-тРНК.

Репрессия уменьшает транскрипцию приблизительно в 70 раз, аттенуация снижает ее в 8—10 раз, а действуя вместе, эти механизмы уменьшают транскрипцию почти в 600 раз.

Еще один механизм регуляции, обнаруженный значительно позднее, — регуляция с помощью *антисмысловых РНК*. Специальный тип маленьких молекул РНК имеет последовательность оснований, комплементарную сегменту РНК-мишени, связываясь с которой, антисмысловые РНК могут блокировать репликацию ДНК, транскрипцию или трансляцию. Такие РНК кодируются *антисмысловыми генами* (antisense genes). Оказалось, что этот способ регуляции широко распространен среди бактерий и вирусов. Такой регуляции могут подвергаться репликация плазмид, синтез белков-поринов, репродукция фага λ.

Регуляция сложных событий в клетке. Значительно меньше известно о регуляции более сложных событий в клетке, таких, как *споруляция* и *прорастание споры* (см. гл. 3) и *клеточное деление*.

Регуляция клеточного цикла, т. е. времени от момента образования новой клетки до следующего деления, наиболее изучена у *E. coli*. Молодая клетка, растущая с постоянной скоростью, удваивается в длину, не изменяясь в диаметре, а затем делится на две

НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основные термины

Современные представления о генетическом аппарате прокариот описаны выше (см. гл. 3). В определенных условиях в клетке может находиться несколько копий *бактериальной хромосомы*. ДНК содержится также во внехромосомных генетических элементах — *плазидах*, в большинстве случаев являющихся кольцевыми, автономно реплицирующимися небольшими молекулами.

Совокупность всех генов организма называют *генотипом*, а совокупность присущих организму признаков — *фенотипом*. При изменении внешних условий большинство клеток в популяции претерпевает изменения, имеющие приспособительный характер (*адаптационная изменчивость*).

Адаптации не затрагивают генотип и вызваны регуляцией клеточного метаболизма. Они не наследуются.

Скачкообразные изменения генотипа носят название *мутаций*. Спонтанными называют мутации, вызванные неизвестными факторами, а индуцированные происходят под влиянием определенных факторов, называемых *мутагенами*. Изменение одного нуклеотидного остатка (замена, вставка или выпадение) называют точечной мутацией. Мутации, затрагивающие большие участки ДНК, ведут к нарушениям последовательности и количества генов.

Защитой генетического материала от повреждающего действия мутагенов независимо от их природы служат *репарационные системы* (*фотореактивация* и *темновая репарация*).

Для проявления мутации необходимо, чтобы произошла репликация ДНК и изменение закрепилось в дочерней молекуле. Для фенотипического проявления мутации требуется прохождение транскрипции и трансляции. Так как микроорганизмы существуют не в виде отдельных особей, а в виде популяций, то, как правило, нужно несколько клеточных делений, чтобы новый признак проявился.

Если клетка имеет несколько копий хромосомы, то мутация также проявится в фенотипе клеток только через несколько клеточных делений.

клетки равного размера путем поперечного деления. Так как каждая дочерняя клетка обладает хотя бы одной копией генетического материала, репликация ДНК и клеточное деление должны быть тесно скоординированы. Если ингибировать репликацию ДНК ядами или с помощью мутаций, то клеточное деление тоже блокируется, при этом клетки продолжают удлиняться, образуя длинные филаменты. У *E. coli* при температуре 37 °С деление обычно происходит через 20 мин после завершения репликации. За это время генетический материал должен быть распределен между дочерними клетками. Для разделения копий ДНК необходимо участие белков ParA, ParB, MukB и некоторых других. ParA и ParB локализованы на полюсах клетки перед делением и, возможно, являются частью аппарата, похожего на митотический. Движение ДНК также может быть результатом роста мембраны и синтеза клеточной стенки. После того как хромосомы разошлись, между ними формируется поперечная стенка или септа. Для запуска репликации ДНК бактерия должна достигнуть определенного порогового размера или начальной массы. Репликация ДНК и клеточное деление вместе занимают около 40 мин.

Инициация репликации ДНК требует, чтобы к сайту начала репликации присоединились несколько молекул белка DnaA. Активная форма этого белка связана с АТФ, поэтому регуляция инициации может осуществляться взаимопереходом DnaA-АТФ и DnaA-АДФ. Следующий цикл репликации начинается не сразу, так как родительская нить ДНК метилируется сразу после репликации и становится неактивной.

Итак, для образования перегородки и клеточного деления необходимы как завершение репликации ДНК, так и достижение пороговой длины клетки. Повреждение ДНК ингибирует образование септы. Для инициации образования перегородки важно наличие FtsZ-белка. Этот белок между делениями равномерно распределен в цитоплазме клетки, а в начале деления он формирует z-кольцо в месте образования септы. Необходимо также участие белков, осуществляющих трансгликозилирование и транспептидацию в синтезе пептидогликана при создании новой клеточной стенки.

Регуляция бактериального клеточного цикла очень сложна и включает несколько взаимодействующих регуляторных механизмов.

Контрольные вопросы

1. Каково значение процессов регуляции метаболизма в жизни клетки?
2. Перечислите основные способы регуляции микробного метаболизма.
3. Какой способ регуляции позволяет быстро менять путь метаболизма?
4. Какой механизм регуляции лежит в основе явления диауксии?
5. Какие события должны быть скоординированы для правильного прохождения клеточного цикла?

Рекомбинация генетического материала у прокариот

Наследственную изменчивость у прокариотических микроорганизмов вызывают рекомбинации генетического материала трех основных типов: конъюгация, трансформация и трансдукция.

Конъюгация предполагает непосредственный контакт клетки-донора и клетки-реципиента. Клетка-донор должна обладать так называемой *половой плазмидой* — F-фактором, который может быть автономен или интегрирован в хромосому.

F-фактор обуславливает способность донорной клетки вступать в контакт с реципиентом, формировать половые F-пили, а также передавать генетический материал. При интеграции F-фактора в хромосому такая передача осуществляется с высокой частотой (штаммы Hfr).

Перенос генетического материала строго ориентирован: разрыв копии хромосомы и передача ДНК происходит в локусе θ в пределах полового фактора. Скорость переноса в одинаковых условиях для определенного штамма является постоянной. Обычно всей хромосоме не удается перейти в клетку-реципиент, так как контакт клеток очень нестабилен и часто прерывается до завершения перехода.

Поскольку первым реципиенту передается всегда один и тот же, специфичный для каждого штамма, участок хромосомы, частота передачи стоящих следом за ним генов позволяет расположить их по отношению к этому локусу и составить генетическую карту хромосомы.

Трансформацией называется процесс изменения свойств одних бактерий под влиянием экзогенной растворенной ДНК, выделенной из других бактерий.

Для трансформации не нужна клетка-донор, а проникновение фрагментов ДНК зависит от физиологического состояния клетки-реципиента (*компетентности*). Только двухцепочечные фрагменты ДНК значительной молекулярной массы могут быть трансформирующими агентами.

В геном может включиться ДНК с определенной степенью гомологии с ДНК реципиента.

Гены могут переноситься из одной бактериальной клетки в другую и в процессе *трансдукции*. При этом функцию векторов выполняют фаги, случайно захватывающие фрагмент бактериальной хромосомы в процессе формирования зрелых фаговых частиц. При заражении клетки-реципиента таким фагом может произойти включение фрагмента ДНК другой клетки путем обмена по гомологичным участкам.

Перенос генетического материала из одной клетки в другую осуществляется также путем передачи плазмид.

Явление диссоциации у прокариот

Механизм явления диссоциации еще не раскрыт полностью, и, более того, вопрос этот на протяжении многих лет остается дискуссионным. Однако в практике научных исследований с этим явлением, когда при рассеивании чистой культуры на твердой среде развиваются колонии разной морфологии, сталкивается почти каждый работающий с микроорганизмами. На самом деле, в этом случае микробная популяция гетерогенна не только морфологически, но затрагиваются также физиолого-биохимические и генетические признаки. Процесс имеет постоянный характер и более высокую частоту ($\sim 10^{-4}$), чем спонтанные мутации. Наиболее часто образуются три морфотипа колоний: R — шероховатые, S — гладкие и M — слизистые. Первоначально явление диссоциации было отмечено у патогенных микроорганизмов — *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, и в связи с разными фазами протекания болезни было названо «*вариацией фаз*» (S — вирулентный вариант, преобладает в эпидемической фазе, R — в постэпидемической). Диссоциация, безусловно, связана с изменениями в геноме.

При более внимательном изучении явления диссоциации у ряда микроорганизмов были обнаружены колонии одного морфотипа, но имеющие незначительные модификации (например, гладкие, но существенно различающиеся по блеску, и тогда обозначаемые как S_1).

Колонии разных морфотипов, отличающиеся по диаметру, содержат одинаковое количество по-разному упакованных клеток. Как правило, M- и R-колонии по диаметру в два раза больше, чем колонии S-варианта. В то же время каждая колония уже содержит клетки всех трех типов. В природных местообитаниях обычно наблюдают преобладание какого-либо из диссоциантов, но отмечают наличие всех трех вариантов.

Различия в виде колоний обычно выявляются не на любой плотной среде, а только на богатой углеводами. Различия на клеточном уровне выражаются в способе расхождения делящихся клеток (образуются либо цепочки клеток, лежащие на прямой, как у R-форм, либо расположенные под углом одна к другой V-образные формы, как у S- и M-вариантов). Различия в клеточных оболочках (капсула + клеточная стенка) обуславливают весь спектр различий физиолого-биохимических признаков диссоциантов. У диссоциантов, в частности, отмечена разная толщина и химический состав капсул (например, переход S- в R-вариант связан с потерей O-антигена). Клеточная стенка R-варианта в 1,5—2 раза толще, чем у S-формы. Химический состав и электрический заряд вещества капсул (при отрицательных зарядах возникает отталкивание оболочек) связаны с особенностями расхождения клеток при делении. Разное количество в мембранах диссоциантов липи-

дов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, влияет на их текучесть (например, R-вариант имеет меньше таких липидов, чем другие формы).

Такие параметры, как скорости роста и выделения продуктов, устойчивость к токсическим веществам, зависят от скоростей поглощения и экскреции веществ, активности мембранных ферментов, которые в свою очередь подвержены влиянию изменений в клеточных оболочках.

Явление диссоциации следует учитывать при проведении процессов в микробиологических производствах, так как при длительном культивировании медленно растущие варианты вытесняются быстро растущими, но, как правило, менее активными диссоциантами. К тому же диссоцианты могут синтезировать разное количество биологически активных веществ, спектр которых может различаться. У М-клеток, как правило, образуется максимальное количество экзопродуктов, R-варианты активнее разрушают ксенобиотики, так как они устойчивее к токсическим веществам. Учет гетерогенности популяции позволяет прогнозировать поведение ряда патогенных микроорганизмов в природных местообитаниях. Так, вирулентность популяции фитопатогенных псевдомонад может меняться в зависимости от погодных условий. В сухую погоду способность к заражению растений понижена из-за преобладания в популяции авирулентного R-варианта, более устойчивого к понижению активности воды.

Таблица 29

Селективные преимущества диссоциантов ряда мезофильных микроорганизмов при воздействии различных факторов

Факторы	Вариант		
	R	S	M
Температура 41 °С	+	-	-
Температура 14 °С	-	-	+
Ультрафиолет	+	-	-
Антибиотики	+	-	-
Высушивание	+	-	-
Литические вещества (лизозим)	+	-	-
NaCl (7%)	-	-	+
pH 4,0	-	+	-
pH 9,0	-	-	+
Аэрация	+	-	-
KH ₂ PO ₄ (0,5 %)	-	+	-

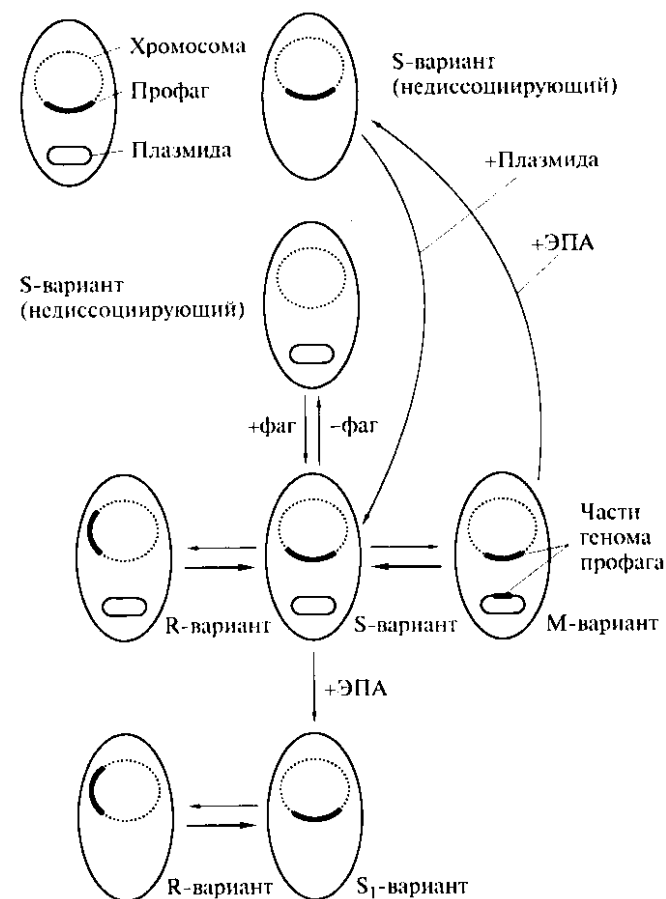


Рис. 159. Предполагаемая схема диссоциативных переходов у *Rhodococcus rubropertinctus* с участием фага и плазмиды (ЭПА — элиминирующий плазмиды агент)

Условия культивирования и хранения продуцента оказывают существенное влияние на состав его популяции. Бóльшая устойчивость одного из диссоциантов к какому-либо фактору может привести к полной смене состава популяции к концу инкубационного периода. В табл. 29 приведены данные о селективных преимуществах диссоциантов у ряда микроорганизмов при воздействии различных факторов.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что диссоциация — это адаптация к меняющимся условиям среды на уровне популяции.

Показано, что в диссоциации изученных микроорганизмов могут быть задействованы все генетические процессы — транс-

формация, трансдукция, фаговая конверсия, мигрирующие генетические элементы (умеренные фаги, плазмиды, транспозоны).

Для *Rhodococcus rubropertinctus* предложена гипотетическая схема диссоциативных переходов (рис. 159). У этой культуры при потере умеренного фага S-диссоциант перестает расщепляться, а утрата плазмиды приводит к тому, что остаются только R-S-переходы. Возможно, что в R-клетках профаг встраивается в другой, чем в S-клетках, участок хромосомы.

Для стабилизации синтеза биологически активных веществ в промышленности необходимо:

- получить недиссоциирующий клон;
- постоянно вести стабилизирующий отбор;
- соблюдать оптимальные условия хранения;
- соблюдать оптимальные для высокопродуктивного диссоцианта условия роста.

Исследования процесса диссоциации имеют прогностическую ценность и дают возможность управлять течением процесса.

По систематическому положению диссоцианты определяются как один вид, так как в определителе учитывается признак по принципу «есть — нет», а диссоциация дает изменения по принципу «больше — меньше».

Контрольные вопросы

1. Какие факторы вызывают мутации и в чем особенности фенотипического проявления мутаций у микроорганизмов?
2. Перечислите типы рекомбинации генетического материала у прокариот.
3. В чем заключается явление диссоциации и какие свойства микроорганизма оно затрагивает?
4. Почему явление диссоциации необходимо учитывать в природных местообитаниях и микробиологических производствах?
5. Каковы пути стабилизации синтеза биологически активных веществ при их промышленном получении?

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методы исследования экологии микроорганизмов

Выделение микроорганизмов из экологических ниш и проблемы, связанные с некультивируемыми формами. По некоторым оценкам, исследователи могут культивировать меньше 0,1 % всего микробного разнообразия. Десятки тысяч видов микроорганизмов, живущих как симбионты животных и растений, нуждаются в выделении и идентификации. Хотя многие из таких микроорганизмов относят к так называемым «некультивируемым» и таким образом остающимся недоступными классическим микробиологическим методам идентификации, существует несколько способов, позволяющих оценить их разнообразие и распространение. Такие методы объединяют прямые микроскопические наблюдения и различные приемы на основе молекулярной диагностики, включая амплификацию диагностирующих последовательностей генома, кодирующих синтез молекулы 16S рРНК для последующей их расшифровки.

Методы прямого прижизненного окрашивания различных проб воды, почвы и осадков позволяют выделять гораздо больше живых клеток, чем высевы на различные среды. Большое расхождение в результатах прямого счета в сравнении с высевом на среды поставило вопрос: прижизненно окрашенные микроорганизмы являются живыми или мертвыми? Применение в качестве прижизненного красителя акридинового оранжевого показало, что часть клеток окрашивается с последующей зеленой флуоресценцией, часть — остается оранжевой. Это привело вначале к неверному выводу о том, что зеленые клетки — живые, а оранжевые — мертвые. Впоследствии было выяснено, что цвет флуоресценции зависит от отношения ДНК/белок в клетке, в результате активно делящиеся клетки выглядят зелеными, а растущие более медленно или покоящиеся клетки дают оранжевую флуоресценцию, оставаясь при этом живыми.

В дальнейшем были разработаны *прямые методы оценки метаболической активности клеток* (клеточное дыхание), позволяющие отличить живые клетки от неживых в природных пробах.

Методы основаны на применении различных солей тетразолия, которые при восстановлении в клетке дегидрогеназами (дыхательная активность) превращаются в нерастворимый формазан красного цвета, что можно обнаружить визуально под микроскопом. Имеется способ различать живые, мертвые и поврежденные клетки при измерении состояния мембранного потенциала с помощью флуорохромов. Другой способ предлагает добавлять к пробам живых клеток ингибитор клеточного деления (налидиксовую кислоту), при этом активно растущие клетки будут удлиняться без вступления в фазу бинарного деления.

Возможно, что многие микроорганизмы, наблюдаемые при прямом микроскопировании как живые, вступили в состояние «некультивируемая форма бактерий (НФБ)». Эта концепция была предложена американским микробиологом профессором Р. Колвелл в 1987 г. Показано, что часть клеток из природных образцов не дает колоний на лабораторных средах, хотя в природе они ведут активный образ жизни и патогенные формы сохраняют свою вирулентность по отношению к животным. Эксперименты четко показали, что такие патогены человека, как *Legionella pneumophila*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae* и *V. vulnificus*, постоянно образуют НФБ в природных эконисах. Таким образом становится понятной важность прямых микроскопических наблюдений природных образцов для обнаружения НФБ патогенов.

Для наблюдения за некультивируемыми формами микроорганизмов в природных образцах применяют *методы молекулярного анализа*. Разработано несколько десятков диагностических проб-последовательностей ДНК/РНК для специфического обнаружения определенных видов, родов, семейств или таксонов более высокого порядка непосредственно в природных образцах.

С использованием таких последовательностей было обнаружено, что морские воды содержат многие виды архей и бактерий, которые не поддаются культивированию в лаборатории.

Олигонуклеотидные пробы длиной 18—20 нуклеотидов являются наиболее подходящими для такой диагностики, так как легко гибридизуются со специфическим участком ДНК искомого организма.

Даже небольшие количества некультивируемых форм могут быть обнаружены в популяциях природных образцов с помощью ПЦР-амплификации диагностических последовательностей ДНК.

Жизнеспособные клетки микроорганизмов можно идентифицировать также с помощью специфических иРНК *методом обратной транскрипции*, но при использовании этого метода следует помнить о том, что время полужизни некоторых бактериальных иРНК может составлять меньше минуты.

Микроэлектроды. Поскольку микробы очень малы, также малы и их микроокружения. Для клетки размером 3 мкм микроокружение на расстоянии 3 мм соответствует расстоянию в 2 км для человека! Экспериментаторы разработали специальные миниатюрные электроды диаметром до 2—3 мкм, которые позволяют проникать в микроокружение клеток в природных эконисах и проводить там измерения градиентов pH, Eh, солености, температуры, содержания кислорода или некоторых химических элементов (Na^+ , K^+ , HS^- , NH_4^+ , N_2O и т.д.). Разработаны также миниатюрные спектрометрические приборы, позволяющие качественно измерять поглощение света в микронисах, что важно при изучении структуры и функционирования циано-бактериальных матов и других микробных сообществ. Микроэлектроды интенсивно применяют при изучении циано-бактериальных сообществ, на поверхности которых развиваются цианобактерии и водоросли, являющиеся основными продуцентами мата, до глубины, на которой свет становится лимитирующим фактором. Прослежено, что на глубине 1,0—1,2 мм такого мата (при его общей толщине около 2 см) окислительный фотосинтез прекращается (и сообщество становится анаэробным). С этого уровня резко возрастает концентрация сероводорода, возникающего в результате активности сульфатредукторов нижних слоев мата (в данном примере рассмотрена структура матов морских местобитаний). Концентрация сероводорода в каждом слое сообщества — результат сбалансированного процесса его выделения сульфатредукторами и его потребления анаэробными фототрофами и тионовыми или бесцветными серными бактериями.

Радиоизотопы. Методы измерения активности микроорганизмов в их природных местообитаниях или свежих образцах с применением радиоизотопов являются наиболее чувствительными из всех существующих. Эти методы могут пролить свет на судьбу того или иного субстрата в микробных сообществах определенной эконисы. Для измерения интенсивности фотосинтеза применяют метод измерения включения меченого $^{14}\text{CO}_2$, имея контролем при этом «темновую» пробу. Для обнаружения и измерения скорости сульфатредукции применяют изотоп серы, $^{35}\text{SO}_4^{2-}$, который превращается в H_2^{35}S . Скорость метаногенеза можно проследить по превращению $^{14}\text{CO}_2$ в $^{14}\text{CH}_4$ в присутствии значительного количества водорода или по трансформации ^{14}C -метанола, метилированных аминов или ацетата в $^{14}\text{CH}_4$. Хемоорганотрофные активности измеряют по скорости включения меченых по ^{14}C органических соединений, обычно для этих целей используют глюкозу или аминокислоты. Эффект использования органики можно определять и

по выделению $^{14}\text{CO}_2$ из меченых по ^{14}C органических субстратов. Во всех случаях, определяя скорости процессов потребления изотопа или его выделения, необходимо учитывать соотношение меченого и немеченого субстрата, внесенного в пробу для расчета специфической активности потребления субстрата или образования продукта.

Эксперименты с радиоактивными изотопами широко применяют в микробной экологии, однако, поскольку в гетерогенных природных местообитаниях всегда могут проходить и химические превращения субстратов, необходимо параллельно проводить опыты с соответствующими контрольными образцами, ключевыми из которых являются пробы с убитыми клетками. Для этой цели часто применяют формальдегид в концентрации 4 % или кипячение пробы.

Стабильные изотопы. Поскольку большинство биогенных элементов имеет изотопы, как стабильные, так и радиоактивные, можно изучить активность микроорганизмов в природных образцах с применением так называемого «изотопного эффекта», суть которого сводится к тому, что живые клетки способны дифференцированно использовать легкие и тяжелые изотопы одного и того же элемента в биологических трансформациях. В микробной экологии наибольшее распространение получили исследования, связанные с трансформацией изотопов углерода и серы. Углерод в природе представлен в основном в виде изотопа ^{12}C , хотя встречается и в виде стабильного тяжелого ^{13}C , а также радиоактивного ^{14}C . Подобно этому, большинство соединений серы состоит в основном из ^{32}S , хотя встречается стабильный ^{34}S и радиоактивный ^{35}S изотопы. Большинство биохимических реакций, проводимых живыми клетками, способно выбирать соединения с более легким изотопом из имеющихся в наличии. Поэтому соединения с более тяжелыми изотопами остаются непрореагировавшими и их относительная доля в оставшемся субстрате увеличивается, а в продукте — уменьшается. Этот феномен получил название «фракционирование изотопов».

При изучении проб различного происхождения оказалось, что наиболее «тяжелыми» по углероду являются морские карбонаты химического происхождения с соотношением $\Delta^{13}\text{C} = \pm 5 \text{ ‰}$. Недавние (геологически) морские осадки имеют $\Delta^{13}\text{C} = -10 \dots -35 \text{ ‰}$, что указывает на участие микроорганизмов в их формировании, биомасса растений имеет дефицит по ^{13}C $12 \dots 25 \text{ ‰}$, нефть — $20 \dots 35 \text{ ‰}$, метан — $25 \dots 80 \text{ ‰}$! Интересно отметить, что скальные породы возраста около 3,5 млрд лет (время появления жизни на Земле) обеднены по ^{13}C на $12 \dots 22 \text{ ‰}$, что свидетельствует об очень раннем возникновении автотрофии на планете.

Подобные измерения, проведенные в отношении изотопов серы, показали, что у метеоритного сульфида $\Delta^{34}\text{S} = -3 \dots +3 \text{ ‰}$,

у залежей элементарной серы — $-18 \dots +18 \text{ ‰}$, а сульфид морских осадков может иметь $\Delta^{34}\text{S}$ до -30 ‰ , что указывает на значительный вклад сульфатредукторов в процесс глобального цикла серы.

Для понимания структуры и функционирования экосистем мало знания о взаимоотношениях микробных сообществ, необходимы также количественные данные о числе микробов того или иного сообщества, биомассы популяций, скоростей биологических активностей, деления клеток и их отмирания, а также скоростей оборота возникающих циклов материи через экосистему. Количество, биомасса и активность — это вполне определенные экологические параметры, которые, хотя и коррелируют между собой, не должны рассматриваться как взаимозаменяемые. Обычно природа решаемой экологической проблемы сама диктует, какой из этих параметров следует измерять, а технические трудности заставляют исследователя измерять число клеток и затем высчитывать более относительный параметр — биомассу. После сделанных подсчетов необходимо с критичностью отнестись к полученным результатам, рассуждая о приемлемости выводов при всех условиях эксперимента. Методы, используемые при таких измерениях, являются основанием для определения микробной экологии как научной дисциплины и общего понимания экологии микробов. Применение количественного подхода более чем что-либо выделяет экологов среди натуралистов.

Сбор образцов

Для исследования числа и активности микробных популяций в различных экосистемах разработаны многочисленные методологические подходы. При изучении микроорганизмов в природных образцах (общее число, число сообществ, их метаболические активности) репрезентативные части образца анализируют и результаты просеивают на сообщество в целом или экосистему. Термин «репрезентативный» означает, что проба должна отражать разнообразие и плотность организмов общего местообитания, из которого взята проба. Во многих местообитаниях распределение микроорганизмов не гомогенное, а скорее кластерное. Поэтому любая взятая проба, несомненно, точечная по отношению к изучаемому местообитанию — пространству, может содержать много и мало микроорганизмов, что приведет к неверной экстраполяции результатов. Это особенно верно для микроорганизмов, которые живут в условиях микроокружения, о чем экспериментатор может во время отбора пробы и не догадываться. Обработка сложных проб, приготовленных из собранных индивидуальных проб с использованием специальных смесителей, может минимизировать ошибку. Уровень достоверности при экстраполяции данных соот-

ветствующих проб на всю эконишу должен быть подкреплён статистическим анализом. Важно помнить, что каждое измерение состоит из трех фаз: 1) сбор образцов; 2) подготовка проб; 3) собственно измерение. При интерпретации результатов должны быть критически рассмотрены все три стадии обработки проб.

При отборе проб из таких сложных и разнообразных местообитаний, как кишечник животных, поверхностный слой почвы, воды озер, глубоководные осадки морей, применяют различные подходы. Невозможность вплотную приблизиться к месту отбора проб заставляет придумывать различные пробоотборники для дистанционного забора проб.

Методы отбора проб и их хранение не должны изменять количества клеток или их активности в большую или меньшую сторону. Исследователь должен быть уверен, что отобранные образцы являются репрезентативными и не загрязнены посторонними микроорганизмами, поэтому способ отбора пробы должен гарантировать наличие в пробе лишь микроорганизмов из нужного местообитания.

Пробы *почвы* отбирают обычно с соблюдением минимума асептики, так как количество микроорганизмов в поверхностных почвенных горизонтах во много раз больше, чем в воздухе или нестерильном (но чистом!) контейнере для образца. Для сбора образцов со значительной глубины отбирают керн, который выверливают вручную или с помощью специальных механизмов, и внутри керна находят нужные зоны, уже работая асептически в лаборатории.

Для отбора проб почвенных микроорганизмов, находящихся в относительно небольшом количестве, применяют «аттрактанты» или «наживки». В некоторых случаях в почву опускают чистые стекла или стекла со специфической агаризованной средой, на которой развиваются нужные микроорганизмы (стекла обрастания по Холодному). Чистые стекла, не обладающие селективными свойствами, используют для подсчета прикрепившихся микроорганизмов в почвах или осадках. В этом случае стекло служит аналогом минеральных частиц почвы (кварц) и отражает микробное разнообразие неселективно.

Еще одним вариантом стекол обрастания является плоскопараллельные капилляры, впервые разработанные Перфильевым. Их также называют *недосконы* при погружении в почву и *иглосконы* — при погружении в донные осадки. Капилляры открыты с обоих концов, и микроорганизмы могут свободно перемещаться внутри них. Часто капилляры заливают средой (аттрактант), селективной для той или иной физиологической группы микроорганизмов. Преимущество плоских капилляров в том, что их содержимое можно рассматривать под микроскопом непосредственно, а плоская стенка сводит к минимуму искажение и преломле-

ние света при прохождении через капилляр. Применение капилляров Перфильева позволяет проводить прижизненные наблюдения за развитием почвенной или осадочной микробиоты, дает возможность вести непрерывные (с помощью автоматической кинокамеры, рассчитанной на определенное количество снимков в час или день) исследования развития микробных популяций, не опасаясь подсыхания препарата, расширяет поле деятельности экспериментатора с внесением разного рода питательных веществ с одного конца капилляра, делая таким образом его проточным. Такие капилляры позволяют следить за развитием анаэробного сообщества без применения сложной техники анаэробного культивирования. Капилляры помогают наблюдать за прижизненным развитием экосистем в природных условиях, не нарушая их целостности, и дают возможность обнаруживать необычные морфологические формы пока некультивируемых микроорганизмов.

Различные методы разработаны для отбора проб *воды*. Проблем с отбором водных образцов обычно бывает больше, чем с почвенными пробами, поскольку практически всегда пробы воды отбирают на значительном удалении от экспериментатора. При этом возникают проблемы в соблюдении стерильности, поскольку открытые водные пространства содержат немного микроорганизмов, и эти пробы легко загрязнить неестественной микробиотой самого прибора для отбора проб. Каждый из разработанных пробоотборников имеет свои преимущества и недостатки. Целью создания часто довольно сложных приспособлений является уверенность, что проба воды действительно отобрана из нужного места, например с глубины 100 м. Среди разработанных образцов водных пробоотборников можно отметить следующие:

- вакуумированные бутылки, которые заполняются водой на определенной глубине с помощью грузика-мессенджера, разбивающего водозасасывающий капилляр;

- стерильный пластиковый пакет, раскрывающийся с помощью пружины на определенной глубине после опускания груза с поверхности, одновременно приводящего в движение пружину и бритву, вскрывающую отверстие в пакете;

- пробоотборник с укрепленными на разной глубине стерильными шприцами, в которые одновременно засасываются пробы воды.

Такие приспособления применяют обычно для отбора проб из неглубоких стратифицированных озер. С глубоководными пробами необходимо предусматривать возможность декомпрессии организмов при подъеме на поверхность. Разработанные пробоотборники позволяют открывать и закрывать входные отверстия на глубине, не позволяя давлению внутри пробы падать при подъеме.

Пробы **осадков** обычно отбирают с поверхности с помощью скребков или ковшей, однако такие способы не позволяют уберечь данные пробы от загрязнения посторонней микробиотой. С соблюдением асептики можно отбирать пробы-керна, которые затем в лаборатории в стерильных условиях делают в вертикальном направлении, что позволяет проследить динамику осадков по горизонтали. Наиболее точно отбирают пробы морских осадков с использованием миниатюрных двух-трехместных подводных лодок, которые погружаются на глубину до 3 км, где с помощью манипуляторов и специальных сверл отбирают пробы осадков в точно локализованном участке (особенно это важно в местах подводных термальных источников или «черных курильщиков»). Использование мини-подлодок позволяет также отбирать пробы, обрабатывать их нужным образом на месте отбора (например, вводить радиоизотопы) и оставлять на месте для инкубации с последующим подъемом на поверхность для анализов.

Отбор проб **воздуха** необходимо проводить с применением аппаратов, которые минимально травмируют живые клетки микроорганизмов, находящиеся обычно в мельчайших капельках аэрозолей. Пассивная седиментация, позволяющая подсчитать количество осевших (и образовавших колонии) клеток микроорганизмов на поверхности открытых чашек Петри с агаризованной средой, пригодна для подсчета количества спор грибов, но не для количественного учета находящихся в воздухе бактерий. Чаще всего пробы воздуха отбирают, пропуская определенный его объем через бактериальные фильтры, размер пор которых можно варьировать для дифференциации микроорганизмов воздуха по размеру. Некоторые приборы (аппарат Кротова) сконструированы таким образом, что они направляют поток засасываемого воздуха при отборе пробы на поверхность открытой чашки Петри с агаризованной средой, на которой, как считают, осаждаются все частицы, взвешенные в воздухе, включая микроорганизмы.

Пробы **биологических образцов** растений или животных включают сбор биологических жидкостей (растительный сок, кровь, моча, лимфа, мокрота), выделений (каловые массы) или проб с поверхности объекта, а также внутренних органов (биопсии). С поверхностей микроорганизмы смывают или счищают стерильным буферным раствором или физраствором (0,85%-й раствор NaCl в дистиллированной воде) с помощью стерильных ватных тампонов. В других случаях микроорганизмы сохраняют непосредственно в образцах тканей, что важно для наблюдения их топографического распределения в тканях или количественного учета. Иногда анализы образцов проводят непосредственно под микроскопом (сканирующая электронная микроскопия) для рассмотрения взаимодействия микробных сообществ или изучения ассоциаций между животными, растениями и микробиотой.

Пробы, содержащие микроорганизмы, очень редко содержат такое их количество, которое можно учесть, не прибегая к концентрированию или разбавлению образца. Концентрированные образцы должны быть разбавлены до нужной плотности микроорганизмов с последующим высевом на питательные среды (подсчет живых клеток). Разведение проб осуществляют обычно в 10-кратных последовательностях с тем, чтобы на поверхность среды в чашке Петри попало 50—200 клеток, образующих колонии. При этом важно подобрать разбавитель, так как показано, что концентрация живых клеток может увеличиваться почти в два раза при высевах почвенных микроорганизмов из одной и той же пробы, если использовать разные солевые растворы для разведений. Разбавленные образцы должны быть сконцентрированы перед посевом. Для этого применяют центрифугирование или фильтрование через мембранные фильтры с заданным размером пор.

Если важно определить число живых микроорганизмов в пробе на момент ее отбора, необходимо учитывать возможность размножения клеток в образце во время хранения или транспортировки (феномен, известный как «эффект бутылки» и особенно важный для обработки проб морской воды, лишенных природных абсорбирующих поверхностей). Когда пробу морской воды помещают в стерильную посуду, питательные вещества воды сорбируются на внутренней поверхности сосуда, повышая локальную концентрацию субстратов, что становится притягательным для микроорганизмов, которые также сорбируются на стенках и вследствие повышенной концентрации субстратов, начинают быстро размножаться. С другой стороны, условия хранения собранных образцов могут привести к гибели части популяции микроорганизмов, что вызовет занижение общего микробного числа.

При разбавлении образцов микроорганизмы должны быть распределены в объеме пробы равномерно. Это сложная задача, особенно при обработке проб почвы или осадков, в которых микроорганизмы имеют тенденцию прикрепляться к частицам, органическим или минеральным. Степень десорбции клеток с частиц в значительной степени зависит от концентрации суспендирующего раствора и его химического состава, времени, температуры и силы перемешивания. Процесс оптимальной десорбции клеток с частиц сильно зависит от состава образца и поэтому требует абсолютной стандартизации методик подготовки проб к посевам.

При концентрировании образцов важное место отводят выбору фильтра, так как фильтры с малыми порами быстро забиваются и не позволяют фильтровать пробы достаточных объемов, а фильтры с большими порами могут пропустить часть клеток. Поликарбонатным фильтрам отдают предпочтение над нитроцеллю-

лозными в силу более плоской поверхности и более унифицированных размеров пор. Химический состав материала фильтра влияет также на выживаемость микроорганизмов.

Несоблюдение при обработке проб условий, требуемых для той или иной физиологической группы микроорганизмов, может существенно изменить результат анализа. Так, обработка проб для выявления строгих анаэробов требует проведения всех разведений в растворах без кислорода и посева проб в бескислородной атмосфере. Для выявления психрофильных микроорганизмов вся стеклянная посуда и жидкости, соприкасающиеся с пробой, должны быть охлаждены для максимального сохранения жизнеспособных клеток психрофилов.

Если пробы не предназначены для определения числа живых и мертвых клеток, то их обычно фиксируют с помощью формальдегида или глутарового альдегида непосредственно после отбора. Такие препараты сразу готовы для прямого микроскопирования.

При сборе вирусных частиц из природных проб необходимо применять специальные методы их концентрирования. Вирусы можно сконцентрировать из водных образцов при неоднократной адсорбции/элюции подкисленных проб при пропускании их через эпоксидные, фибerglassовые или нитроцеллюлозные фильтры. Сорбированные частицы затем элюируют щелочными растворами. Процедуру можно неоднократно повторять, тысячекратно концентрируя вирусные частицы, например из морской воды или проб осадков.

Фенотипическое обнаружение микроорганизмов

При чашечном методе посева природных образцов можно достичь двух результатов: получить отдельные колонии чистых культур микроорганизмов (клонов одной клетки) и начать фенотипическое определение различных организмов (описание колоний). В некоторых случаях клетки из отдельно взятой колонии могут быть введены в пластинки для анализа (API-тест, Biolog), по результатам которого возможно определение микроорганизма до рода.

Выделение и идентификация членов микробного сообщества с использованием метода прямого рассева на чашки эффективно при высокой концентрации клеток того или иного члена сообщества. Если же относительное количество клеток искомого вида невелико, они могут «потеряться» при таком методе обработки пробы, и в этом случае метод прямого рассева на чашки с разведениями пробы непригоден для анализа.

Поскольку разные члены идентифицируемого микробного сообщества могут предъявлять различные требования к компонен-

там среды (состав и содержание солей, органического субстрата), а также к физическим условиям выращивания (температура, влажность, содержание кислорода и т.д.), для более полного выявления членов сообщества применяют параллельные посевы на среды различного состава (например, для выявления копитрофов и олиготрофов, органотрофов и литотрофов, азотфиксаторов, броуидильщиков и т.д.). Существуют приемы добавления в среды специфических ингибиторов для подавления развития той или иной группы микроорганизмов (например, актидион подавляет развитие эукариот на чашке с прокариотами).

Обнаружение микроорганизмов химическими методами

Анализ микроорганизмов по их липидному составу. Липиды — обязательные компоненты мембран, окружающих цитоплазму каждой микробной клетки. Липидный состав различных микроорганизмов в значительной степени отличается друг от друга. Существуют шесть (или даже больше) классов липидов, обнаруженных у микроорганизмов, каждый из которых состоит из индивидуальных липидов с шестью или более структурными особенностями. Каждый микроорганизм имеет свой липидный профиль (основной липид), и это свойство было положено в основу химической идентификации микроорганизмов, основанной на составе и содержании липидов в клетке. Следует отметить, что данный метод не идеален, поскольку любые микроорганизмы могут существенно менять профиль липидов в зависимости от возраста культуры и условий культивирования клеток.

Анализ, основанный на изучении и сравнении метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК), входящих в состав липидов, получил широкое распространение вследствие его простоты и доступности. Полный процесс идентификации включает эстерификацию липидов, метилирование входящих в их состав жирных кислот, их разделение на хроматографических колонках и количественное определение с помощью газовой хроматографии или высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Специальным образом обработанные колонки дают хорошее разрешение МЭЖК, что позволяет сравнивать их время удерживания с ранее идентифицированными липидными профилями (стандарты). Количество каждой жирной кислоты может быть рассчитано по площади хроматографического пика, а абсолютные концентрации определяют, вводя внутренний стандарт.

Анализ МЭЖК, экстрагированных из почвенных образцов, позволяет быстро и относительно недорого идентифицировать состав популяции почвенных микроорганизмов. Интерпретация

результатов в некоторых случаях затруднена из-за идентичности многих липидов у различных представителей изучаемого микробного сообщества.

Обнаружение отдельных генов и геномных последовательностей

С обнаружением отдельных генов или специфических геномных последовательностей связаны прежде всего возможности анализа микробных сообществ без выделения и идентификации отдельных его членов в чистых культурах. Методы основаны на экстракции из почвенных, осадочных или водных образцов тотальной ДНК, ее очистки и анализа с помощью градиентных гель-электрофорезов — термического и денатурирующего (TGGE/DGGE). Основной трудностью при экстракции тотальной ДНК является ее отделение и очистка от гуминовых веществ почвы. Однако методы, позволяющие проводить такую очистку, постоянно совершенствуются.

После экстракции ДНК подвергают иммобилизации на нитроцеллюлозном или нейлоновом фильтре, расплавлению и гибридизации с известными последовательностями генов, ответственными за синтез тех или иных специфических ферментов. Так, наличие в пробе тотальной ДНК генов, гибридизуемых с геном, кодирующим нитрогеназу, указывает на присутствие в анализируемом сообществе азотфиксаторов, генов метанмонооксигеназы — метанотрофов, генов РубисКО — автотрофных микроорганизмов, фиксирующих углекислоту через цикл Кальвина. Расшифровано уже несколько десятков генов, кодирующих ключевые реакции тех или иных процессов, и, применяя метод гибридизации, можно делать выводы о наличии определенных микроорганизмов в анализируемой пробе.

Метод ПЦР позволяет идентифицировать неизвестные микроорганизмы, находящиеся в природной пробе, без выделения чистых культур. Разработаны «универсальные» праймеры на бактерии, археи и эукариоты, которые дают возможность специфически амплифицировать последовательности этих трех групп микроорганизмов, разделить их с помощью TGGE/DGGE-методов и затем, после вторичной амплификации отдельных полос, получить почти полный профиль микробного сообщества с идентификацией отдельных филогенетических линий и классификацией микроорганизмов на основе последовательностей 16S рРНК.

Для идентификации нужных микроорганизмов в сообществе используют гены-репортеры, которые легко обнаружить после проведения химических реакций (*lacZ*-ген, кодирующий β-галактозидазу, и *hlyE*-ген, кодирующий синтез ферментов метаболиз-

ма толуола) или после экспрессии в клетке испусканием света различной длины волны (*lux*-гены или GFP-гены, кодирующие синтез зеленого флуоресцирующего белка). Гены-репортеры используют обычно для обнаружения тех или иных активностей в природных образцах при определении выживаемости введенных в образец микроорганизмов, для обнаружения экспрессии и изучения активности нужного гена/фермента, под контролем промотора которого экспрессируется и ген-репортер. Генетическая конструкция в таком случае выглядит и работает следующим образом. Если нужный ген экспрессируется и фермент осуществляет свою функцию (например, расщепляет тот или иной ксенобиотик), то по люминесценции гена-репортера об этом можно судить на удалении (например, в толще почвы свет от места реакции трансммитируется в таком случае с использованием оптоволоконных световодов). По тушению люминесценции в генно-инженерных штаммах *E.coli* судят о степени токсичности пробы воды или почвы.

Определение численности микроорганизмов

При работе с чистыми культурами определение количества микроорганизмов не вызывает сложностей. Другое дело, когда надо определить число микроорганизмов в природных образцах, поскольку микроорганизмы в них чрезвычайно разнообразны. Методы, применяемые для подсчета вирусов, бактерий, грибов, водорослей и простейших, различны. Специальную технику применяют для подсчета психрофилов и строго анаэробных форм.

Существует два метода подсчета микроорганизмов: 1) прямой счет клеток под микроскопом и 2) непрямой подсчет после подрашивания на твердых средах (учет живых клеток). Чаще используют первый метод, при этом обычно не различая живые и мертвые клетки (по Виноградскому). Метод можно модифицировать с применением эпифлуоресцентного микроскопа и флуоресцирующих дифференциальных красителей для подсчета живых и мертвых клеток в препарате. Клетки микроорганизмов можно подсчитывать также в определенном объеме жидкой пробы под световым микроскопом (камеры Тома—Горяева, Петрова—Хаузера).

Иногда для определения скорости роста клеток применяют метод подсчета делящихся клеток, причем было показано, что этот метод коррелирует со скоростью синтеза РНК, измеренной по включению меченого аденина.

Число специфических клеток микроорганизмов в природных образцах может быть установлено с помощью применения техники флуоресцирующих антител. Но для этого необходима предварительная подготовка, включающая выделение чистых культур ис-

комых видов и наработку специфических антител к таким клеткам. Этот метод позволяет следить за развитием индивидуальных микроорганизмов в их естественных местах обитания (аутоэкология). Антитела являются чрезвычайно специфичными по отношению к выбранному виду, что в целом делает этот метод поразительно точным инструментом исследования. Модификациями метода являются применение специфичных флуоресцирующих антител, выработанных по отношению к определенным ферментам, а также использование флуоресцирующих генетических проб (генных зондов), позволяющих идентифицировать микроорганизмы с одинаковыми генами в популяции. В одной и той же популяции можно обнаружить различные гены, имея генетические зонды, флуоресцирующие разным цветом.

При учете *живых* микроорганизмов после подрашивания применяют в основном два метода: 1) подсчет на чашках выросших колоний после соответствующих разведений и 2) учет по методу предельных разведений. Оба метода требуют разделения микроорганизмов перед посевом на индивидуальные клетки, которые затем дают потомство. Применение методов подсчета с посевами требует бережного обращения с пробами для сохранения жизнеспособных клеток. Следует учитывать, что для подсчета микроорганизмов различных групп необходимо применять разные среды, которых разработано более тысячи для выявления бактерий, архей, грибов, водорослей, простейших, как аэробов, так и анаэробов.

Для выявления отдельных групп микроорганизмов применяют селективные и диагностические среды, среды с антибиотиками, специфически подавляющими развитие отдельных групп микробов.

Модификацией метода служит *гибридизация колоний*, при которой из тысяч колоний, выросших на чашке, можно выявить одну, специфически гибридизирующуюся с выбранным геном-маркером. Метод позволяет подсчитать число микроорганизмов нужного вида или с необходимой функцией (в зависимости от примененного гена для гибридизации) среди большого количества сопутствующей микробиоты из природных проб.

Определение микробной биомассы

Измерение биомассы применяют для подсчета *урожа* микроорганизмов, понимая под биомассой сухую массу живого материала, выраженную в единицах массы (г/л). Измерение биомассы природных проб часто не приводит к точным результатам вследствие большого количества побочных эффектов, связанных с отбором проб и их измерением. Поэтому наиболее приемлемыми методами

определения биомассы в природных образцах являются методы, связанные с определением биохимических параметров клеток. Для таких измерений предполагают, что количество измеряемого компонента клеток одинаково для всех видов клеток, что, конечно же, идеализировано. Поэтому измерения биохимических параметров биомассы необходимо экстраполировать с осторожностью.

Наиболее популярным методом измерения биомассы является измерение *содержания АТФ* и общего содержания адениновых нуклеотидов с последующим пересчетом на содержание углерода клетки или массы сухого вещества. Метод позволяет быстро и точно (с люциферин/люциферазной пробой) измерить содержание АТФ в образце, причем количество АТФ строго соответствует биомассе живых клеток, так как после отмирания клетки пул АТФ в ней резко снижается или исчезает вовсе. Общий пул аденилатов ($A_T = \text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}$) не зависит от метаболического состояния клетки и более полно соответствует содержанию биомассы в анализируемой пробе.

Другим методом является измерение *содержания компонентов клеточных стенок* (например, ацетилмурамовой кислоты (МК) или липополисахаридов). При оценке содержания мурамовой кислоты ее гидролизуют для высвобождения лактата, который определяют энзиматически. Установлено, что все грамположительные бактерии содержат 44 мкг МК/мг С клетки, тогда как для грамотрицательных клеток это соотношение равно 12 мкг/мг. Для оценки содержания *грибной* биомассы используют определение концентрации хитина, но на точность метода влияет количество почвенных членистоногих и насекомых.

При отсутствии в пробе растений можно определять биомассу фототрофных водорослей и бактерий, измеряя *количество хлорофилла*. По концентрации хлорофилла *a* судят о содержании биомассы водорослей и цианобактерий после экстракции пробы хлороформ/метанольной смесью с последующим измерением поглощения при 665 нм. Поглощение того же экстракта, измеренное при 850 нм, будет отражать количество всех бактериохлорофиллов, таким образом оценивают количество пурпурных фототрофных бактерий. Содержание различных хлорофиллов можно измерять и по спектрам флуоресценции.

Концентрация ДНК в клетках микроорганизмов довольно постоянна, поэтому ее определение также может способствовать измерению биомассы. В природных образцах, где чувствительность метода определения ДНК имеет первостепенное значение, применяют пробы с флуоресцентными красками, такими, как этидиум бромид или Hoechst 33258 с использованием спектрофлуориметрии. Перед измерением необходимо провести тщательную очистку тотальной ДНК, а также контроль на наличие эукариотической ДНК.

Белок определять легко, а бактериальные гемопротеины имеют характерную хемилюминесценцию. При определении белка следует убедиться, что фоновые концентрации белков незначительны. Поскольку различные микроорганизмы содержат разные количества белка, определение этого компонента биомассы целесообразно проводить в ситуациях, когда в пробе присутствует один вид микробов.

Наличие **липидов** служит хорошим маркером для определения биомассы, поскольку все клетки окружены мембранами, содержащими липиды. Количество эргостерола в пробе отражает содержание грибов, поскольку его практически не содержат ни растения, ни археи с бактериями. Определение концентрации и состава метиловых эфиров жирных кислот фосфолипидов позволяет наряду с оценкой общей биомассы найти концентрацию той или иной группы микроорганизмов в образце, взятом из природных ниш.

Физиологические методы определения биомассы основаны на измерении дыхания пробы после добавления субстрата или на измерении количества CO_2 , выделившегося в результате разложения микробной биомассы после стерилизации пробы при добавлении хлороформа. Оба метода требуют проведения многочисленных проверок.

Количественная оценка метаболизма микроорганизмов

Последние достижения в аналитической методологии позволяют измерять метаболическую активность микроорганизмов в их природных экологических нишах, однако при постановке опытов следует учитывать возможные возмущения микроокружения клеток при введении измеряющих объектов. Так, простое ограничение микронизи стенками может вызвать пристеночный эффект, а отбор проб из ограниченного пространства — нарушить газовый баланс (содержание кислорода). Все это приводит к снижению точности и воспроизводимости результатов измерений.

Определение *гетеротрофного потенциала* данной экониши ведут при изучении включения радиоактивной метки (обычно ^{14}C) из введенных в образец меченых гетеротрофных субстратов. Этот подход предполагает, что субстрат из среды потребляется, подчиняясь кинетике реакций первого порядка, и что скорость поглощения растёт с увеличением концентрации субстрата до достижения максимальной ($V_{\max}$). Это значение можно подсчитать, пользуясь уравнением Михаэлиса — Ментен и построив график зависимости скорости поглощения субстрата от его концентрации в коор-

динатах Лайнуивера — Берка. Нахождение скоростей активности микроорганизмов этим методом ограничено набором субстратов, используемым данным сообществом. Обычно при определении гетеротрофного потенциала местообитания используют ацетат, глюкозу и другие углеводы, глутамат и другие аминокислоты или смесь меченых продуктов фотосинтеза, образуемых после инкубации водорослей на свету с $^{14}\text{CO}_2$.

При оценке метаболических активностей популяций определяют также *процент дыхания*, подсчитываемый как отношение суммы включенного ^{14}C и выделившегося $^{14}\text{CO}_2$ к выделившемуся $^{14}\text{CO}_2$, выраженное в процентах. Процент дыхания — показатель количества энергии, затрачиваемой популяцией на поддержание устойчивости системы, причем чем выше процент дыхания, тем больше метаболической энергии тратится на поддержание жизнеспособности.

Измерение *скорости микробной продукции* обычно проводят с использованием меченого тритием тимидина ($[^3\text{H}]\text{-Тд}$), который включается непосредственно в ДНК при биосинтезе и отражает скорость роста микроорганизмов в популяции или прироста биомассы. Поскольку $[^3\text{H}]\text{-Тд}$ включается лишь в бактериальную ДНК, этот метод оказался чрезвычайно удобным для анализа скоростей роста водных бактериальных популяций. Применение этого метода в почве связано с некоторыми экспериментальными трудностями. $[^3\text{H}]\text{-Тд}$ сорбируется гуминовыми веществами, находящимися в почве в больших количествах, а также на минеральных веществах глинистых соединений и некоторых оксидов, а почвенную ДНК трудно экстрагировать.

Скорость фотосинтеза измеряют обычно в водных образцах в светлых и темных склянках с введенной порцией $^{14}\text{CO}_2$. Образцы инкубируют в течение нескольких часов или всего светового периода *in situ* и определяют скорость включения меченой углекислоты (обычно в течение первых 1—2 ч инкубации), что отражает скорость фотосинтеза, и общее включенное количество $^{14}\text{CO}_2$ (за более длительный период), что соответствует чистой продукции фотосинтеза (т.е. разнице между количеством включенного $^{14}\text{CO}_2$ и количеством органического вещества, минерализованного до $^{14}\text{CO}_2$ в результате дыхания).

Скорость дыхания определяют, измеряя скорости выделения $^{14}\text{CO}_2$ из органических субстратов, что отражает скорость минерализации органического вещества данной экологической ниши. Существуют также методы нерадиоактивного определения метаболической активности, при которых измеряют скорость дыхания пробы, взятой из данного места, с помощью закрытого кислородного электрода типа Кларка или измерения образования CO_2 в постоянно аэрируемой пробе, куда внесен субстрат дыхания. Для длительных экспериментов по улавливанию образующейся CO_2

разработаны герметичные колбы с двумя сообщающимися отсеками, в одном из которых происходит химическое потребление образуемой CO_2 концентрированным раствором щелочи, а в другую помещают исследуемый образец.

Определение *активности специфических ферментов* также отражает метаболический потенциал микробной популяции данной экологической ниши. Одна часть таких активностей отражает энзиматический потенциал всего сообщества (активности суммарных дегидрогеназ, эстераз, фосфатаз), другая (целлюлазная, хитиназная, нитрогеназная, денитрифицирующая) — только специфической части сообщества, позволяя, однако, оценить тот или иной его потенциал. Ферменты микроорганизмов, включенных в биогеохимический цикл элементов, важны для изучения микробными экологами. Особенно важны ферменты, вовлеченные в цикл углерода и азота, так как они позволяют оценить устойчивость сообществ и экосистем и их потенциал в отношении минерализации органического вещества. При определении ферментативного потенциала популяций, наряду с перечисленным, измеряют активности липаз, целлюлаз, протеаз, амилаз. При измерении ферментативных активностей *in situ* важно не нарушать микроокружение данной ниши и следить за температурой, pH, влажностью, Eh, а периоды инкубации (измерений) должны быть достаточно короткими, чтобы за это время количество микроорганизмов не могло значительно измениться.

Генетически модифицированные микроорганизмы (ГЕМОМ) и их интродукция в природные ценозы

Проблемы, возникающие при неконтролируемом внесении ГЕМОМ в окружающую среду, вызвали широкие дебаты в научном сообществе с привлечением правительственных структур и общественности. Периодически они возникают вновь после появления сообщений о каком-либо достижении генной инженерии или новых успехах в клонировании животных и человека. Значительное место в этих спорах отводится ответу на вопрос: как долго ГЕМОМ и их ДНК будут существовать в окружающей природе и смогут ли модифицированные гены от ГЕМОМ быть переданы аборигенным микроорганизмам? Первоначальные эксперименты показали, что ГЕМОМ быстро отмирают при внесении в природные ценозы, поскольку не способны конкурировать с существующими сообществами микроорганизмов. Предполагалось, что чужеродная ДНК, внесенная в ГЕМОМ, снижает конкурентоспособность живых клеток по сравнению с неизмененными клетками

вследствие больших энергетических затрат на репликацию ДНК. Это предположение было подтверждено при изучении выживания в почве ГЕМОМ *Pseudomonas* sp. с введенной плазмидой, несущей гены расщепления мощного гербицида, 2,4,5-трихлорфеноксиацетата. Клетки ГЕМОМ-псевдомонад быстро исчезали из почвенного образца и через несколько дней не обнаруживались при прямых посевах на среды. Однако спустя несколько недель ГЕМОМ-псевдомонады вновь можно было обнаружить в образце, что свидетельствует о том, что они полностью не вымирали. Результаты этих и последующих экспериментов показали, что модифицированные псевдомонады могут жить в почве в течение длительного времени. Другие наблюдения доказали существование ГЕМОМ в почвенных и водных экосистемах в состоянии НФБ.

Предполагается, что ДНК мертвых клеток ГЕМОМ при попадании в любой биоценоз быстро подвергнется гидролизу ДНК-азами почвы или водных экосистем. Поэтому даже если ГЕМОМ выживут, то они не смогут легко передать ДНК при трансформации другим клеткам. Специальные исследования, однако, показали, что ДНК, адсорбированная на частицах почвенной глины, устойчива к действию ДНКаз и может существовать в таком «иммобилизованном» виде достаточно долго, а затем быть вовлечена в процесс трансформации. Гены в почвенных и водных экосистемах могут быть также перенесены в результате трансдукции. Приведем пример, подтверждающий это. Через год после введения в водную экосистему специфического штамма *Pseudomonas* sp. B13 в системе обнаружили виды, расщепляющие 3-хлорбензол (3-ХБ), которые никогда не выделялись из этой экосистемы до введения туда штамма B13. Более того, в геноме нового изолята обнаружены последовательности, принадлежащие штамму B13, после чего было высказано предположение о том, что новый штамм возник в результате обмена частью генома между аборигенной бактерией и внесенным штаммом B13, не способным утилизировать 3-ХБ. Таким образом, перенос генного материала в природных нишах возможен в течение значительного времени после введения чужеродных генов, и следствием этого может быть изменение пула генов микробиоты данной экосистемы, что отразится на биоразнообразии и стабильности данного сообщества.

Современные методы позволяют амплифицировать участок ДНК из клеток одной колонии с применением пары универсальных праймеров и определить последовательность переменного участка генома, кодирующего ген 16S рРНК. Этого бывает достаточно, чтобы, сравнивая с известными последовательностями из геномного банка, идентифицировать микроорганизм до рода или даже вида.

Роль микроорганизмов в природных местообитаниях

Микроорганизмы как часть экосистемы. В природных условиях микроорганизмы никогда не существуют в виде чистых культур. Лабораторные штаммы — это скорее «одомашненные» формы, существующие в искусственных условиях «зоопарка». В диком виде микроорганизмы растут в смешанных культурах, являясь при этом еще и частью более крупного сообщества, включающего организмы других систематических групп. Итак, микроорганизмы — это существенная часть каждой экосистемы. *Экосистемой* называется совокупность организмов и их физического и химического окружения, функционирующая как экологическая единица. Любая экосистема содержит микроорганизмы, выполняющие две основные функции: 1) синтез нового органического вещества из CO_2 и других неорганических соединений в процессе первичной продукции и 2) разрушение этого аккумулированного органического материала. В настоящее время признано, что микроорганизмы — это преобладающий живой материал Земли. Экологическая роль микроорганизмов состоит в том, что они могут функционировать на всех уровнях экосистемы: фиксировать углерод как первичные продуценты, используя энергию света и химических связей; являться главными редуцентами органического вещества; быть первичными консументами, как некоторые простейшие, использующие бактерии и грибы в пищу. Если в наземных местообитаниях первичными продуцентами обычно являются высшие растения, то в пресных и морских водоемах — это в основном цианобактерии и водоросли. Здесь источником энергии служит свет. Однако в местообитаниях, куда свет не доходит (например, глубины океанов), первичная продукция может быть основана на хемолитоавтотрофии (жизнь вокруг «черных курильщиков»). Основные первичные продуценты здесь являются представителями родов *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiothrix*, *Beggiatoa*.

Функции микроорганизмов в природе. Микроорганизмы являются источником пищи для многих других организмов, так как микробная клетка содержит в среднем, % по массе: углерода — 50, азота — 14 и фосфора — 3 и другие элементы.

Основными функциями микроорганизмов в природных местообитаниях являются следующие:

- минерализация, т.е. разрушение, органических субстратов до CO_2 , NH_3 , H_2 , CH_4 , H_2O ;
- поставка питательных веществ (в виде метаболитов, полисахаридов) для других хемогетеротрофных микроорганизмов;
- обеспечение питания для простейших, нематод, почвенных насекомых, т.е. участие в пищевых цепях;

■ модификация сложных соединений, становящихся доступными для других организмов;

■ перевод соединений в растворимую или газообразную форму. Это происходит либо непосредственно на метаболических путях, либо опосредованно, за счет изменений химических и физических факторов среды под воздействием микроорганизмов (например, выделение большого количества кислот);

■ выделение соединений, подавляющих активность других микроорганизмов или ограничивающих выживание и функционирование растений и животных (например, бактериоцинов, антибиотиков, токсинов).

Микроорганизмы существуют в природе как в виде *популяций* организмов одного типа, образуя микроколонию, растущие в локализованном сайте, так и в виде *сообществ*, где различные типы популяций взаимодействуют между собой.

Микробные местообитания. Места обитания микроорганизмов имеют сложный и постоянно меняющийся характер и зависят от *градиентов* питательных веществ, токсических соединений и лимитирующих факторов (температура, pH, свет, активность воды и т.д.). Поэтому *экологических ниш* для микроорганизмов бесконечное множество, но именно сочетание вышеперечисленных факторов определяет экологическую нишу для конкретного микроорганизма. Ее называют также *первичной экологической нишей*. Для точной характеристики местообитания микроорганизма нужно учитывать его *микроразнообразие*. Многие специализированные группы микроорганизмов существуют в таких условиях микроразнообразия, что испытывают минимальную конкуренцию со стороны других микроорганизмов. Например, *Helicobacter pylori*, обитающий в желудочно-кишечном тракте человека и вызывающий образование язв желудка, кишечника, мочевой системы, для защиты от желудочного сока образует большое количество уреазы, которая разлагает мочевину и образует аммоний. «Уходить» от действия иммунной системы ему помогают липополисахариды, обладающие вариативностью и «молекулярной мимикрией».

Примером того, что даже в малом местообитании могут быть разные зоны, служит рис. 160, показывающий распределение кислорода в комочке хорошо аэрируемой почвы. Комочек почвы диаметром 12 мм содержит зону полного анаэробизма диаметром около 6 мм. В этом анаэробном местообитании уже могут существовать анаэробные

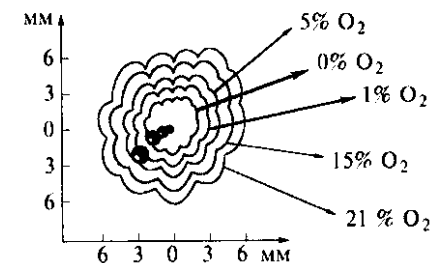


Рис. 160. Распределение кислорода в комочке хорошо аэрируемой почвы

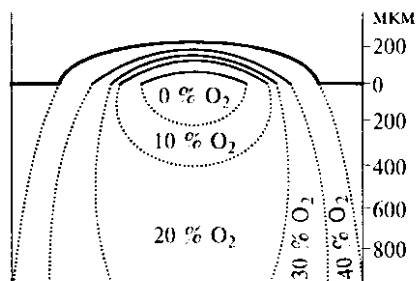


Рис. 161. Поперечный разрез колонии *Bacillus cereus*, растущей на поверхности аэробного питательного агара. Цифры (в %), показывающие концентрацию кислорода в разных частях колонии и в толще агара под колонией, измерены с помощью кислородного микроэлектрода

микроорганизмы. Даже рост отдельных клеток в колонии обусловлен их разным положением по отношению к различным факторам (рис. 161). Например, внутри и непосредственно под колонией формируется анаэробная зона, даже когда колонии *Bacillus cereus* растут на поверхности питательного агара в аэробных условиях.

Микроорганизмы предпочитают расти в прикрепленном состоянии, так как на границе раздела фаз концентрация веществ обычно выше из-за их адсорбции. На этом основан метод использования *стекол обрастания* по Холодному: предметные стекла покрывают слоем питательного агара и помещают в почву, а затем количественно наблюдают за развитием микроорганизмов. По тем же причинам микроорганизмы часто образуют *биопленки*.

Взаимодействия микроорганизмов с другими организмами

Взаимоотношения микроорганизмов друг с другом. Следует отметить, что в природе микроорганизмы, как правило, находятся не в оптимальных условиях (*ресурсы* поступают медленно) и растут приблизительно на 1 % от своих возможностей. С другой стороны, микроорганизмы взаимодействуют между собой. В некоторых случаях складываются *конкурентные взаимоотношения*, и тогда микроорганизмы способны вырабатывать вещества для подавления конкурентной микробиоты (особенно в почвах) — антибиотики, токсины или менее специфичные и неспецифичные вещества (спирты, кислоты, щелочи и т. д.). Реже в природе встречаются *отношения кооперации* между микроорганизмами. Обычно большинство аэробных микроорганизмов могут расщеплять субстрат самостоятельно. *Факультативная кооперация* может возникать в случае накопления какого-нибудь продукта. В анаэробных условиях кооперация более *облигатна*. В таком сообществе микроорганизмов возникают прочные *трофические связи* и часто субстрат может быть расщеплен до простых веществ именно группой микроорганизмов, а не отдельными ее членами, которые в виде чистых культур

этот субстрат вообще не могут использовать из-за энергетических барьеров. Пример тесных связей — анаэробное сообщество, разлагающее полимерные молекулы (рис. 162), в частности, *микробиота рубца*. Полимеры расщепляются внеклеточными ферментами бродильщиков I стадии (очень часто это клостридии). На II стадии бродильщики — облигатные восстановители H^+ — обычно проводят эндэргонические реакции, используя жирные кислоты с более чем двумя атомами углерода и спирты с больше чем одним атомом углерода, с образованием ацетата и H_2 . Такие реакции требуют обязательно отвода H_2 . При метаногенном расщеплении эту операцию осуществляют метаногены. Расщепление идет в три стадии (см. рис. 162). При сульфатзависимом расщеплении полимеров схема действует как двухстадийная — бродильщики + сульфидогены.

При вбросе большого количества органического вещества в анаэробную метаногенную систему вследствие быстрого образования кислот pH снижается до 6,0 и менее и метаногены «выключаются». Происходит разбалансировка системы, что приводит к ацидозу у жвачных животных.

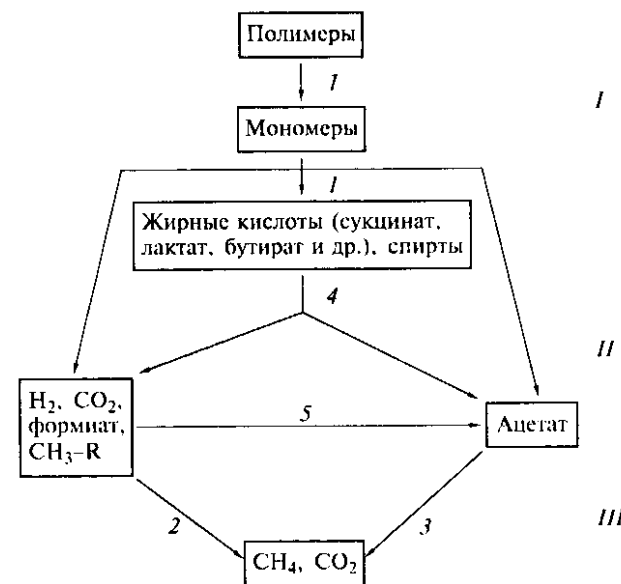
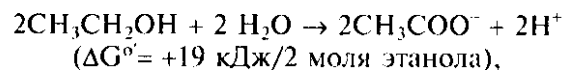


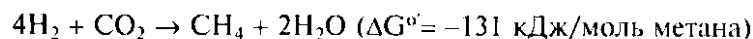
Рис. 162. Анаэробная трофическая цепь разложения полимерных соединений (I — III — стадии процесса). Группы микроорганизмов, участвующие в процессе:

I — первичные анаэробы (бродильщики); 2 — водородиспользующие метаногены; 3 — ацетокластические метаногены; 4 — вторичные анаэробы (синтрофные микроорганизмы); 5 — гомоацетогены

Таким образом, для нормального функционирования анаэробной пищевой цепи необходим *межвидовой перенос водорода* (иногда формата, ацетата) от микроорганизма к микроорганизму. Выделенный при брожении H_2 могут удалять метаногены, ацетогены, сульфат- и серуредукторы. При таких условиях возникает *синтрофия* — полная взаимозависимость микроорганизмов друг от друга в пищевых потребностях. Примером синтрофии может служить вначале выделенный как один микроорганизм «*Methanobacillus omelanskii*», впоследствии оказавшийся синтрофной ассоциацией трудноразделяемых микроорганизмов *S* и *M.o.H.* Партнер *S* осуществляет реакцию:



организм *M.o.H.* потребляет молекулярный водород:



Первая реакция идет только при эффективном удалении водорода. В настоящее время определены микроорганизмы-участники таких ассоциаций: первую реакцию способны осуществлять бактерии из рода *Pelobacter*, вторую — гидрогенотрофные метаногены родов *Methanospirillum*, *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*. Другой пример такой ассоциации: *Acetobacterium woodii* + *Methanosarcina barkeri*. Первый организм превращает фруктозу в ацетат, а метаноген осуществляет ацетокластический метаногенез. Синтрофной может быть ассоциация двух микроорганизмов, где реакцию Стикленда проводят два партнера.

Ассоциации микроорганизмов, оформленные структурно, называются *консорциумами* (например, гранулы анаэробного ила, где присутствуют все микроорганизмы, ответственные за каждую стадию деградации сложных соединений).

Если отношения зависимости между организмами обусловлены не только пищевыми связями, то говорят о *симбиозе*. Симбиозы различаются по входящим в них компонентам (микро- + микро-, микро- + макро-, макро- + макро-), по расположению компонентов относительно друг друга (экзо- и эндосимбиоз), по характеру взаимоотношений в нем (взаимовыгодный — *мутуализм*, подавляющий или убивающий одного из партнеров — *паразитизм*, безразличный — *нейтрализм*). Следует заметить, что и в отечественной, и в зарубежной литературе встречаются довольно существенные различия в терминах, поэтому важно точно определять, что под этим термином понимается. Характер симбиоза относителен. При смене условий он может меняться. Например, *нормальная микробиота* человека — это мутуалистический симбиоз, но если иммунный статус человека понижается, то некоторые микроорганизмы как ЖКТ, так и кожных покровов могут становиться па-

тогенными (так называемые *оппортунисты*). Симбиоз может быть *облигатным*, когда один партнер, обычно эндосимбионт, не может существовать без другого (риккетсии — облигатные паразиты животных клеток или бактерии, вызывающие болезни сосудистых растений). Пример *факультативного симбиоза* — клубеньковые бактерии, которые могут прекрасно существовать и без растения. Назначение мутуалистического симбиоза — защита от внешних воздействий, получение тех или иных питательных компонентов, преимущества в узнавании половых партнеров и в размножении. Таким образом, в этом случае взаимоотношения основаны на взаимном улучшении обстановки друг для друга. Например, в «чайном грибе» дрожжи сбраживают сахар в спирт и углекислоту, а уксуснокислые бактерии окисляют спирт в ацетат. В кефирных зернах дрожжи помимо сбраживания сахаров синтезируют еще и комплекс витаминов, необходимый для развития молочнокислых бактерий, сбраживающих лактозу в лактат. Ассоциации фототрофных микроорганизмов друг с другом и с сульфидогенами основаны на циклическом использовании соединений серы.

Еще один тип симбиоза — *комменсализм*, когда один организм получает от партнерства выгоду, а второму ассоциация безразлична. Это, например, ассоциация аэробных и анаэробных микроорганизмов, где аэробы, потребляя кислород, обеспечивают условия для развития анаэробов, а сами при этом выгоды не получают. Гнилостные бактерии образуют аммиак, используемый нитрифицирующими бактериями. В этом случае имеет значение поддержание постоянного pH. Такие связи иногда называют *метабиотическими*. Связь микроорганизмов, осуществляющих две фазы нитрификации, основана на том, что вторая культура превращает токсичную азотистую кислоту в менее токсичную азотную.

Ранес упоминался ряд примеров симбиозов между микро- и макроорганизмами (клубеньки, цианобактерии + *Azolla*, рубец жвачных, нормальная микробиота кишечника человека и животных). Как *экзосимбиоз* можно рассматривать ризосферу, т.е. пространство почвы вокруг корней, где количество микроорганизмов значительно выше, чем в остальной почве. *Микоризу* (и *актиноризу*), т.е. симбиоз между корнями растений и мицелием грибов (или актиномицетов), уже можно рассматривать как частичный эндосимбиоз, так как мицелий проникает внутрь корней, образуя такой симбиоз.

Мутуалистические взаимодействия микроорганизмов с животными. Некоторые простейшие содержат в клетках в качестве эндосимбионтов цианобактерии и зеленые или золотистые одноклеточные водоросли. На рис. 163 приведен пример эндо- и экзосимбиоза простейшего с метаногенами. При этом реснитчатые простейшие *Trimyema compressum*, *Metopus striatus*, *Pelagiofila nasuta* и *P. frontata* содержат в качестве эндосимбионтов *Methanobacterium*

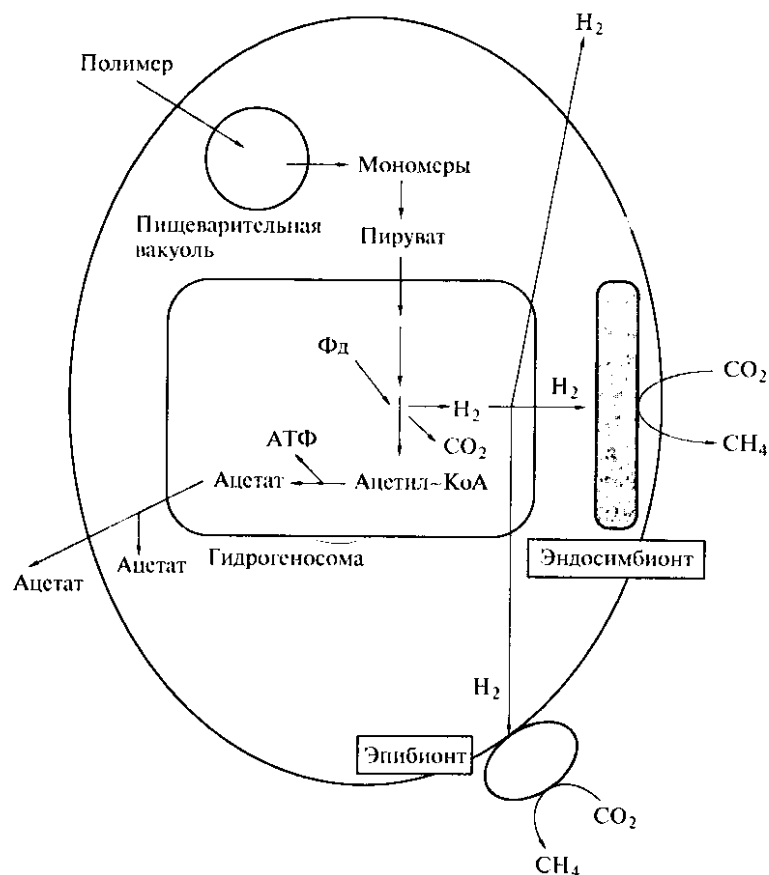


Рис. 163. Экто- и эндосимбиоз метаногенов с простейшим

formicum и *Methanoplanus endosymbiosus*. Такие простейшие — строгие анаэробы, одна клетка которых содержит до 700 клеток прокариот. Эндосимбионты могут занимать до 10 % объема простейшего. При существовании в симбиозе рост усиливается на 30 % и эффективнее используется энергия в результате быстрой утилизации метаногеном молекулярного водорода, образующегося в гидрогенозома простейшего.

У многих моллюсков в светящихся органах находятся светящиеся бактерии, которые получают защиту и благоприятные условия для питания. Для моллюсков свечение играет важную роль в привлечении полового партнера.

Маленький тропический кальмар, ночное животное, приспособился использовать светящихся морских бактерий в качестве камуфляжа, помогающего скрывать появление тени на фоне неба

в лунную ночь. Кальмар отбрасывает свет по направлению ко дну моря и таким образом становится менее заметен для хищных рыб. Светящийся орган кальмара расположен возле чернильного мешка и устроен так, что свет от светящихся бактерий отражается специальным рефлектором и усиливается линзой. Бактерии входят в световой орган кальмара регулируемым путем: ежедневно, на закате, каналы светящегося органа начинают пульсировать со скоростью нескольких ударов в секунду, каждый раз засасывая 1—2 мкл морской воды с планктонными бактериями *Vibrio fischeri*. Установлено, что колонизировать светящийся орган способны лишь подвижные клетки, способные к свечению. Неподвижные и темные мутанты кальмара не колонизируют. После входа в светящийся орган клетки прикрепляются к внутренней мукоидной оболочке светящегося органа животного, теряют жгутики и начинают интенсивно размножаться. В это же время резко (до 100 раз) возрастает специфическое свечение клеток бактерий (в расчете на 1 клетку). В течение 20—40 мин свечение органа достигает максимума и остается на этом уровне всю ночь. На рассвете кальмар выпускает до 95 % светящихся клеток наружу, чтобы не тратить ресурсы на поддержание бактерий и сохранять активно светящуюся популяцию.

Колонизирующие бактерии воздействуют также и на кальмара — белки мукоидной оболочки экспрессируются быстрее у колонизированного кальмара по сравнению со стерильными особями. Колонизация способствует расселению бактерий, и кальмар предоставляет им питание для размножения (белки мукоидной оболочки), положительно влияя на бактерии в таком симбиозе.

У асцидий вокруг ротовой полости расположен *Prochloron*, фиксирующий CO_2 и получающий защиту от внешних воздействий.

У жвачных млекопитающих ЖКТ имеет сложное строение, при этом особое значение приобретает четырехкамерный желудок. Одна из его секций, *рубец*, содержащий огромное количество микроорганизмов, обеспечивает животным возможность питаться практически безбелковой пищей. Сам рубец и слюна не содержат целюлаз, и только в результате деятельности целлюлозоразрушающих микроорганизмов образуются жирные кислоты (формиат, ацетат, пропионат, бутират), которые усваиваются животными. Микроорганизмы утилизируют также выделяющиеся CO_2 и H_2 . Метаногены превращают их, а также ацетат и формиат в метан. Из аминокислот при разложении биомассы микроорганизмов в дальних отделах кишечника строится белок жвачных животных. Рубец населен разнообразными бактериями и археями, а также простейшими и грибами. В ротовой полости животного растительная пища смачивается слюной и заглатывается. Дополнительное смачивание и механическое измельчение непереваренных остатков осуществляется при отрыгивании пищевого комка и его длительном пережевывании. Путем отрыгивания удаляются также об-

разовавшиеся газы. Основное расщепление целлюлозосодержащего корма происходит в рубце, который является идеальным местом для роста анаэробных микроорганизмов, обеспечивая их «непрерывное культивирование» при постоянной температуре (37—39 °C) и pH ~ 6,5—7,0. Объем рубца составляет от 80 до 100 л. Нормальная микробиота рубца содержится в рубцовой жидкости и выстилает поверхность слизистой оболочки. Подсчитано, что 1 г содержимого рубца насчитывает до $\sim 10^{12}$ клеток прокариот. Небольшое количество кислорода, попадающего в рубец с пищей, быстро потребляется имеющимися в сообществе факультативно анаэробными микроорганизмами. Поддержанию оптимального значения pH способствует бикарбонат слюны, однако быстрое накопление жирных кислот, например лактата, может приводить к значительному закислению. Рубцовые прокариоты существенно различаются по чувствительности к изменениям pH. Целлюлозолитические бактерии и метаногенные археи очень чувствительны к понижению pH, тогда как бактерии, расщепляющие крахмал, обычно pH-резистентны. Одни рубцовые прокариоты являются высокоспециализированными группами, другие — обладают широкой субстратной специфичностью. Показано, что значительной численности ($\sim 10^7$ клеток на 1 г содержимого) в рубце достигают представители 20 видов прокариот, однако биоразнообразие бактерий и архей этого уникального местообитания оценивается значительно выше. Молекулярные методы и прямое микроскопическое наблюдение свидетельствуют о том, что в рубце видов прокариот в 10—100 раз больше, чем удается получить путем культивирования в лабораторных условиях. В рубце постоянно присутствуют представители таких родов, как *Ruminococcus*, *Fibrobacter*, *Butyrivibrio*, обладающих высокоактивными целлюлазами, *Ruminobacter*, *Selenomonas*, *Prevotella*, *Succinimonas*, *Streptococcus*, способных расщеплять крахмал, *Lachnospira*, участвующая в переваривании пектина, *Clostridium*, обладающие широкими возможностями разложения полисахаридов и пептидов. Микроорганизмы родов *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Peptostreptococcus*, *Wolinella*, *Anaerovibrio*, *Bacteroides*, *Micromonospora*, *Syntrophococcus*, *Escherichia*, *Syntrophomonas* и др. способны сбраживать большое количество сахаров, спиртов, аминокислот и жирных кислот. В рубце обнаружены сульфатредуцирующие бактерии рода *Desulfovibrio*, а из метаногенных архей преобладают *Methanobrevibacter ruminantium* и *Methanospirillum hangatei*.

Грибы, обитающие в рубце, осуществляют гидролиз лигнина и ксилана, и в меньшей степени целлюлозы. Выделенные из рубца грибы родов *Neoxallimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Oprinomycetes*, *Anaeromyces*, *Sphaeromyces* являются вторичными анаэробами, имеющими гидрогеносомы и содержащими гидрогенотрофные метаногены в качестве эндосимбионтов. Как правило, они имеют сложный жизненный цикл с образованием зооспор.

Содержание клеток простейших в рубце достигает 10^5 на 1 мл. Простейшие — важный компонент сообщества рубца, так как они способны наряду с разложением растительных компонентов гидролизовать клеточные стенки грибов, поглощать их зооспоры, заглатывать и переваривать частицы пищи и клетки прокариот. Анаэробные жгутиковые простейшие рубца относятся к родам *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Epidinium*, *Orphryoscolex*. Использование простейшими крахмала модулирует кислотность содержимого рубца и предотвращает ацидоз.

Таким образом, под действием сложного сообщества рубца расщепление грубой растительной пищи происходит в течение 0,5—2 сут. При рождении детеныша жвачного животного компоненты нормальной микробиоты рубца передаются ему со слюной матери и с кормом и в первые дни после рождения устанавливаются связи между симбионтами. Микробиота рубца наряду с осуществлением процессов расщепления сложных целлюлозосодержащих биополимеров до легко усваиваемых соединений обеспечивает животное витаминами, веществами-регуляторами и факторами роста, защищает внутренние органы от прикрепления и развития патогенных микроорганизмов, стимулирует иммунную систему животного.

Целлюлозоразрушающие микроорганизмы населяют также кишечник термитов, преимущественно заднюю кишку, где они из целлюлозы образуют ацетат — основной энергетический субстрат насекомого. Микробиота кишечника высших термитов представлена в основном прокариотами, у низших термитов значительную часть составляют жгутиковые простейшие. Бактериальный компонент кишечника термитов представлен значительным количеством молочнокислых бактерий и организмами, осуществляющими разные виды брожений из родов *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Sporomusa*, *Microbacterium*, *Edwardsiella*, *Micromonospora*, *Seibaidella*, *Cristispira*, *Acetobacterium*. В сообществе задней кишки термитов обнаружены также актиномицеты и риккетсии, образующие вещества, обеспечивающие нормальное развитие и размножение насекомых.

Кишечник термитов разделен на две зоны — анаэробную и аэробную. Вторая располагается на периферии кишечника и прилегает к ее внутренней слизистой поверхности (до 100 мкм в глубину кишки). Анаэробы и строгие анаэробы — это компоненты синтрофных ассоциаций, представленные метаногенными археями родов *Methanobrevibacter*, *Methanosarcina*, *Methanosphaera* и бактериями родов *Treponema*, *Bacteroides*, сульфатредуцирующими и азотфиксирующими микроорганизмами.

Интересный вид симбиоза обнаружен в муравейниках муравьев-листорезов, относящихся к высшему разряду из родов *Atta* и *Acromyrmex*. Установлено, что муравьи в течение миллионов лет культивируют в муравейниках грибы родов *Leucocoprinus* и *Leucogaricus* из семейства Lepiotaceae (агариковые) и такие гриб-

ные колонии были названы «грибные сады». Поддержание сада начинается со сбора субстрата для выращивания грибов. Листья приносятся в муравейник, и там муравьи начинают процесс их обработки, вначале смачивая слюной и пережевывая на мелкие кусочки размером 1—2 мм. Таким образом, с листьев удаляется большая часть микробиоты и поверхность их значительно возрастает. Затем масса листьев удобряется каловыми массами (источник азота и ферментов?) и укладывается поверх существующей кучи сада. Более старая часть грибной колонии (источник грибов) переносится на новую порцию листьев. Через шесть недель свежий субстрат полностью разлагается грибами и более старый субстрат оказывается внизу кучки. Использованный субстрат удаляется с нижней части кучки и помещается в «помойную яму», которая может быть вне или внутри муравейника. Рабочие муравьи постоянно следят за садом. Они, например, распределяют протеазы по поверхности кучи. Эти ферменты образуются грибом, выделяются при переваривании гриба личинками и с фекалиями доставляются рабочими муравьями в разные части кучи. Кроме того, муравьи специально рвут гифы грибов для стимулирования их роста. Они также регулируют температуру и влажность вокруг колонии сада, открывая и закрывая вентиляционные отверстия.

Отправляясь в брачный полет, самка берет с собой часть грибницы сада для устройства новой грибной колонии в новом муравейнике. Пока не появились новые рабочие муравьи, самка ухаживает за садом сама, подкармливая гифами новых личинок.

Установлено, что грибные сады поражаются патогеном из рода *Escovopsis* (Ascomycota), для которого выполняются закономерности постулата Коха. Если рабочих муравьев удаляют из сада, то паразит быстро (иногда за 12—24 ч) перерастает грибного продуцента и сад погибает. Гибель сада обычно приводит к гибели муравейника.

Некоторые ученые наблюдали, что рабочие муравьи, выращивающие грибные сады, покрыты беловатыми гранулами, которые принимали за воск, но затем было установлено, что это плотные комочки нитчатых бактерий-актиномицетов, иногда они полностью покрывают тело муравья. Актиномицеты передаются от муравейника к муравейнику вертикально, т.е. самка, отправляясь в брачный полет, несет немного актиномицета на кутикуле. Эти актиномицеты образуют мощный антибиотик, подавляющий рост патогена рода *Escovopsis*. Антибиотик и сам может защищать муравьев от инфекции (энтомопатогенных грибов). Рабочие муравьи, обслуживающие сады с искусственно внедренным туда патогеном, стимулируют развитие актиномицета на поверхности кутикулы уже через 8 дней после внесения патогена в сад. Возможно, что специальные железы муравьев образуют вещества, стимулирующие рост актиномицета в определенный период.

У человека только кровь и лимфа свободны от микробов. Микробиота нижних отделов ЖКТ представлена в основном энтеробактериями и строгими анаэробами рода *Bacteroides*, в отличие от рубца, простейшие в этом сообществе отсутствуют. Если в тонком кишечнике длиной 12—14 м пищевой комок находится 2—4 ч, а содержание клеток микроорганизмов не превышает 10^5 на 1 г, то в конечных отделах толстого кишечника длиной 1,5 м и объемом 0,9—1,7 л насчитывается уже свыше 10^{12} клеток прокариот на 1 г содержимого и пищевой комок задерживается там 12—24 ч. Прямая кишка характеризуется следующими физико-химическими условиями: температура 36—37 °C, Eh = –200—–300 мВ, содержание сухого вещества в каловых массах 20—30 %, обнаружены летучие жирные кислоты (ацетат, пропионат, бутират), нелетучие кислоты (лактат, сукцинат), газы (CO_2 , CH_4 , H_2 , H_2S , N_2 , NH_3 и пристеночно — O_2), следовые количества аминокислот и пептидов, существенное количество целлюлозы, гемицеллюлозы и мукополисахаридов, которые слушиваются с эпителия ЖКТ. Присутствуют в небольшой концентрации витамины группы В и значительные количества ионов Na^+ и Cl^- . Каловые массы на 90 % состоят из клеток микроорганизмов. Преобладающими здесь являются представители рода *Bacteroides* (до 70 %). В значительных количествах выявляются виды родов *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* (до 10^{10} клеток на 1 г). Еще около 400 видов микроорганизмов присутствуют в значительно меньших количествах (в том числе метаногенные археи). Основная масса постоянно присутствующих в кишечнике прокариот (*резиденты*) развивается в прикрепленном состоянии, образуя биопленки на слизистой оболочке. Особая микробиота имеется у грудных детей: первыми колонизируют кишечник *E. coli*, затем преобладают микроорганизмы рода *Bifidobacterium*. Нормальная микробиота имеет значение в детоксикации некоторых веществ, в синтезе витаминов, в подавлении патогенных форм, в том числе препятствуя их прикреплению к стенкам кишечника. Ряд микробов-симбионтов ЖКТ при попадании в несвойственные им органы и системы, а также при снижении иммунного статуса макроорганизма может вызвать серьезные инфекционные заболевания (микроорганизмы-*оппортунисты*). Например, *Fusobacterium neurophorum* при пробождении кишечника поселяется в клетках печени, вызывая некролизацию тканей. Микроорганизмы населяют не только внутреннее, но и внешние оболочки человека, например кожу. Здесь также присутствуют оппортунисты, ярким примером которых является грибок *Candida albicans*, в норме ведущий сапрофитный образ жизни на коже и слизистых оболочках ротовой полости и половых органов человека, а при изменении обмена веществ, в частности при беременности, способен вызывать инфекционное заболевание «молочницу».

Взаимодействия микроорганизмов и растений. Отношения, возникающие между микроорганизмами и растениями, базируются как на обмене метаболитами, так и на обеспечении физического контакта. Микроорганизмы играют существенную роль в процессах почвообразования, т.е. создают среду обитания для растений. Разложение сложных биологических полимеров микроорганизмами возвращает в окружающую среду соединения, необходимые для роста и развития растений. Трудно переоценить глобальный процесс связывания молекулярного азота, свойственный только прокариотам, который обогащает почву азотными соединениями. Грибы способны обеспечивать растения соединениями фосфора. Специфические микробные метаболиты могут влиять на скорость роста растений.

Мицелиальные микроорганизмы в симбиозе с растительными корнями способны освоить большее пространство почвы для питания. Ряд микроорганизмов путем выделения антимикробных субстанций может сдерживать колонизацию и инфицирование различных частей растения фитопатогенными микроорганизмами.

Живые растения, их мертвые остатки, а также различные прижизненные выделения являются источником пищи для микроорганизмов. Как поверхностные, так и внутренние структуры растения могут служить средой обитания микроорганизмов, предоставляя им пространство для роста, возможность перемещения и распространения вместе с частями растения, а в ряде случаев и защиту от внешних воздействий. Показано, что растения могут оказывать направленное влияние на окружающую его микробную ассоциацию, выделяя вещества-*аттрактанты* или *репелленты*.

Микробно-растительные взаимоотношения устанавливаются уже на стадии образования семени, оболочка которого, а часто и внутренние структуры несут клетки или покоящиеся формы микроорганизмов, количество и таксономическая принадлежность которых определяются множеством физико-химических и биологических факторов окружающей среды, а также свойствами самого семени. Среди микроорганизмов, обнаруженных на поверхности и внутри семян, наиболее известны представители таких родов аэробных и анаэробных бактерий, как *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Streptomyces* и др., а также грибов, относящихся к родам *Aspergillus*, *Botrytis*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Puccinia*, *Trichothecium*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Ustilago* и др., среди которых есть и фитопатогенные. Как микроорганизмы, так и структуры семени, несмотря на замедленный метаболизм, постоянно находятся под влиянием продуктов обмена веществ друг друга. При прорастании семени в благоприятных физико-химических условиях метаболические процессы в нем и в микробной популяции, с ним связанной, значительно активизируются. Метаболиты, выделяемые как микроорганизма-

ми, так и семенем, обладают определенной специфичностью, стимулируя или сдерживая рост различных групп микроорганизмов и влияя на процессы роста и развития молодого растения. Кроме того, при образовании проростка часть популяции микроорганизмов механически выносятся из почвы в воздушную среду. Поэтому при анализе взаимоотношений растений и микроорганизмов их традиционно подразделяют на внутрпочвенные и надземные.

Развивающаяся корневая система, проникая в глубь почвы, вступает во взаимодействие с почвенными микроорганизмами, животными и корнями других растений. Вокруг корня формируется так называемая *ризосфера* — окружающее корень пространство почвы диаметром 0—8 мм, характеризующееся более высокой плотностью микроорганизмов. Количество микробных клеток в ризосфере может превышать их число в окружающей почве даже на порядок. Пространство поверхности корня часто определяют как отдельное местообитание микроорганизмов, называемое *ризопланой*.

Стимуляция роста микробного сообщества происходит за счет продуктов жизнедеятельности корневой системы растения (*корневых депозитов*, *ризодепозитов*). Это понятие включает *корневые экссудаты* (выделения) — низкомолекулярные органические вещества (сахара, спирты, органические и аминокислоты, витамины, гормоны и т.д.), а также высокомолекулярные метаболиты (полисахаридные и белковые слизи, ферменты) и утраченные части растения (слизистые клетки, отмершие участки корня, корневой чехлик и т.д.). Подсчитано, что более 40 % углерода, зафиксированного в процессе фотосинтеза, теряется в виде корневых депозитов. Наиболее интенсивная «утечка» таких веществ происходит в зоне растяжения корня при его росте. С другой стороны, в присутствии потенциального патогена некоторые растения образуют *фитоалексины*, обладающие специфической антимикробной активностью. Растение также способствует изменению физико-химических условий среды обитания микроорганизмов, оказывая механическое воздействие на почву, выводя через свою сосудистую систему ряд газов (например, метан на рисовых чеках) и транспортируя кислород в анаэробные участки почвы вокруг корня. Ризосферные микроорганизмы, развиваясь на корневых депозитах растения, в процессе метаболизма и после отмирания микробных клеток образуют питательные вещества в формах, доступных для использования растениями.

Состав и количественные соотношения компонентов микробного сообщества ризосферы зависят как от вида растения, так и от места его произрастания.

События, происходящие в ризосфере при росте корня, могут быть схематично описаны следующим образом. Бактерии в почве концентрируются на поверхности органического материала и отличаются слабой метаболической активностью из-за ограничен-

ной доступности питательных веществ. При росте корня сквозь почву вокруг кончика увеличивается содержание доступных питательных веществ за счет корневых выделений, что способствует активизации микробного роста и высвобождению доступных для растения форм азотных соединений. Возросшая численность микроорганизмов ризосферы привлекает почвенных простейших, которые питаются микробными клетками, при этом треть «бактериального азота» выделяется в виде иона аммония. Часть аммония поглощается растущим корнем. Микроорганизмы также образуют ферменты, способствующие минерализации сложных органических соединений до простых, доступных растениям.

При колонизации поверхности корня микроорганизмами могут быть задействованы специальные механизмы прикрепления.

Создание корневой системой растения благоприятной среды обитания для микроорганизмов путем повышения уровня питательных веществ приводит не только к увеличению численности микробной популяции, но иногда и к заметным изменениям в составе микробного сообщества. Многие стрептомицеты успешно колонизируют ризосферу, так как способны образовывать антибиотики и успешно конкурировать с быстрорастущими бактериями ризосферы, такими, как псевдомонады и бациллы. К тому же актиномицеты, имеющие мицелиальную организацию, могут осваивать более сухие почвы, чем одноклеточные формы, которым для осуществления движения необходима водная пленка. Важную роль играют мицелиальные грибы, как свободноживущие, так и микоризные, в обеспечении растения минеральным питанием, в частности соединениями фосфора. За счет развития мицелия грибами может осваиваться значительно больший объем почвы. При росте растения в местах с низким содержанием связанного азота повышается значение азотфиксирующих ризосферных бактерий родов *Azotobacter*, *Azospirillum* и *Azoarcus*, осуществляющих *ассоциативную азотфиксацию*. Сообщество ризосферы всегда включает простейших и нематоды, которые привлекаются высоким уровнем развития бактерий и грибов в этой области почвы.

Микроорганизмы ризосферы оказывают влияние на растение не только путем преобразования сложных органических веществ в доступную для растения форму, но и за счет *стимуляторов роста* (например, гиббереллинов), которые воздействуют на морфологию и физиологию растения, а также других специфических метаболитов, например этилена, вызывающего раннее цветение. В присутствии патогенных микроорганизмов микроорганизмы ризосферы могут синтезировать различные *биоконтролирующие агенты* (антибиотики, ферменты, сидерофоры и др.), подавляющие рост нежелательной микробиоты. Продукты таких агентов относятся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* и др.

Биотехнологическое использование ризосферного симбиоза рассматривается в настоящее время в двух аспектах: 1) фиторемедиация загрязненных вод и почв и 2) модификация ризосферного микробного сообщества для создания благоприятных условий развития сельскохозяйственных растений. В первом случае успешная биodeградация ксенобиотиков происходит именно в симбиозе микроорганизмов с растением, причем возможна генно-инженерная модификация как микробного компонента, так и самого растения для повышения активности трансформации трудноразлагаемых веществ. Во втором случае предполагается введение в сообщество как микроорганизмов, активирующих развитие растения (азотфиксаторов, продуцентов стимуляторов роста), так и поставщиков биоконтролирующих агентов, сдерживающих проникновение и рост патогенных микроорганизмов. Интродуцируемые организмы могут быть выделены из окружающей среды или «сконструированы» в лаборатории.

Пространство вокруг надземных частей растения, а также ткани этого растения образуют *филлосферу*, в которой выделяют собственно поверхность растения, называемую *филлопланой*. Количество микроорганизмов, обитающих на надземной части растения, сравнимо с численностью микроорганизмов в почве и достигает 10^8 клеток на 1 г листовой массы. Состав микробного сообщества филлосферы принципиально не отличается от сообщества, присущего семенам растений. Среди его представителей отмечены как сапротрофные, так и патогенные виды. Состав и численность конкретного микробного сообщества филлосферы зависят от вида растения и от сочетания физико-химических факторов среды его обитания. Микроорганизмы, обитающие на листьях растений, помимо упомянутых выше, относятся к родам *Beijerinckia*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Methylobacterium*, *Rhodotorula* и др. При прорастании состав и количественные соотношения компонентов микробного сообщества, вынесенного в воздушную среду из почвы, будут меняться под влиянием факторов окружающей среды. Меняется и расположение клеток микроорганизмов на поверхности листа: одни распределяются диффузно, другие образуют скопления вокруг устьиц. Это основные места обмена растения метаболитами с окружающей средой, где осуществляется газообмен, выделение летучих и нелетучих соединений, служащих питательными субстратами для микроорганизмов. Через устьица также могут проникать патогенные микроорганизмы и выделяться *фитонциды*, соединения антимикробного действия, подавляющие развитие микроорганизмов. Такие вещества способны синтезировать хвойные деревья, чайные кусты, растения чеснока, лука, пряновкусовые растения и т.д.

Ярким проявлением мутуалистического симбиоза микроорганизмов и растений можно считать процесс *симбиотической азот-*

фиксации, при котором микроорганизм обеспечивает растение связанными формами азота, а растение снабжает микроорганизм питательными веществами и энергией и защищает нитрогеназный комплекс от действия кислорода. Микроорганизмы, способные к симбиотической азотфиксации, относятся к родам *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, образующим клубеньки на корнях бобовых растений, и *Frankia*, вступающим в симбиоз с некоторыми двудольными древесными растениями (береза, ольха, облепиха и др.). Корневые волоски бобовых растений образуют аттрактанты флавоноидной природы, которые специфично привлекают микроорганизмы и запускают синтез микробных Nod-факторов, обеспечивающих взаимодействие с растением. Микроорганизмы также синтезируют *лектины*, участвующие в адгезии бактериальных клеток на поверхности корня, и стимуляторы роста растений (индолилуксусную кислоту). Стимуляция роста части поверхностных слоев клеток корневого волоска приводит к его спирализации, а микроорганизмы попадают внутрь спирали. Размягчение оболочек поверхностных структур корня под действием фермента полигалактуроназы дает возможность бактериальным клеткам проникнуть внутрь клеток растения и сформировать инфекционную нить. В тетраплоидных клетках кортекса корня инфекционная нить распадается на удлиненные образования неправильной формы (*бактероиды*). При этом тетраплоидные клетки интенсивно размножаются и образуют наросты (*клубеньки*) на корнях растений. Внутри клубеньков и происходит процесс симбиотической азотфиксации, которая сопровождается совместным синтезом сложного соединения *леггемоглобина*, белковую часть которого образует растение, а гем синтезирует бактерия.

Мицелиальный организм рода *Frankia*, проникая в клетки корня растения, стимулирует локальное разрастание тканей корня с образованием клубеньков. При этом гифы внутри корня образуют разветвления и раздуваются на концах, превращаясь в *везикулы*, осуществляющие фиксацию молекулярного азота.

Широко распространенный тип мутуалистического симбиоза — *микориза* («грибкорень»). Это микробно-растительное взаимодействие основано на обеспечении гриба сахарами, образованными растением, а растение в свою очередь получает преимущества за счет освоения большего объема почвы с помощью грибного мицелия. Микориза существенно увеличивает поглощение влаги, фосфатов и других минеральных веществ для растения, а также обеспечивает защиту растения от фитопатогенов и тяжелых металлов. Этот симбиоз бывает двух видов: *экто-* и *эндомикориза*. Эктомикоризу образуют сотни видов грибов, преимущественно базидиомицетов, вступающая в симбиоз с древесными растениями (сосна, дуб и др.). Мицелий гриба оплетает корень растения, образуя мантию. Внутренний слой мантии связан с гифами, вне-

дринающимися между клетками эпидермиса и кортекса корня и сформировавшими мицелиальную сеть. Эндомикориза образуется в основном зигомицетами, вступающими в ассоциацию со множеством растений, в том числе вересковыми и орхидными. Гифы гриба проникают через оболочки кортикальных клеток растения и формируют дихотомически разветвленные структуры, называемые *арбускулами*. В других клетках кортекса корня гифы грибов могут образовывать пузырьвидные вздутия (*везикулы*). Арбускулы и везикулы считаются основным местом обмена питательными веществами между растением и грибом.

Паразитизм распространен среди патогенных форм. Например, вирусы, в том числе бактерио-, актино- и цианофаги, бактерии, поражающие клетки флоэмы высших растений, агробактерии, вызывающие раковые разрастания у растений, — это все внутриклеточные паразиты. Развитие облигатного внутриклеточного паразита в определенных условиях приводит к гибели хозяина. Например, *Bdellovibrio bacteriovorus* проникает в периплазму, превращается в нить и постепенно лизирует клетку хозяина. Такие микроорганизмы распространены в водоемах. Подобно бделловибрио поражают зеленые водоросли микроорганизмы рода *Campylobacter*.

В настоящее время представления о количестве партнеров, необходимых для создания устойчивых симбиозов, претерпели существенные изменения. Показано, что наряду с признанными компонентами лишайников, актино- и микориз из таких сообществ постоянно выделяются бактерии, например рода *Burkholderia*. Для ряда эндомикориз установлена необходимость присутствия бактерий-хелперов, способствующих формированию симбиоза на первых этапах и облегчающих проникновение гиф гриба в клетки растения. В лишайниках отмечено постоянное присутствие грамположительных бактерий. Заключительные этапы аэробного разложения целлюлозы в почве требуют присутствия множества разных по морфологии простекобактерий как партнеров целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Таким образом, простые взаимосвязи в ряде симбиозов должны быть пересмотрены в сторону усложнения и увеличения количества партнеров.

Физиологический статус микроорганизмов в экосистемах

Экологические группы микроорганизмов. Еще С. Н. Виноградский разделил все микроорганизмы на две группы, использующие принципиально разные типы *экологической стратегии*. Экологическая стратегия — это совокупность реакций организма на действие факторов окружающей среды. К первой группе относят-

ся *автохтонные* микроорганизмы, постоянно присутствующие в сообществе независимо от количества питательных веществ в нем. Такие микроорганизмы растут как *K-стратеги*, т.е. медленно, с низкими скоростями роста, но всегда. Второй тип — *аллохтонные* (или *зимогенные*), присутствующие «всплесками», когда есть много органического вещества (например, один раз в году при листопаде), растут как *r-стратеги*, т.е. с высокими скоростями роста, требующие высоких концентраций питательных веществ. При таком быстром росте рассеивается много энергии и органического вещества. Позднее был определен еще один тип стратегии (*L-стратегия*), основанной на высокой устойчивости к возмущениям в окружающей среде и способности к переживанию неблагоприятных условий.

Необходимо также учитывать, что в различных экосистемах присутствуют *олиготрофные* микроорганизмы, растущие только при низких концентрациях питательных веществ. При высоких концентрациях растут микроорганизмы-*копиотрофы*. Олиготрофами считаются только гетеротрофные микроорганизмы, растущие при низких концентрациях соединений углерода. Обычно копиотрофы растут как *r-стратеги*, а олиготрофы — как *K-стратеги*.

Деление микроорганизмов на основании их способности гидролизовать биополимеры (*гидролитики* и *диссипотрофы*) позволило составить представление о функционировании микробных сообществ почв как о трехступенчатом процессе: гидролитики → копиотрофы → олиготрофы. При разложении органического вещества происходит саморегуляция системы. Первая стадия гидролиза полимеров управляется концентрацией образующихся мономеров по типу обратной связи. Поскольку мономерные соединения создаются в системе быстрее, чем потребляются, синтез экзогидролаз подвергается кatabолитной репрессии, а гидролитики переходят в покоеющее состояние. Копиотрофы, использующие *r-стратегию* роста, снижают содержание мономеров в среде и таким образом позволяют развиваться группе олиготрофов, которые и утилизируют органическое вещество.

В микробном сообществе всегда имеется градиент микроорганизмов по проявлению различных активностей (например, по K_M). В то же время в ассоциациях отмечено наличие «функциональных дублеров».

В задачи *экологии микроорганизмов* входят выявление разнообразия микроорганизмов и их взаимодействия в природе, а также определение их активностей в присущем им местообитании (а не в лабораторных условиях).

Примером взаимодействия сообществ микроорганизмов в природе может быть непроточное озеро (рис. 164). Моделью водной экосистемы, учитывающей влияние градиентов всех факторов, является *колонка Виноградского* (рис. 165).

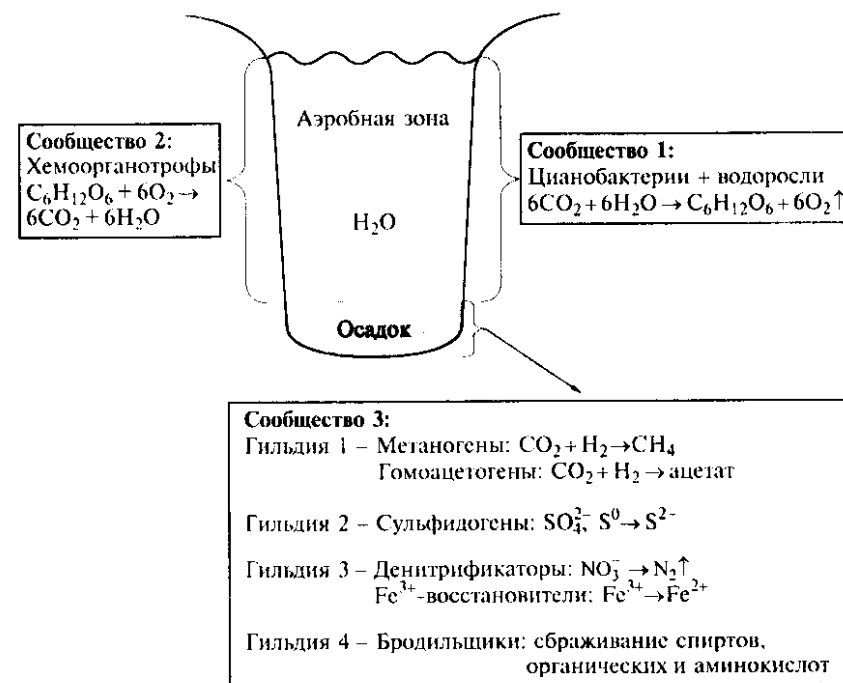


Рис. 164. Модель сообществ микроорганизмов непроточного озера

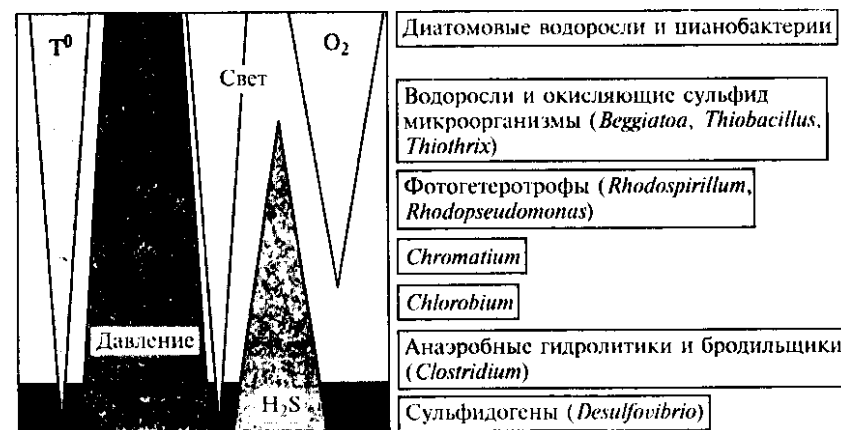


Рис. 165. Модель водной экосистемы с градиентами основных факторов и распределением групп микроорганизмов

Рост микроорганизмов в прикрепленном состоянии. В пресноводных и морских местообитаниях имеет место образование так называемых *биоленок*. Простейший пример биопленки — монослой клеток одного типа. Обычно это начальная стадия образования более сложной структуры при колонизации поверхности раздела фаз. В зависимости от особенностей обитания микроорганизмов (свет, наличие питательных веществ и скорости диффузии) структура биопленки может усложняться (например, образованием слоистости), при этом слои уже представлены различными типами микроорганизмов. Например: верхний слой — фотосинтетики, средний — факультативные хемоорганотрофы, нижний — сульфатредукторы. Более сложная пленка развивается как трехмерная структура, включающая клеточные агрегаты, внутренние поры и сквозные каналы (рис. 166). Исследование таких сложных ассоциаций ведут с помощью конфокального сканирующего лазерного микроскопа, позволяющего послойно (до 1 мкм) получать изображение клеток на разной глубине пленки. Потом с помощью компьютерного анализа реконструируют общий вид биопленки.

Биопленка может разрастаться до макроскопического размера, образуя *микробный мат*. Иногда слои микроорганизмов имеют различный цвет, и тогда структура мата видна невооруженным глазом. Такие маты часто формируются на поверхности камней или осадков в сверхсоленых и пресноводных озерах, лагунах, горячих источниках и морских прибрежных областях. Маты содержат микробные нити, включающие цианобактерии, которые являются *эдификаторами*, т.е. организмами, формирующими сообщество и определяющими его структуру. Ниже фотической зоны (~1 мм, куда проникает свет) складываются анаэробные условия. В ниж-



Рис. 166. Строение сложной трехмерной биопленки

ней части мата живут сульфатредукторы, образующие сульфид, который диффундирует в зону анаэробного фотосинтеза, где растут зеленые и пурпурные бактерии.

Есть предположения, что микробные маты могли участвовать в формировании наземных экосистем еще до развития сосудистых растений, так как их ископаемые остатки (*строматолиты*) датируются 3,5 млрд лет.

Особенности водных микроорганизмов. Водные микроорганизмы осуществляют в водоемах замкнутые циклы основных элементов, поскольку в микробных сообществах представлены и первичные продуценты органического вещества (эу- и прокариотические фотоавтотрофы, прокариоты-хемоавтотрофы), и консументы (простейшие), и деструкторы (большинство гетеротрофных прокариот и грибов). Водные микроорганизмы присутствуют в планктоне и бентосе, прикрепляясь к плавающим частицам и обитая в донных осадках. Важнейшие группы прокариот, обитающих в водных экосистемах, даны в табл. 30. Простейшие представлены фораминиферами и радиоляриями. Среди водорослей преобладают диатомеи.

Отдельные виды микроскопических грибов из оомицетов и хитридиевых приспособились к жизни в пресноводных и морских водоемах. Некоторые хитридиевые паразитируют на диатомовых водорослях. Другой важной группой нитчатых грибов являются гифомицеты из группы грибов Инголда. Эти грибы способны образовывать под водой четырехлучевые споры. Их прора-

Таблица 30

Важнейшие группы прокариот, обитающих в водных экосистемах

Группа	Род	Группа	Род
Фотоавтотрофы	<i>Chlorobium</i>	Хемогетеротрофы	<i>Blastobacter</i>
	<i>Chloroherpeton</i>		<i>Caulobacter</i>
	<i>Chromatium</i>		<i>Flexibacter</i>
	<i>Pelodictyon</i>		<i>Flexithrix</i>
	<i>Thiodictyon</i>		<i>Gemmobacter</i>
	<i>Thiopodia</i>		<i>Hyphomicrobium</i>
Фотогетеротрофы	<i>Chloroflexus</i>	Хемолитоавтотрофы	<i>Leucothrix</i>
	<i>Helio bacterium</i>		<i>Sphaerotilus</i>
	<i>Heliothrix</i>		<i>Beggiatoa</i>
	<i>Rhodocyclus</i>		<i>Galionella</i>
	<i>Rhodomicrobium</i>		<i>Thioploca</i>
	<i>Rhodospseudomonas</i>		<i>Thiothrix</i>
	<i>Rhodospirillum</i>		<i>Thiovulum</i>

стание на упавших в воду листьях и проникновение гиф внутрь листа способствует переработке органического материала, который затем потребляется личиночными стадиями наземных насекомых. Вылет взрослых форм таких насекомых приводит к переносу гиф грибов из их пищеварительного тракта на листья наземных растений.

В олиготрофных и бедных органическим веществом водах присутствуют скользящие и простековые микроорганизмы, способные прикрепляться к доступному субстрату, обрастать его, образуя хлопья (флокы).

Наиболее интересное открытие, касающееся морских местообитаний, — присутствие не только большого количества вирусов, но и высокое содержание архей. Приблизительно $\frac{1}{3}$ пикопланктона (клетки размером менее 2 мкм) составляют археи, традиционно приписываемые к экстремальным местообитаниям. В морях отмечен сверхвысокий уровень *ультрамикробактерий* (*нанобактерий*), в основном рода *Sphingomonas*, которые могут проходить через мембранный фильтр с размером отверстий 0,2 мкм. Они обладают поразительной устойчивостью к голоданию и так малы, что не поедаются даже нанофлагеллятами.

Разные водоемы, безусловно, различаются как по физико-химическим условиям, так и по уровню первичной продукции (дистрофные, олиготрофные, мезотрофные и евтрофные). Органическое вещество может образовываться непосредственно в водоеме (автохтонное), а может попадать в водоем извне (аллохтонное). К наиболее важным физико-химическим характеристикам водоема относятся температура, освещенность, уровень минерализации, количество растворенных газов, pH и Eh, мощность и структура донных отложений.

В аэробной зоне водоема расположено множество экологических ниш.

В *поверхностной зоне* преобладают микроорганизмы, способные находиться во взвешенном состоянии: клетки, имеющие жгутики, простеки, прикрепительные диски, газовые вакуоли, или организмы малых размеров. Доминирующими формами здесь являются олиготрофы и простекобактерии родов *Hyphomicrobium*, *Planctomyces*, *Blastobacter*, *Pasteuria*, *Caulobacter*, *Asticacaulis*, *Prosthecomicrobium*, *Seliberia*, *Prosthecochloris* и др. Спириллы относятся к типично планктонным бактериям. Из способов метаболизма преобладают фототрофия, метилотрофия и нитрификация.

Вся *толща водной массы* в зависимости от градиентов факторов поделена на ряд подзон: подзона фотосинтеза, подзоны продукции биомассы гетеротрофных и хемолитотрофных микроорганизмов, подзона деструкции органического вещества, подзона термоклина. В водоемах с повышенной соленостью наблюдается заметная первичная продукция органического вещества за счет хе-

мосинтеза. Основная масса органического вещества (как синтезированного в водоеме, так и привнесенного извне) разлагается в аэробной водной толще (до глубины 10 м) и не достигает дна. Миксобактерии, а также представители родов *Flexibacter* и *Cellvibrio* способны лизировать живые клетки цианобактерий и зеленых водорослей. Биополимеры мортмассы микроорганизмов, фитопланктона и высших растений и животных разлагают миксобактерии и виды родов *Sporocytophaga*, *Lysobacter*, *Beneckea*, *Alginomonas*, *Vibrio*, *Cytophaga*.

В *поверхностном слое ила* обитают прикрепленные или скользящие микроорганизмы. Это микроаэрофильные организмы родов *Flexibacter*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, факультативно анаэробные цитофаги и бациллы, нитчатые бактерии *Pelonema*, *Peloploca*, *Leucothrix*, железобактерии *Metallogenium*, *Hyphomicrobium*, *Seliberia*, зеленые нитчатые бактерии. Анаэробный распад в приповерхностном слое донных осадков осуществляют клостридии и энтеробактерии. Нижние слои ила составляют сульфатредукторы и метаногены, завершающие анаэробную деструкцию упавших на дно растительных и животных остатков.

Особенности почвенных микроорганизмов. Важнейшей земной экосистемой является *почва*. В почвах преобладает твердая фаза, и большинство почв является преимущественно аэробными. Основные продуценты в почвенных экосистемах — растения. Почвы образуются в широком спектре климатических условий. Это не статичные системы, они зависят от изменений температуры и влажности. В почвах формируются уникальные местообитания для многих организмов (бактерий, грибов, простейших, водорослей, насекомых, нематод, мелких животных). Все эти организмы необходимы для формирования и поддержания почвы.

Почвы содержат множество поверхностей, которые влияют на доступность питательных веществ и взаимодействия микроорганизмов. Различный размер пор делает их в разной степени доступными для использования и колонизации. На рис. 167 представлено типичное распределение микроорганизмов в почве. Бактерии имеют тенденцию присутствовать в виде микроколоний на поверхности почвенных частиц или в виде суспензии в почвенном растворе в порах. Нитчатые грибы и мицелиальные формы прокариот способны расти как на почвенных агрегатах, так и между ними, оплетая их, и, с одной стороны, связывая между собой, а с другой — разобшая. Простейшие обитают в водной пленке и поедают бактерии.

Почвы состоят из песка, глины, ила и других частиц. Органическое вещество, постоянно прибавляющееся в виде растительных и животных остатков, постепенно трансформируется в стабильный, богатый питательными веществами материал — гумус. Все эти компоненты формируют гетерогенные агрегаты разного размера, или почвенные частицы, которые пронизаны сложной



Рис. 167. Типичное распределение групп микроорганизмов в почве

сетью пор. Бактерии и грибы используют разные функциональные стратегии для получения преимуществ в этом физически сложном матриксе. Большинство бактерий локализовано на поверхности почвенных частиц, и им необходимо, чтобы вода и питательные вещества располагались в непосредственной близости. Часто бактерии встречаются внутри маленьких пор (диаметром 2—6 мкм), где у них больше вероятности не быть съеденными простейшими. Мицелиальные формы микроорганизмов, напротив, стремятся расположиться на внешней поверхности агрегатов. Эти организмы могут формировать мостики между отдельными участками, добываясь в места, где влага более доступна. Таким образом, мицелиальные формы могут «продвигаться» на большие расстояния в поисках воды и питания.

Из-за ограниченной диффузии газов внутрь агрегатов и из них, из-за обводненности пространства между агрегатами в микроокружении могут иметь место значительные изменения концентрации газов и растворенных веществ. По сравнению с атмосферой в почвах заметно более высокие концентрации CO_2 , CO и других газов и пониженное содержание кислорода, формируется градиент O_2 и могут образовываться анаэробные микрозоны. После дождя почва может быстро превратиться из аэробного местообитания с несколькими отдельными анаэробными микронизмами в преимущественно анаэробную среду, особенно с увеличением глубины.

При нейтральном pH большинство твердых компонентов почвы, включая микроорганизмы, заряжено отрицательно. Положительно заряженные ионы типа водорода и аммония притягивают-

ся к отрицательно заряженным поверхностям. Частицы глины и гумус, содержащий полуразрушенный и стабилизированный органический материал, также притягивают и связывают разнообразные органические и неорганические вещества (например, ионы металлов и продукты частичной деградации пестицидов).

Почвы формируются в различных условиях окружающей среды. Там, где происходит выветривание нового геологического материала либо после извержения, либо после землетрясения, начинается колонизация его микроорганизмами. Пионерами здесь являются цианобактерии, способные к фотосинтезу и азотфиксации. Большую роль в формировании и функционировании почв играют gram-положительные бактерии, показывающие разную степень ветвления и развития мицелия, а именно кориннеформные, нокардиоформные бактерии, а также актиномицеты. Эти группы играют важную роль в расщеплении углеводов, ископаемых растительных материалов и почвенного гумуса. Некоторые представители способны разрушать пестициды и другие ксенобиотики. Характерный почвенный запах зависит от выделяемого стрептомицетами вещества *геосмина*. При анализе микробного «населения» почвы следует учитывать, что в настоящее время удастся культивировать только около 10 % почвенных микроорганизмов. Некультивируемые формы можно выявлять с помощью молекулярно-биологических методов, экстрагируя микробную ДНК и амплифицируя ее в полимеразных цепных реакциях с последующим определением последовательности нуклеотидов в гене, кодирующем 16S рРНК.

Формирование того или иного типа почвы зависит от сдвига равновесия между образованием и разрушением органического материала. На него влияют такие факторы, как температура и другие климатические условия, материнская порода, состав растений и микроорганизмов. Например, во влажных тропических почвах, где более высокие температуры, органическое вещество быстро расщепляется и подвижные неорганические питательные вещества могут выщелачиваться с поверхности, вызывая быструю потерю плодородия. Чтобы ограничить эти потери, многие тропические растения имеют корневую систему, которая проникает в быстро разрушающуюся подстилку, тем самым улавливая освобождающиеся питательные вещества.

В более умеренных регионах, наоборот, скорости разложения медленнее, чем первичной продукции, что приводит к накоплению опада. Глубокое проникновение корней растений ведет к формированию плодородия почвы.

В холодных зонах зимой, когда влага доступна и почва охлаждена, разложение органики ограничено. Летом, когда почва теплая, недостаточно влаги. Органические кислоты образуются в холодном, мокром слое опада и вымываются в нижележащие слои. Они растворяют почвенные компоненты (например, алюминий и

железо), образуя иногда обесцвеченные зоны. Подстилка продолжает накапливаться, и нередко инструментом, возвращающим питательные вещества в глобальные циклы, становится огонь (лесной пожар).

Болотная почва представляет собой уникальный набор условий для микробного роста. Здесь скорость разложения снижена переувлажненностью, преобладанием неоокислительных условий, что приводит к формированию торфа. Если такую область дренировать, она становится более аэробной, органический материал разрушается и уровень почвы опускается. В аэробных условиях лигнин-целлюлозные комплексы запасенного органического материала более успешно разрушаются нитчатými грибами.

В почвах важны также взаимодействия микроорганизмов с растениями (ризосфера, микориза, клубеньковые бактерии и т.д.).

Некоторые почвенные микроорганизмы взаимодействуют с земной атмосферой. Из «экзотических» явлений можно отметить способность *Pseudomonas syringae* синтезировать белок, который служит ядром формирования льда на поверхности листьев и снега в грозовых тучах. Такой снегоформирующий почвенный микроорганизм может влиять на погоду в глобальном масштабе. Почвенные микробы оказывают положительное влияние на атмосферу, разрушая такие воздушные «загрязнители», как метан, водород, СО, бензол, трихлорэтилен, формальдегид. Почвенные микроорганизмы оказывают большое влияние на глобальное содержание разных газов. Относительно стабильные газы — CO_2 , NO , N_2O и метан. Эти газы называют *парниковыми газами*, так как они отражают тепловые лучи, не позволяя теплу уходить от поверхности Земли, и вызывают глобальное потепление. Метан может потребляться метанотрофами, обитающими в почве и воде. Критическим фактором, влияющим на потребление метана почвой, является концентрация иона аммония. При увеличении содержания аммония в почве из-за сельскохозяйственной деятельности или вследствие загрязнения потребление метана снижается. Таким образом почвенные и водные метанотрофы могут рассматриваться как своеобразный *бактериальный газовый фильтр*.

Проблема загрязнения природных экосистем и возможности самоочищения

Для обеспечения сбалансированного круговорота веществ необходимо, чтобы эти соединения как синтезировались, так и разлагались. Человек в своей деятельности не только заставил живые организмы образовывать нужные ему вещества в сверхколичествах, но и синтезировал химическим путем огромное количество чуждых природе соединений, которые, обладая значительной стабиль-

ностью, накапливаются в окружающей среде. Такие *ксенобиотики* имеют уникальную биологическую активность, как правило, негативную (канцерогенную, мутагенную, тератогенную, аллергенную) и, быстро распространяясь по пищевым цепям и в пространстве, оказывают токсическое воздействие уже на уровне микропримесей. В широком смысле к ксенобиотикам могут быть отнесены и вещества природного происхождения, но полученные в сверхколичествах и перемещенные в несвойственные им места (например, нефть). Поскольку человечество не может полностью отказаться от использования таких веществ, так как они применяются практически во всех областях деятельности, первоочередной задачей становится очистка окружающей среды от антропогенных загрязнителей.

Микроорганизмы, обладающие огромным разнообразием ферментных систем и большой лабильностью метаболизма, и являются тем звеном, которое в основном ответственно за самоочищение природных экосистем и может осуществлять биodeградацию природных и синтетических ксенобиотиков, тем самым возвращая основные питательные элементы в глобальный цикл.

Особую актуальность разрушающая способность микроорганизмов приобрела в последние десятилетия в связи с увеличивающимся присутствием в биосфере устойчивых загрязнителей антропогенного происхождения, причем нередко в масштабах, превышающих природную самоочищающую способность.

Применение живых организмов для очистки воды, почвы и воздуха от различных загрязнений основано на их способности к *биodeградации* (*биоразрушению*). Это широкое понятие включает три более узких процесса:

- *трансформацию*, или незначительные изменения молекулы;
- *фрагментацию*, или разложение сложной молекулы на более простые соединения;

- *минерализацию*, или превращение сложного вещества в самые простые (H_2O , CO_2 , H_2 , NH_3 , CH_4 и т.д.).

Деградация ксенобиотиков может происходить различными путями в зависимости от химической структуры разрушаемого вещества, наличия тех или иных биологических активностей, а также в зависимости от условий окружающей среды. Химическая природа ксенобиотиков чрезвычайно разнообразна — линейные и разветвленные алканы и алкены, ароматические соединения с различными заместителями, гетероциклы, конденсированные циклические структуры и полимеры. В разрушении сложных, устойчивых веществ важны процессы *синтрофии* и *кометаболизма* (в аэробных условиях — *соокисления*), когда проявление способности к трансформации сложной молекулы обуславливается наличием доступного источника энергии для поддержания жизнедеятельности, так как сам ксенобиотик не может использоваться в этих целях.

В настоящее время в процессах очистки применяют в основном естественно складывающиеся микробные сообщества. Пока механизмы этих процессов, видовой состав сообществ и взаимодействие микроорганизмов в них мало изучены и поэтому массовое применение *биоремедиации*, т. е. использования биологических систем для очистки окружающей среды от загрязнений, весьма ограничено. Однако разнообразие метаболических путей в микробных сообществах позволяет надеяться, что в перспективе возможно создать ассоциации, способные разрушать весь набор синтезированных человеком соединений, тем самым возвращая в глобальные циклы элементов активные формы углерода, азота и т. д.

Глобальные циклы основных биогенных элементов

О глобальных циклах основных элементов дают представление схемы, представленные на рис. 168—170. Необходимо помнить, что в природе превращения отдельных элементов не происходят автономно, они взаимосвязаны и взаимозависимы. *Цикл углерода*

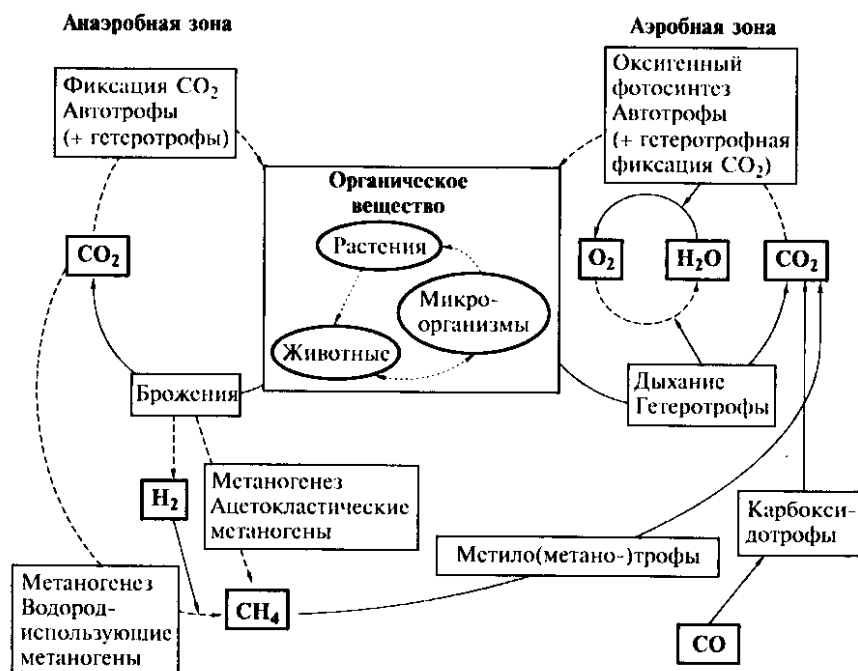


Рис. 168. Цикл углерода и его связь с циклом кислорода (— — процессы окисления, ---- — процессы восстановления, — процессы, идущие без изменения валентности)

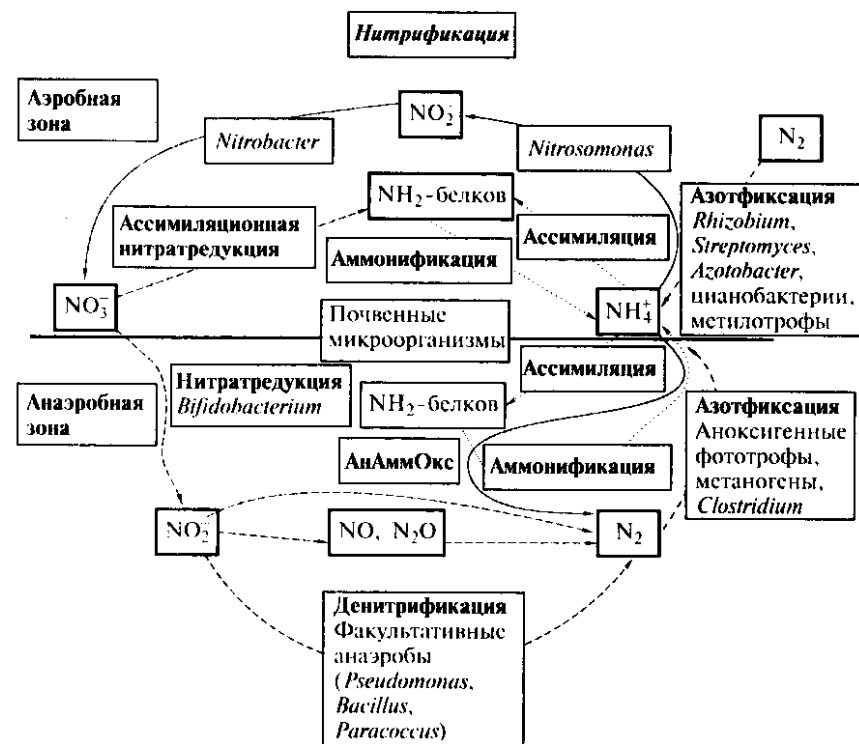


Рис. 169. Цикл азота (обозначения см. на рис. 168)

и его связь с *циклом кислорода* показаны на рис. 168. «Увод» углерода из круговорота осуществляется в основном по двум позициям: 1) образование неорганических отложений (известняков) за счет соединения в водных системах (особенно в морских) ионов Ca^{2+} с карбонатными (CO_3^{2-}) ионами. Возвращение может происходить либо путем химического выветривания пород, либо за счет выработки микроорганизмами кислых продуктов; 2) накопление природных и синтетических трудноразлагаемых органических веществ. К природным органическим веществам следует отнести *гумус*, состоящий из продуктов неполной деградации лигнина, а также образующиеся при недостатке кислорода и накоплении кислот торф, каменный уголь, нефть и газ, к синтетическим — огромное количество сложных органических ксенобиотиков (пластики, пестициды, красители и др.). Таким образом, с одной стороны, антропогенная деятельность приводит к выведению из глобального цикла углеродсодержащих веществ, а с другой — к возвращению углерода в круговорот путем добычи и потребления полезных ископаемых, т. е. их быстрой минерализации. О проблеме деструкции ксенобиотиков говорилось ранее.

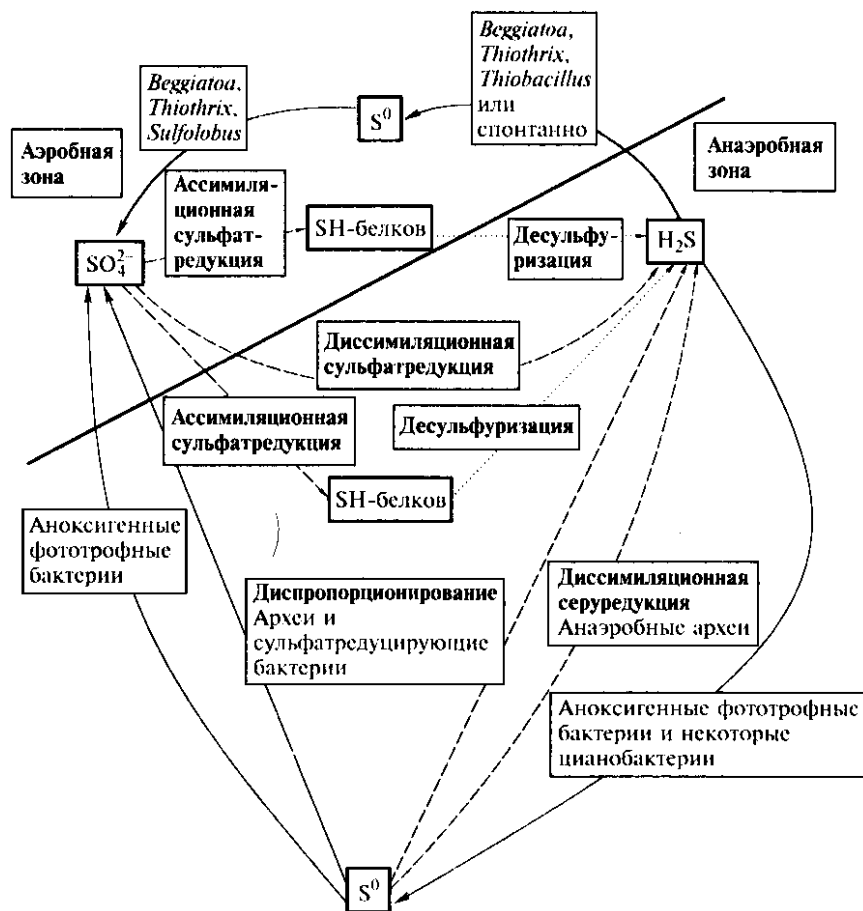


Рис. 170. Цикл серы (обозначения см. на рис. 168)

Молекулярный азот составляет 80 % по массе земной атмосферы, но большинству живых организмов азот доступен только в связанной форме. К фиксации молекулярного азота способны только микроорганизмы, без них *цикл азота* не мог бы замкнуться (см. рис. 169).

Глобальный *цикл серы* представлен на рис. 170.

Роль микроорганизмов в эволюции биосферы

Общая гипотетическая схема участия микроорганизмов в эволюции биосферы, отражающая глобальные события в развитии жизни на Земле, представлена на рис. 171. Событием колоссальной важности в истории нашей планеты явилось возникновение окислительного фотосинтеза, который кардинально изменил физи-

ко-химические условия земной атмосферы и привел к существенному накоплению органического вещества (рис. 172). Это подтверждается результатами целого ряда изотопных, биохимических и молекулярно-биологических исследований, а также обнаружением *микрофоссилий* (ископаемых остатков) нитчатых фототрофных микроорганизмов, в частности цианобактерий, возраст которых определяется 1,7 — 3,2 млрд лет. Сохранение ископаемых остатков этих микроорганизмов в течение столь длительного исторического времени объясняется уникальными свойствами их чехлов подвергаться мумификации, литификации и инкрустации соединениями кремния, кальция и т.д. Другими древними свидетельствами развития цианобактерий и циано-бактериальных сообществ являются *строматолиты* — слоистые осадочные породы, продук-

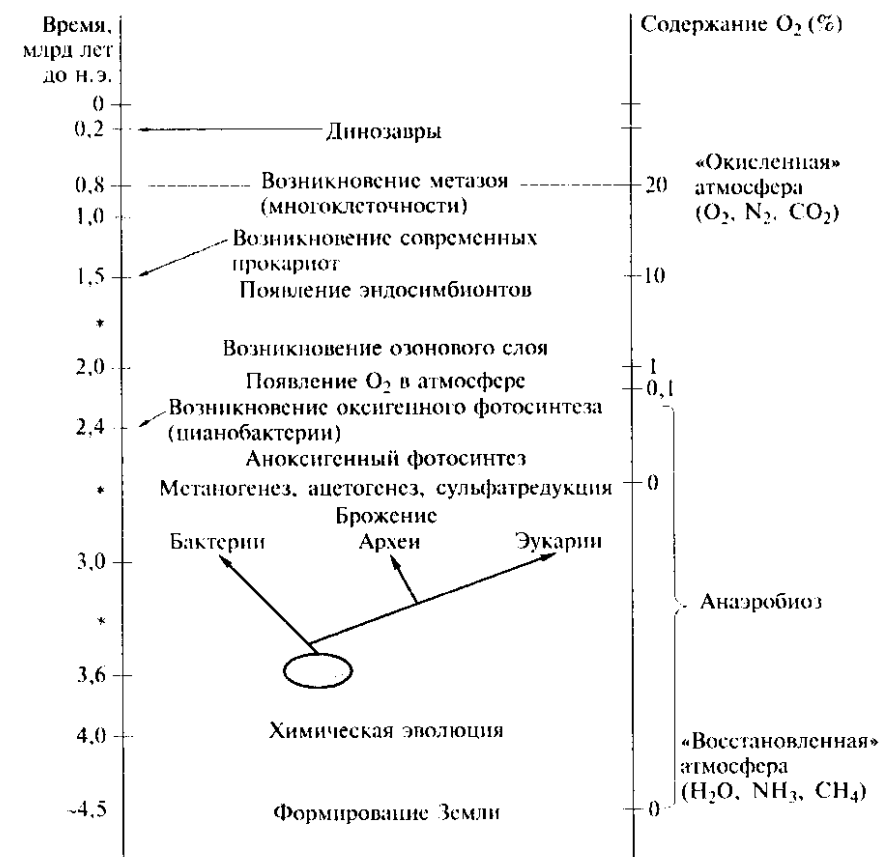


Рис. 171. Основные события в эволюции Земли и участие в них микроорганизмов (* — время, которым датируются самые древние ископаемые остатки прокариот)

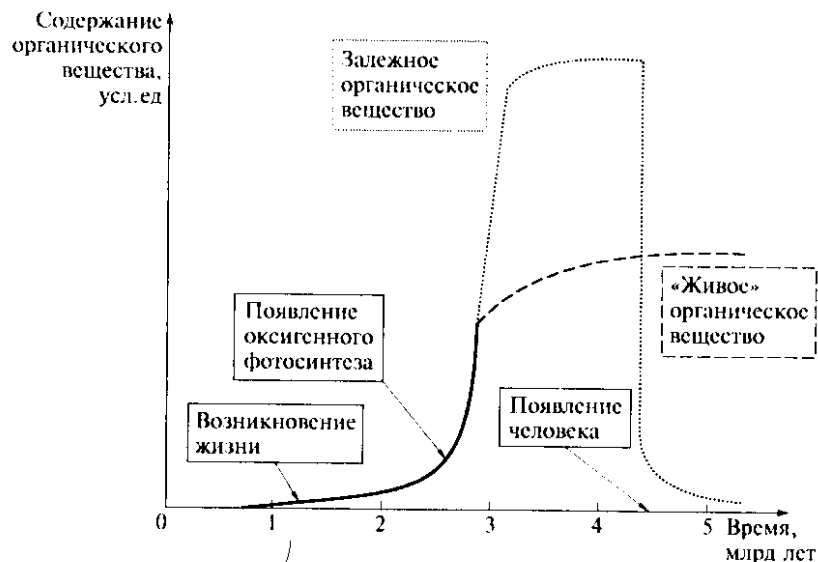


Рис. 172. Изменение содержания и соотношения форм органического вещества в эволюции биосферы

ты жизнедеятельности микроорганизмов, основанные на осаждении бикарбонатов. Образование строматолитов в настоящее время удается смоделировать в лабораторных условиях.

Активное воздействие человека на окружающую среду (развитие промышленности, сельского хозяйства, вырубка лесов, добыча и переработка полезных ископаемых) привело к значительному изменению соотношения залежного и «живого» органического вещества в глобальном масштабе (см. рис. 172).

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные методы исследования в экологии микроорганизмов.
2. Проанализируйте достоинства и недостатки известных методов определения количества клеток микроорганизмов.
3. Опишите основные преимущества и ограничения применения ПЦР для анализа природных образцов. Как идентифицировать почвенную бактерию без выделения в чистую культуру, применяя молекулярные методы?
4. Назовите возможные последствия интродукции в природные местообитания генетически модифицированных микроорганизмов.
5. Перечислите основные функции микроорганизмов в природе.
6. Каковы характерные черты микробных местообитаний? Назовите четыре типа микробных ниш в водных средах.

7. Назовите наиболее распространенные типы взаимоотношений микроорганизмов друг с другом. Приведите примеры синтрофных ассоциаций.

8. Опишите мутуалистические и паразитические симбиозы с участием микроорганизмов.

9. Что такое экологическая стратегия и как подразделяются микроорганизмы по отношению к этому показателю?

10. Как образуется и функционирует биопленка? Приведите пример биопленки макроскопического размера и опишите ее строение.

11. Перечислите особенности почвы как среды обитания для микроорганизмов.

12. От каких факторов зависит формирование того или иного типа почв? Какова роль микроорганизмов в этом процессе?

13. Назовите основные газы, вызывающие парниковый эффект, и опишите, как микроорганизмы участвуют в их образовании и потреблении. Что такое бактериальные газовые фильтры? Как человеческая деятельность влияет на образование и потребление парниковых газов?

14. Что такое ксенобиотики? Можно ли отнести к этой категории полезные ископаемые?

15. Почему необходимо бороться с загрязнением окружающей среды органическими соединениями? Какая группа живых организмов способна метаболизировать ксенобиотики и почему?

16. Какие химические процессы определяет термин «биodeградация»? Какую роль играют кометаболизм и синтрофия в разрушении устойчивых соединений?

17. Опишите роль гетеротрофов и автотрофов в каждом из основных циклов элементов на Земле (углерода, азота, серы).

18. Как деятельность человека влияет на «увод» и возвращение углерода в его глобальный цикл?

19. Что произойдет, если внезапно прекратится микробная азотфиксация?

20. Назовите наиболее значительные события в истории Земли, связанные с деятельностью микроорганизмов.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Сферы использования микроорганизмов

Свойства микроорганизмов, важные для человеческой практики, позволяют условно подразделить области действия микроорганизмов на две большие группы.

Первая группа включает области действия микроорганизмов, связанные с полезной (положительной) деятельностью микробов, **вторая группа** охватывает области действия, связанные с негативной (отрицательной) деятельностью по отношению к интересам человека.

К первой группе относятся:

- производство продуктов питания (квас, пиво, вино, спирт, уксус, хлеб, молочнокислые, заквашенные и соленые продукты, рыбные и мясные продукты ферментации);
 - производство микробного белка (пищевого и кормового) и пищевых добавок;
 - получение индивидуальных химических веществ (растворители, газы, ферменты, витамины, антибиотики, органические и аминокислоты, нуклеотиды, биополимеры, алкалоиды, стероиды, гормоны, токсины, стимуляторы роста растений и т.д.);
 - получение вакцин и препаратов для медицины, ветеринарии, сельского хозяйства;
 - выщелачивание металлов из руд;
 - очистка и переработка промышленных и бытовых отходов;
 - создание замкнутых систем жизнеобеспечения;
 - использование микроорганизмов в качестве тест-систем и биосенсоров;
 - использование микроорганизмов в качестве моделей и инструментов научных исследований.
- Вторую группу составляют такие процессы, как:
- порча пищевых продуктов;
 - микробная коррозия промышленных и бытовых объектов и материалов;
 - микробное загрязнение почвы, воды и атмосферы;
 - болезнетворность микроорганизмов для человека, животных и растений.

Пищевые производства, основанные на микробном метаболизме

Еще задолго до того, как были поняты механизмы микробного метаболизма, человек интуитивно научился использовать их в своей жизни. Давно известны способы выпечки хлеба, приготовления кваса, пива, вина. Например, у народов Севера с древних времен и до наших дней сохранился способ приготовления китового мяса, позволяющий им восполнять недостаток витаминов и аминокислот (сырое мясо заворачивают в шкуру и кладут под снег для «вызревания», происходит развитие микроорганизмов, образующих витамины, а также частичный гидролиз белка, дающий пептиды и аминокислоты).

Использование молочнокислых бактерий. Издавна люди готовили большое количество *продуктов из молока*. Эти продукты отлич-

Таблица 31

Некоторые кисломолочные продукты и микроорганизмы, применяемые при их изготовлении

Продукты	Микроорганизмы	Особенности
Ацидо-филин	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Подавляет развитие гнилостной микрофлоры
Кефир	<i>L. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp. — «кефирные зерна»	Продукт содержит до 1% этанола, подавляет развитие гнилостной микрофлоры
Кумыс	<i>L. bulgaricus</i> , <i>L. leichmanii</i> , <i>Torula</i> spp.	Изготавливается из кобыльего молока, содержит до 2% этанола, подавляет развитие гнилостной микрофлоры
Йогурт	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>	Изготавливается из коровьего молока низкой жирности, в продукт добавляют стабилизаторы типа желатина
Масло	<i>Lactococcus lactis</i>	Брожение помогает убрать белковую фракцию за счет кислотной денатурации и придает конечному продукту вкус, аромат и цвет
Бифидо-продукты	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Образуют ацетат и лактат, подавляют развитие гнилостной микрофлоры
Сыры	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Lactobacillus bulgaricus</i> . На поздних стадиях в зависимости от сорта — <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Brevibacterium</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp.	На начальной стадии молоко подвергается действию сычужного фермента реннина

чались вкусом, ароматом и питательными свойствами, зависящими от природы используемой закваски. Общим для таких процессов является образование большого количества молочной кислоты из сахара, что приводит к снижению pH и предотвращает развитие микроорганизмов, вызывающих негативные процессы. Некоторые основные продукты и применяемые при их изготовлении микроорганизмы приведены в табл. 31.

Молочнокислородное брожение применяется при приготовлении *квашеных овощей* и *кислой капусты*, а также при *силосовании кормов*. Образующаяся молочная кислота является в этих процессах естественным консервантом.

Еще одна область использования молочнокислых бактерий — *закваски для мясных и рыбных продуктов*. Так готовят некоторые сорта сосисок, колбасы типа салями, сервелат и различные рыбные блюда японской кухни. Исходные культуры в этих процессах — *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, на стадии созревания иногда *Aspergillus glaucus*.

Использование дрожжей. Для изготовления хлеба применяют специальные дрожжевые закваски. Все они относятся к *Saccharomyces cerevisiae*, но для хлеба, пива, кваса, вина, спирта в настоящее время используют разные *расы* дрожжей. Закваски для хлебопечения не должны содержать других микроорганизмов, должны активно расти на глюкозе с обильным газообразованием. В настоящее время для некоторых специальных сортов хлеба применяют добавки в хлебные закваски из пропионовокислых или молочнокислых бактерий.

Дрожжи являются основным действующим элементом в процессах приготовления алкогольсодержащих напитков (вина, пива и кваса). Такие продукты могут быть получены из различных растительных субстанций, которые содержат доступные углеводы.

Основные этапы приготовления *вина*:

1. Отжим винограда (белые и красные сорта).
 - 1а. Отделение отжимок (для белых и розовых вин).
2. Сбраживание сусла (дикими дрожжами) или предварительная пастеризация сусла и внесение специальных заквасок (*S. cerevisiae* var. *ellipsoides*). Брожение в течение 3—5 дней при температуре 20—28 °С. Конечная концентрация спирта от 10 до 12 %.
3. Сепарирование, охлаждение.
4. Дображивание (яблочно-молочнокислородное брожение под действием *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*). При этом происходит снижение кислотности вина.
 - 4а. Вторичное брожение (+ сахар, под давлением для игристых вин, + спирт, на воздухе для хересных вин).
5. Выдержка (формирование окончательного вкуса и букета).
6. Розлив (иногда после купаживания).

Вина подразделяют на сухие и сладкие. В сухих нет остаточных сахаров, а сладкие содержат разные количества свободного сахара. Содержание остаточного сахара определяется начальной концентрацией сахара в виноградном соке. Если взять сахара больше того количества, которое может переработаться в алкоголь, то когда концентрация спирта достигнет критической, ингибирующей рост дрожжей величины (~12 %), брожение прекратится и еще останется несброженный сахар. Существуют различные дополнения и модификации этого процесса. Например, для получения сладких десертных вин используют виноград, зараженный грибом *Botrytis cinerea*, обезвоженный, с повышенным содержанием сахара. Сок из него сбраживается специальными дрожжами, которые быстро перерабатывают глюкозу и не используют фруктозу, чем и обусловлена повышенная сахаристость такого вина. В настоящее время повысилось число сортов вин с внесением различных ароматических добавок, с принудительным нагнетанием CO₂ (искристые вина), с дополнительным внесением спирта (крепленые вина).

В приготовлении *пива* используют зерновые субстраты, содержащие много крахмала. Для образования спирта необходимы сахара, которые должны быть получены из крахмала путем гидролиза. Наиболее распространенные виды сырья для пива — ячмень, рис и кукуруза. Для Европы традиционно использование ячменя в соответствии с нижеприведенной схемой.

1. Замачивание и проращивание ячменя (получение солода с активированием амилаз).
2. Сушка солода (чем выше температура сушки — 110, 120 или 140 °С, тем темнее солод).
3. Размол солода и добавление к основной массе ячменя (~15 %).
4. Варка сусла (замачивание, осахаривание крахмала, добавление хмеля, кипячение).
5. Охлаждение, фильтрация и внесение дрожжей (специально отобранные пивные дрожжи *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis*, низового брожения — для лагерных сортов пива, верхового брожения — для крепких сортов пива типа эля).
6. Брожение (при температуре 12 °С — 7—10 дней, при 18 °С — 3—4 дня для эля).
7. Фильтрация, перегонка в танк на дображивание при температуре 4 °С от 7 до 60 дней (для лагерных сортов).
8. Розлив, «консервирование» (пастеризация, фильтрация, внесение бензоата, низина).

На бутылке обычно указывают количество градусов Баллинга (11°Б, 18°), что соответствует плотности сусла (содержанию в нем сахара до начала брожения). Если пиво получится «сухое», т.е. весь сахар сброжен в спирт (чего почти никогда не бывает), то содержание спирта в готовом продукте можно рассчитать, умножив цифру градусов Баллинга на коэффициент 0,575.

Для приготовления эля используют сусло более плотное и применяют верховые дрожжи, бродящие при более высокой температуре (18 °C), значительно быстрее и с обильным газовыделением. Пиво получается крепче, а дрожжи при брожении выносятся на поверхность в «шапку пива».

На Востоке сырьем для алкоголесодержащих напитков (сакэ) является рис, и тогда для гидролиза крахмала используется микробиологическая стадия — гриб *Aspergillus oryzae*, образующий амилазы. При этом происходит осахаривание и начинается спиртовое брожение, вызываемое *S. cerevisiae* var. *sake*. Брожение при изготовлении сакэ длится до 1 месяца, и конечная концентрация спирта в продукте может достигать до 18 %.

Американские индейцы, изготавливая алкогольные напитки из зерен кукурузы, используют собственную слюну, содержащую амилазы.

Более крепкие напитки получают отгонкой спирта из вина или пива и отличаются начальным субстратом и модификацией последующих операций. Например, *водки* получают дистилляцией спирта после сбраживания крахмала ржи, пшеницы, картофеля; *кукурузный виски (бурбон)* — отгонкой спирта после сбраживания кукурузы; *коньяк и бренди* — выдерживанием отогнанного виноградного спирта в дубовых бочках; *шотландский виски* — дистилляцией неохмеленной ячменной бражки. Разные виды крепких напитков отличаются по вносимым добавкам (например, *джин* — это водка из спирта, настоянного на ягодах можжевельника. *ликеры* содержат большое количество сахара и натуральные или синтетические ароматизаторы и т. д.).

Производство *спирта* может быть основано не только на использовании пищевых субстратов и отходов пищевых производств, но и на техническом сырье, способном подвергаться гидролизу, в том числе неферментативному, с образованием сахаров (например, на древесных опилках).

Использование уксуснокислых бактерий. Получение уксуса основано на способности уксуснокислых бактерий рода *Glucanobacter* осуществлять неполное окисление этанола в ацетат. Бактерии рода *Acetobacter* не используют, так как у них имеется замкнутый ЦТК и они осуществляют «переокисление» ацетата до H_2O и CO_2 . Промышленный процесс проходит в колонне с буковыми стружками, на которых закреплены клетки бактерий и через которые идет противоток кислорода и спирта. По типу субстрата, из которого получают уксус, он делится на столовый (из спирта), яблочный, виноградный (из соответствующих вин).

Использование биомассы микроорганизмов. Благодаря тому, что микроорганизмы быстро растут и содержат в клетках все необходимые питательные элементы, они сами могут быть *источником пищи* для человека и животных, а также *добавками* к основ-

ной диете. В качестве примеров можно привести белково-витаминный комплекс (БВК), биомассу хлореллы в замкнутых системах жизнеобеспечения, пекарские и кормовые дрожжи, биологически активную добавку (БАД) «Сплат» на основе *Spirulina platensis*. Развитие микробиологического производства пищевого белка сдерживается отсутствием дешевого и безопасного сырья для роста. Это могут быть либо отходы пищевых производств, либо керосиновые фракции нефти, природный газ или метанол. Пока же соевый белок обходится дешевле и более привычен.

Порча пищевых продуктов

Приготовление и консервирование пищи с помощью микробов и порча пищевых продуктов — это как бы две стороны одного процесса. Здесь важно, в какую сторону будет происходить развитие микробных сообществ, всегда присутствующих в самом продукте или в окружающей его среде. Пищевые продукты — очень хорошая питательная среда для различных микроорганизмов, при этом микробный рост отражается как на качестве самого продукта, так и на здоровье потребляющего его человека. Загрязнение продукта болезнетворными микробами может привести к заражению человека.

Сколько существует человечество, столько времени оно борется с порчей пищевых продуктов. Сначала использовали засолку для консервирования мяса и рыбы, приготовление сыров и кисломолочных продуктов. Копчение мяса и рыбы применяют до сих пор, хотя сначала это делали на интуитивном уровне. В 1857 г. Л. Пастер открыл новую эру в пищевой микробиологии, доказав, что именно микроорганизмы вызывают порчу продуктов. Его работы поставили изучение повреждения и сохранения пищевых продуктов на научную основу. Л. Пастер предложил использовать нагревание как фактор, предупреждающий развитие микробов в продукте (*пастеризация*).

Факторы, влияющие на процесс порчи продуктов. Будет ли портиться продукт и насколько быстро это произойдет, определяется широким разнообразием внешних и внутренних условий. Внутренние, присущие тому или иному виду продукта, факторы включают pH, влажность, доступность воды, Eh, структуру, доступность питательных веществ и возможное присутствие природных антимикробных агентов. Из внешних факторов наиболее важные — температура, относительная влажность воздуха, присутствие газов (CO_2 , O_2), тип и количество микроорганизмов.

В зависимости от состава питательных веществ в продукте развиваются те или иные процессы, приводящие к порче продукта и изменению его свойств, а также к преимущественному его заселению той или иной группой микроорганизмов. Некоторые примеры представлены в табл. 32.

Типичные продукты и эффекты, наблюдаемые при микробной порче определенных субстратов

Субстрат	Химические процессы	Продукты и эффекты
Пектин	Гидролиз пектина	Метанол, уоновые кислоты → потеря структуры овощей и фруктов. «мягкие гнили»
Белки	Протеолиз, дезаминирование	Аминокислоты, пептиды, амины, сероводород, аммиак, индол → появление горечи, прокисание, появление неприятных запахов, ослизнение
Углеводы	Гидролиз, сбраживание	Органические кислоты, CO ₂ , смеси спиртов → прокисание, сбраживание
Жиры	Гидролиз, деградация жирных кислот	Глицерол, смеси жирных кислот → прогоркание, появление горечи

Такие продукты, как хлеб, варенье и некоторые фрукты, в первую очередь поражаются грибами. Наоборот, продукты, содержащие большое количество белка и/или жиров (например, мясо или масло), подвергаются прежде всего действию бактерий. Такая порча приводит обычно к возникновению неприятных запахов, за которые ответственны амины типа кадаверина («трупный яд») и путресцина («гниющий»). Низкий pH продукта вызывает развитие дрожжей и плесеней, нейтральный и щелочной — бактерий.

Наличие и доступность воды также влияет на способность микроорганизмов колонизировать продукт. Простейшие способы предохранения продукта от заражения — это сушка, копчение, вяление, а также внесение больших количеств соли и сахара. При приготовлении мясных продуктов, в частности бульонов, часто снижается окислительно-восстановительный потенциал. Такие продукты, содержащие доступные аминокислоты, пептиды и факторы роста, являются идеальной средой для роста анаэробов, включая клостридий.

Физическая структура пищи оказывает большое влияние на процесс порчи продукта. Измельчение, нарезание и смешивание продукта, например в соусах, салатах, котлетах, не только увеличивает его поверхность и меняет клеточную структуру, но также способствует внесению извне дополнительных микробов и распределению их в толще продукта. Это приводит к ускорению порчи и снижению срока хранения продукта.

Из натуральных антимикробных агентов можно назвать *кумарины* в овощах и фруктах, *лизоцим* в яйцах, *фитонциды* в луках,

жгучие вещества в острых приправах, *полифенолы* в черном и зеленом чае.

Высокая относительная влажность окружающего воздуха способствует быстрому микробному росту даже при пониженных температурах. Важна атмосфера, в которой хранится пища. CO₂ может понижать pH растворов, ингибируя микробный рост. Хранение мяса при высоком содержании углекислоты замедляет рост грамотрицательных бактерий.

В качестве примеров порчи продуктов можно привести многочисленные случаи, когда на влажном зерне и продуктах из него вырастают *плесени*. Заражение зерна аскомицетом *Claviceps purpurea* вызывает эрготизм за счет отравления галлюциногенными алкалоидами этого гриба, которые приводят к изменению поведения человека, выкидышам и смерти. Канцерогенными свойствами обладают продукты других грибов — афлатоксины (*Aspergillus flavus*) и фумонизины (*Fusarium moniliforme*). Такие грибы могут развиваться на арахисе, в молоке, пиве, какао, на изюме и сое.

Непастеризованное молоко в процессе порчи проходит четыре этапа:

- 1) развиваются бактерии рода *Lactococcus*, образующие кислоту;
- 2) начинают расти более ацидотолерантные *Lactobacillus*;
- 3) доминируют дрожжи и плесневые грибы, расщепляя накопившийся лактат, т.е. кислотность снижается;
- 4) активизируются гидролизующие белок бактерии, что приводит к появлению гнилостного запаха и горького вкуса. При этом изменяется цвет молока — белый на почти прозрачный (дептонизация белка).

Большинство фруктов и овощей портится по другому «сценарию». Углеводы легко расщепляются бактериями, особенно вызывающими «мягкие гнили», например *Erwinia carotovora*, образующей гидролазы. Высокий окислительно-восстановительный потенциал способствует развитию аэробов и факультативных анаэробов. Однако начальный этап порчи связан скорее с плесневыми грибами, имеющими ферменты для разрушения оболочек (кожицы) овощей и фруктов и проникновения под кожу.

Минимально обработанные натуральные замороженные цитрусовые продукты обычно поражаются *Lactobacillus* и *Leuconostoc*, которые образуют диацетил и дают горький привкус. Разведенные соки поражаются дрожжами родов *Saccharomyces* и *Candida*. Иногда применяют пастеризацию, но органолептические свойства соков при этом могут ухудшаться.

Порча консервов может происходить из-за нарушения технологического процесса или при повреждении упаковки. При этом меняются цвет, текстура, запах и вкус продукта, образуются органические кислоты, сульфиды и газы (в основном CO₂ и H₂S). Банки раздуваются («бомбаж»). Иногда развитие анаэробных микро-

организмов рода *Clostridium* может привести к образованию сильнейшего нейротоксина (*ботулина*), вызывающего в очень малых дозах сначала слепоту, а затем и смерть человека. Через испорченные продукты в организм могут попадать и сами болезнетворные микроорганизмы (например, бактерии кишечной группы).

Методы защиты продуктов от порчи. Таких методов достаточно много, и их используют, исходя из свойств самого продукта, поражающих его организмов и стоимости. Из воды, вин, пива, соков, напитков и других жидкостей микроорганизмы могут быть удалены *фильтрацией*, при этом не изменяются физические и вкусовые качества продукта. Задержка микробного роста может быть осуществлена снижением температуры или *замораживанием*. При этом надо учитывать тот факт, что преимущества в росте получают психрофильные микроорганизмы, которые также могут портить продукты. Использование повышенных температур возможно в двух модификациях — это *пастеризация* (нагревание до температуры менее 100 °С, избавляющее от вегетативных клеток) и *стерилизация* (нагревание при повышенном давлении до температуры более 100 °С, избавляющее от всех форм живых организмов). В настоящее время применяют также *лиофилизацию* продуктов, что позволяет существенно увеличить сроки их хранения.

Химические агенты, предотвращающие порчу продуктов, относятся к простым органическим кислотам, сульфитам, оксиду этилена, нитритам и этилформату. Каждый из них действует на какую-нибудь мишень в клетке, разрушая ее (например, ЦПМ). Эффективность этих веществ зависит от pH продукта. Например, лактат и пропионат действуют лучше при пониженном pH, когда они находятся преимущественно в недиссоциированной форме. В настоящее время большой популярностью стал пользоваться антибиотик *низин*, образуемый молочнокислыми кокками. Это полипептидный нетоксичный антибиотик, влияющий в основном на грамположительные бактерии, а именно на проницаемость их цитоплазматической мембраны.

Радикация применяется для контроля популяции микроорганизмов в продуктах питания в двух видах: ультрафиолет убивает микробы на поверхности, а γ -излучения — внутри.

Детекция микробного загрязнения. В заключение следует кратко остановиться на обнаружении микробного загрязнения продуктов питания. На допустимые количества той или иной группы микроорганизмов в конкретном продукте существуют разработанные гостированные документы. Обычно такими анализами занимаются специальные *сертификационные лаборатории*. По утвержденной схеме там проводят определение в продукте общего числа микробных клеток, отдельно грибных и дрожжевых, количества бактерий кишечной группы, а также *санитарно-показательных микроорганизмов* (*E. coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Proteus* и т.д.).

Если санитарно-показательные микроорганизмы присутствуют, то это указывает на загрязнение продукта землей или испражнениями, в которых могут быть болезнетворные микроорганизмы. При необходимости проводят полный анализ на присутствие таких организмов (сальмонеллы, шигеллы, гемолитические стафилококки, *C. botulinum*). Такие продукты не получают сертификата соответствия и в продажу не выпускаются.

Приблизительно теми же принципами руководствуются, проверяя *пригодность воды, воздуха и почвы* для человека, при этом нормы содержания микроорганизмов зависят от местности и, естественно, имеют другие значения, чем для продуктов. Применяются и другие способы забора проб (см. гл 11).

Болезнетворные микроорганизмы

Рассмотрим негативное влияние микроорганизмов на здоровье человека, животных и растений. Необходимо иметь в виду, что развитие болезни — это обоюдный процесс, в котором не последнюю роль играет подвергшийся инфицированию макроорганизм. Болезнетворные микроорганизмы имеются среди вирусов, бактерий, грибов и простейших. Определение инфекционного агента проводится, как правило, по стандартной схеме с использованием *дифференциально-диагностических сред* и биохимических тестов. В настоящее время эта идентификация упрощена, так как разработаны тест-наборы для экспресс-методов, а также выпускаются готовые индикаторные среды.

Болезнетворные микроорганизмы обладают свойством вызывать болезнь (*патогенность*). Основными факторами патогенности являются факторы адгезии, обеспечивающие прикрепление к клеткам макроорганизма; факторы колонизации, способствующие размножению и расселению на поверхности клетки-хозяина; факторы инвазии, позволяющие проникать внутрь клетки; защитные факторы, уменьшающие фагоцитоз и обеспечивающие молекулярную мимикрию; факторы агрессии (ферменты, токсины), разрушающие иммунную систему хозяина и ослабляющие макроорганизм. Степень патогенности называется *вирулентностью*, а антагонистические взаимоотношения паразита и хозяина — *инфекцией*. Система, обеспечивающая устойчивость макроорганизма к агрессии паразита, носит название *иммунитета*.

Человечество научилось успешно бороться со многими инфекционными заболеваниями, однако микроорганизмы также видоизменяются под действием факторов окружающей среды и под прессингом лечебных препаратов. Возникла *множественная лекарственная устойчивость*, и многие «побежденные» болезнетворные микробы появились вновь в другой, более опасной форме (при-

меры — *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, вирус черной оспы). В настоящее время появились и совершенно новые, неизвестные ранее смертельные инфекции (СПИД, птичий грипп и т.д.). В то же время у людей наблюдается заметное снижение иммунного статуса из-за неблагоприятных условий внешней среды, некачественного питания и нервных стрессов.

Болезни по продолжительности инфекционного процесса подразделяют на *быстрые* (острые) и *медленные* (хронические) с периодическими обострениями. В первом случае организм хозяина либо погибает, либо побеждает паразита (часто с помощью лекарств). Иногда встречается и длительное носительство паразита без проявления симптомов болезни. Инфекционный агент быстро распространяется в популяции хозяев. Второй случай характеризуется наличием вялотекущего инфекционного процесса иногда в течение всей жизни организма-хозяина. Макроорганизм не погибает и не выздоравливает, однако, его иммунный статус постоянно понижен. Последние данные указывают на то, что многие болезни, ранее не считавшиеся инфекционными, вызываются микроорганизмами (например, язва желудка и двенадцатиперстной кишки — *Helicobacter pylori*).

Микробиологические процессы получения соединений различного назначения

Вещества микробного происхождения для диагностики и лечения заболеваний. К соединениям, получаемым с помощью микроорганизмов и служащим для диагностики и лечения различных заболеваний, относятся *антибиотики*, а также различные *анти-микробные агенты* (вакцины, сыворотки, антитела, интерферон, многие ферменты и т.д.). Основные продуценты таких веществ представлены в табл. 33.

В качестве продуцентов используются как микроорганизмы, выделенные из естественных мест, так и мутанты и искусственно «сконструированные» штаммы. Одни процессы являются чисто

Таблица 33

Вещества для медицины и их продуценты

Субстанция	Микроорганизмы
Антибиотики	<i>Penicillium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Bacillus</i>
Алкалоиды	<i>Claviceps purpurea</i>
Стероиды	<i>Rhizopus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Mycobacterium</i>
Инсулин, соматостатин, интерферон, другие человеческие гормоны	<i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Pichia pinus</i> и другие рекомбинантные штаммы

микробиологическими, другие — содержат микробиологический этап только как одну из фаз производства (яркий пример — трансформация с помощью микробов молекул стероидов).

Для получения вакцин, сывороток и препаратов для животноводства и сельского хозяйства используются как живые ослабленные или видоизмененные возбудители, так и убитые клетки, либо их отдельные части (антигены), которые вводятся во время прививки в здоровый организм, чтобы с профилактической целью научить его вырабатывать антитела. *Вакцина* — это собственно возбудитель (антиген), а *сыворотка* — полученные на антиген готовые антитела, вводимые уже заболевшему человеку или животному для быстрого ответа на инфекцию.

Несколько другую стратегию применяют для *защиты сельскохозяйственных растений*. Микроорганизмы-антагонисты фитопатогенных грибов либо вносят в почву, либо обрабатывают ими семена и корни высаживаемых растений. Проблема состоит в том, что в лабораторных условиях и в природной обстановке активность таких препаратов существенно различается, так как попадая в почву, интродуцированные микроорганизмы поневоле вступают в самые разные отношения с резидентной микробиотой почвы. В настоящее время бурно развивается направление по борьбе с вредителями сельского хозяйства биологическими методами. Микробиологическая часть этих методов включает применение бактерий и грибов, вырабатывающих *энтомопатогенные субстанции* (например, белковые кристаллы *Bacillus thuringiensis*), и заражение микробами-возбудителями инфекционных болезней насекомых и грызунов, опасных для других членов экосистемы и человека.

Получение индивидуальных веществ микробиологическим способом. Микробиологические процессы играют огромную роль при получении индивидуальных веществ разного назначения (табл. 34). С помощью микроорганизмов получают также вещества для научных исследований (НАДН, НАДФН, цитохромы, убихиноны, пигменты и т.д.).

Таблица 34

Некоторые индивидуальные соединения, получаемые с помощью микроорганизмов

Продукты	Микроорганизмы
Растворители	
Этанол	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
Ацетон, бутанол, изо-пропанол	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
2,3-бутандиол	<i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i>

Продукты	Микроорганизмы
Газы	
Водород	Фотосинтезирующие микроорганизмы
Метан	<i>Methanobacterium</i>
Органические кислоты	
Ацетат	<i>Acetobacter, Gluconobacter</i>
Цитрат	<i>Aspergillus niger</i>
Фумарат	<i>Rhizopus nigricans</i>
Глюконат	<i>Aspergillus niger</i>
Лактат	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Аминокислоты	
Глутамат, лизин	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Нуклеотиды	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Витамины	<i>Ashbya, Eremothecium, Blakeslea, Pseudomonas, Saccharomyces, Propionibacterium</i>
Полимеры	
Декстран	<i>Klebsiella, Acetobacter, Leuconostoc</i>
Ксантан	<i>Xanthomonas campestris</i>
Пулдулан	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Альгинат	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Полиэфир	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
Циклодекстрины	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.
Полн-β-гидроксипутират	<i>Azotobacter</i> sp., <i>Alcaligenes eutrophus</i>
Ферменты	
Амилазы, протеазы	<i>Aspergillus, Bacillus, Mucor, Trichoderma</i>
Пектиназы	<i>Erwinia</i>
Липазы	Дрожжи, <i>Rhizopus</i> sp.
Оксидазы:	
Глюкозооксидаза	<i>Penicillium</i> sp.
Глутаматоксидаза	<i>Streptomyces</i> sp.
Лактатоксидаза	<i>Geothrichum</i> sp.
Стимуляторы роста растений	
Гиббереллины	<i>Gibberella</i> sp.
Другие соединения	
Акриламид	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>

Пути совершенствования микробиологических производств

Продуценты. Для биотехнологических целей все больше используют мутантные и генетически измененные (клонированные) микроорганизмы. Например, для получения индивидуальных органических и аминокислот применяют *регуляторные мутанты*, что позволяет накапливать интермедиаты различных циклов (например, ЦТК).

Внедрение молекулярно-биологических методов в биотехнологию позволило получать продуценты с измененными свойствами и производить уникальные субстанции в промышленных масштабах: высокотермостабильные ферменты, искусственно сконструированные пептиды и белки, человеческие терапевтические агенты — инсулин, интерфероны, эпидермальный фактор роста, фактор коагуляции, поверхностный антиген вируса гепатита В, иммуностимуляторы и т. д.

Внедряются новые методы *селекции* продуцентов, их поддержания в активном состоянии и *хранения*. Например, для получения активных продуцентов у дрожжей и плесневых грибов применяют метод *слияния протопластов*, когда после удаления клеточной стенки и воздействия полиэтиленгликоля клеточная мембрана частично растворяется и может произойти слияние протопластов двух штаммов и последующая рекомбинация генетического материала. После регенерации клеточной стенки микроорганизм будет иметь другие свойства. Такие микроорганизмы менее стабильны, чем «дикие», поэтому необходимо применять соответствующие методы сохранения их активности. Из относительно новых можно назвать лиофилизацию и хранение под жидким азотом.

Новые технологические подходы. Другой путь совершенствования микробиологических процессов — разработка новых технологических подходов. При этом разрабатываются более совершенные аппараты для культивирования, процесс становится полностью автоматизированным и компьютеризированным.

Один из технологических приемов — *иммобилизация* клеток и/или ферментов на(в) твердом носителе. В зависимости от природы носителя и механизма прикрепления иммобилизация бывает нескольких видов (рис. 173). Возможно также сочетание нескольких видов иммобилизации. Необходимо помнить, что иммобилизация — это не просто изменение пространственного положения продуцента для удобства работы с ним, но и значительные преобразования его жизнедеятельности за счет изменения свойств поверхностных структур клетки (в частности, ЦПМ) и образования новой поверхности раздела фаз. Примеры некоторых производственных процессов, основанных на использовании закрепленных клеток, приведены в табл. 35.

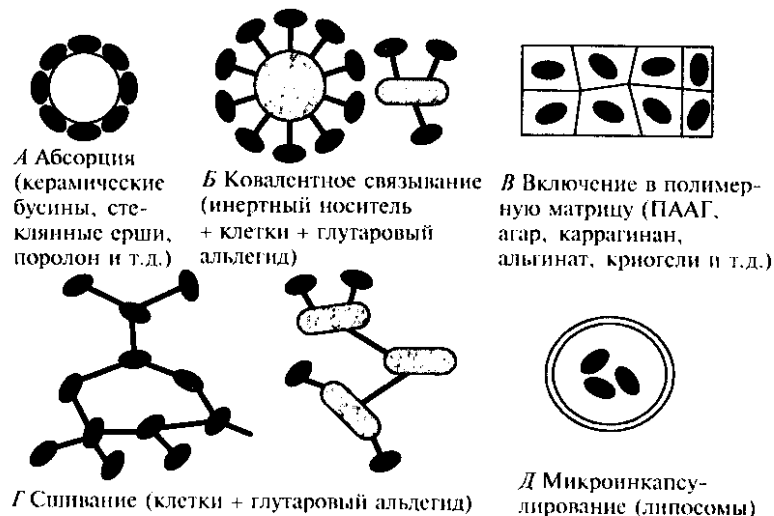


Рис. 173. Виды иммобилизации:

А, Д — физические; Б, Г — химические; В — физико-химический

Таблица 35

Производственные процессы, основанные на использовании иммобилизованных клеток

Процесс	Продукт или активность	Микроорганизмы
Производство антибиотиков	Пенициллин	<i>Penicillium chrysogenum</i>
	Бацитрацин	<i>Bacillus</i> sp.
	Цефалоспорины	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Производство аминокислот	L-аланин	<i>Corynebacterium dismutans</i>
	L-глутамат	<i>C. glutamicum</i>
	L-триптофан	<i>E. coli</i>
	L-лизин	<i>Microbacterium ammoniaphila</i>
Производство ферментов	Кофермент А	<i>Brevibacterium ammoniagenes</i>
	Протеаза	<i>Streptomyces fradiae</i>
Производство витаминов	Пантотеновая кислота	<i>E. coli</i>
Трансформация стероидов	Преднизолон	<i>Curvularia lunata</i> , <i>Corynebacterium simplex</i>
Производство продуктов брожения	Этанол	<i>S. cerevisiae</i>
	Лактат	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Очистка окружающей среды	Расщепление паранитрофенола	<i>Pseudomonas</i> spp.
	Расщепление фенола	<i>Candida tropicalis</i>
	Денитрификация	<i>Micrococcus</i> spp.
	Сорбция тяжелых металлов (уран, плутоний)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Этапы разработки и функционирования биотехнологического производства. Общая схема стадий развития и поддержания промышленного микробиологического процесса выглядит следующим образом:

- лабораторные исследования;
- поддержание продуцента в активном состоянии. Селекция сверхпродуцентов (микробиологическая лаборатория завода);
- масштабирование процесса;
- очистка продукта;
- борьба с изменениями продуцента (фаголизис, диссоциация, нестерильность).

Микробиологическая очистка сточных вод и переработка отходов

Использование биологической активности для удаления загрязняющих веществ из окружающей среды называют *биоремедиацией*. Для успеха таких процессов необходимо сначала найти соответствующую активность, а затем разными методами ее стимулировать и создать по возможности оптимальные условия для ее проявления. При этом есть две возможности: 1) стимулировать развитие активных микроорганизмов, уже имеющихся в окружающей среде; 2) интродуцировать в загрязненную область микроорганизмы с уже известными биодegradабельными способностями. Такая интродукция в большинстве случаев не бывает успешной, так как для лабораторно полученных штаммов в природе не всегда можно создать оптимальные условия проявления их активности и, как правило, они менее конкурентоспособны, чем резидентная микробиота данного места. В искусственных очистных сооружениях значительно больше возможностей применять селектированные штаммы или сообщества, в том числе и генно-инженерные.

Метаболические возможности микроорганизмов позволяют воздействовать даже на необычные, искусственно созданные субстанции, и при этом еще давать полезные продукты (газы, металлы, растворители и т.д.).

Дегградация ксенобиотиков может происходить различными путями в зависимости от химической структуры разрушаемого вещества, наличия тех или иных биологических активностей, а также в зависимости от условий окружающей среды. Химическая природа ксенобиотиков чрезвычайно разнообразна: это линейные и разветвленные алканы и алкены, ароматические соединения с различными заместителями, гетероциклы, конденсированные циклические структуры и полимеры.

В настоящее время активно разрабатываются и используются аэробные технологии, однако в них есть ряд «подводных камней». Во-первых, некоторые сложные ксенобиотики на воздухе полимеризуются в трудноразлагаемые вещества (например, 5-аминосалициловая кислота); во-вторых, продукты аэробной деградации часто более токсичны, чем исходные загрязнители.

Существенными недостатками аэробных технологий, особенно при их применении для обработки концентрированных сточных вод, являются высокие энергозатраты на аэрацию и проблемы, связанные с обработкой и утилизацией большого количества образующегося избыточного ила, имеющего очень низкую водоотдающую способность.

Использование повсеместно применяемого способа — длительной естественной сушки на иловых площадках — приводит к отчуждению значительных территорий, а также к ухудшению экологической обстановки.

Аэробные методы обработки сточных вод, загрязненных некоторыми полициклическими и ароматическими соединениями, крайне неэффективны. К тому же ароматические соединения понижают поверхностное натяжение водных растворов и, следовательно, могут являться причиной неконтролируемого пенообразования в аэрируемых водоемах, а некоторые ароматические соединения летучи и токсичны и могут вызывать проблемы с загрязнением воздуха при аэробном методе очистки.

В 80-е годы XX в. считалось, что органические соединения, содержащие ароматические и конденсированные циклические структуры, в анаэробных условиях микроорганизмами не используются. Недавние исследования выдвинули на первый план способность анаэробных микроорганизмов к разрушению таких веществ и убедительно показали возможность осуществлять полную минерализацию ксенобиотиков в анаэробных условиях. Когда такой процесс проводит не индивидуальный микроорганизм, а структурированная микробная ассоциация, это позволяет увеличить эффективность и глубину деградации в анаэробных условиях, а также получить полезные конечные продукты (например, биогаз в метаногенном сообществе). При этом не происходит значительного накопления биомассы микроорганизмов.

На одинаковых принципах основаны *выщелачивание металлов из бедных руд* и извлечение их из различных отходов. Еще один аспект — создание *замкнутых систем жизнеобеспечения*, когда продукты жизнедеятельности перерабатываются, являясь питательным субстратом для микроорганизмов, производящих пищевой и кормовой белок и кислород для дыхания. Естественно, такие системы содержат различные физиологические группы микроорганизмов (фототрофы, гидролитики, бродильщики, метилотрофы, метаногены и т.д.). Это полезная сторона биодegradации.

Биокоррозия промышленных и бытовых объектов и материалов

Так называемые *биоповреждения* различных объектов и материалов основаны как на непосредственной активности микроорганизмов, так и на агрессивных продуктах их жизнедеятельности. Большая проблема в нефтедобыче и производстве нефтепродуктов — биокоррозия трубопроводов и порча самого топлива. При транспортировании нефти по трубам на их внутренней поверхности образуется прочная пленка микроорганизмов, с одной стороны, часто механически мешающая потоку, а с другой — повреждающая трубы из-за выделения серной кислоты микробами, окисляющими серу, содержащуюся в сырой нефти, и из-за выделения сульфатредуцирующими бактериями сероводорода, вступающего в реакцию с железом. В то же время и сама нефть, и нефтепродукты могут использоваться многими микроорганизмами, что изменяет химическую структуру этих веществ. Это представители грибов, в частности, дрожжей, псевдомонады, микобактерии и многие другие. Часто рост возможен на поверхности раздела фаз «вода — углеводород», что бывает в хранилищах нефтепродуктов. Так растет, например, *Cladosporium resinae*, называемый керосиновым грибом. Для борьбы с биокоррозией используют прежде всего сильнодействующие химические вещества — *биоциды*, различные присадки, замену металлических труб на более инертные пластиковые, облучение и механическую очистку труб и хранилищ. Необходимо только помнить, что все биоциды — это очень ядовитые вещества, экологически опасные.

Еще один пример биокоррозии — порча произведений искусства и памятников. Микробы химически изменяют краски, особенно содержащие натуральные компоненты, а также каменные сооружения за счет выделения агрессивных продуктов (кислот, щелочей) и образования микротрещин при механическом внедрении микробных тел, в основном, гиф грибов. Для борьбы используют различные ингибиторы, полимерные покрытия и соблюдение режима хранения (постоянная температура, минимальная влажность, бескислородные условия и т.д.).

Одна из современных проблем — микробное загрязнение в электронной индустрии. Во время производства микроорганизмы могут попадать на компьютерные чипы, уменьшая адгезию покрытий, что снижает время жизни транзисторов. Конечно, в производстве применяют бидистиллированную, свободную от растворенных органических веществ и микроорганизмов воду, однако даже такая вода способна поддерживать микробный рост, так как олиготрофные микроорганизмы могут расти при очень низких уровнях питательных веществ, вымытых из пластика трубок или

адсорбированных из воздуха. Даже при использовании мембранных фильтров может сохраниться микробное загрязнение из-за присутствия мини-клеток, способных проходить через фильтр с размерами отверстий 0,22 мкм.

Микроорганизмы — инструменты научных исследований

Микроорганизмы могут использоваться в качестве *биосенсоров и других научных инструментов*. Биосенсор — это гибридный прибор, где живые организмы (органеллы, ферменты) связаны с электродами, и биологическая реакция конвертируется в электрический ток. Биосенсоры применяют при определении различных индивидуальных веществ, поллютантов, контроля газов и жидкостей в медицине, сельском хозяйстве, экологических исследованиях и различных производствах. Примером может служить биосенсор для определения загрязнения (токсичности) на основе *люциферазной системы* светящихся бактерий.

Использование микроорганизмов как научного инструмента при моделировании фундаментальных жизненных процессов обусловлено, с одной стороны, их малыми размерами, быстрым размножением, одноклеточностью и относительной простотой устройства, а с другой — тем, что это полноценные организмы с широчайшим набором возможностей метаболизма и условий существования, а также способностью к «конструированию».

Контрольные вопросы

1. Перечислите полезные для человека микробиологические процессы. Какие из них были известны задолго до открытия их микробиологической природы?
2. Назовите пищевые продукты, получаемые микробиологическим путем. Какие группы микроорганизмов применяют при их изготовлении?
3. Почему микробная биомасса может служить источником пищи для человека и животных?
4. Проанализируйте факторы, влияющие на процесс порчи продуктов в обычном бытовом холодильнике, и опишите возможные пути порчи мяса, рыбы, сыра, салата и свежих овощей.
5. Предложите методы защиты от порчи для фруктового сока, молока, пирожных с кремом, ветчины.
6. О чем свидетельствует наличие в пробе продукта санитарно-показательных микроорганизмов?
7. Перечислите факторы патогенности болезнетворных микроорганизмов. Какой тип симбиоза возникает при развитии болезни?

8. Чем отличается стратегия защиты от патогенных микроорганизмов животных и сельскохозяйственных растений?

9. Назовите возможные пути совершенствования микробиологических производств.

10. Какие факторы влияют на успех биоремедиации?

11. Проанализируйте достоинства и недостатки аэробных и анаэробных микробных технологий для очистки сточных вод от органических соединений. Для каких соединений анаэробная деградация является предпочтительной?

12. Назовите микробные активности и продукты жизнедеятельности микроорганизмов, имеющие значение при повреждении различных материалов и объектов. Попробуйте описать процесс биокоррозии деревянного дачного дома на железобетонном фундаменте. Какую роль могут играть в этом процессе разные группы микроорганизмов?

КРАТКИЙ СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОКАРИОТ

Общие понятия

В настоящее время в активном развитии находится *филогенетическая система* классификации микроорганизмов, которая, с одной стороны, будет учитывать все родственные связи и опираться на эволюционные представления, а с другой — будет удобна для практической микробиологии и позволит быстро найти место конкретного микроорганизма в мире микробов. Пока же пользуются во многом искусственной *морфофизиологической классификацией* с некоторыми элементами молекулярно-генетического подхода. Основы такой классификации заложил профессор бактериологии Д. Берджи (D. Bergey) в 1923 г., и сейчас выходит в свет второе издание книги «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (выпущены первые два тома). Для практической идентификации микроорганизмов-прокариот применяют девятое издание определителя, выпущенное Комитетом Берджи.

Все прокариотические микроорганизмы в книге «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» разбиты на основании их происхождения и родства на группы, иногда не имеющие четкого таксономического статуса, называемые филумами (Phylum), или филогенетическими группами (линиями). Типичная иерархия таксонов приведена в табл. 36.

Таблица 36

Иерархия таксонов (кроме Cyanobacteria и Actinobacteria)

Таксон	Пример
Домен	Bacteria
Филум	Proteobacteria
Класс	Alphaproteobacteria
Порядок	Legionellales
Семейство	Legionellaceae
Род	<i>Legionella</i>
Вид	<i>Legionella pneumophila</i>
Подвид	<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>

Выше было отмечено, что по современным представлениям все живое разделено на три домена (империи): Archaea (прежде — Archaeobacteria), Bacteria (Eubacteria) и Eukarya (Eukaryotes). Ниже перечислены группы, относящиеся к прокариотическим организмам, и приведены некоторые представители этих групп.

Домен Archaea

Филум A1. Crenarchaeota. Морфологически разнородная группа, включающая палочки, кокки, нитчатые формы, дисковидные клетки. По Граму красятся негативно. Некоторые подвижны. облигатные термофилы, температурный интервал роста 70—113 °С. Ацидофилы. Аэробные, факультативные или строго анаэробные хемолитоавтотрофы или хемотротрофы. Большинство использует в метаболизме S°. Хемотротрофы могут расти за счет серного дыхания.

Филум включает один класс Thermoprotei из трех порядков — I. Thermoproteales (роды *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Thermofilum*); II. Desulfurococcales (рода *Desulfurococcus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*); III. Sulfolobales (рода *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Sulfurococcus*).

Филум A2. Euryarchaeota. Морфологически разнообразные микроорганизмы: палочки, кокки, неправильные кокки, ланцетовидные, спиральные, дисковидные, треугольные и квадратные клетки. Клеточные стенки с псевдомуреином, белковые или полностью отсутствуют.

Филум разделен на семь классов.

Классы Methanobacteria, Methanococci, Methanopyri (метаногенные археи) включают строгие анаэробы, образующие метан из H₂/CO₂, формиата, ацетата, метанола, метиламинов и H₂/метанола. При λ = 420 нм флуоресцируют сине-зеленым светом. Клетки содержат коферменты M, B, F₄₂₀, F₄₃₀, метанофтерин, метанофуран. Могут восстанавливать элементарную серу в сероводород без получения энергии.

Экстремально галофильные археи объединены в класс Halobacteria. Это аэробные или факультативно анаэробные хемотротрофы, требующие для роста высоких концентраций NaCl (1,5M и выше). Палочки и кокки, окрашивающиеся грамварианельно. Нейтрофилы или алкалофилы. Рост мезофильный или слабо термофильный (до 55 °С). Содержат бактериородопсин и используют энергию света для синтеза АТФ.

Класс Thermoplasmata включает археи, лишенные клеточной стенки. Это термоацидофильные, аэробные организмы, имеющие коккоидные клетки, ЦПМ которых содержит богатый маннозой гликопротеин и липогликан. У представителей рода *Thermoplasma* ДНК конденсирована в нуклеосомы с гистонотипными белками.

ми. При высокой температуре клетки имеют вид неправильных филаментов, а при пониженной приобретают сферическую форму и могут иметь жгутики. Неправильные кокковидные клетки рода *Picrophilus* формируют на поверхности белковые S-слои.

Сульфатредуцирующие археи объединены в класс Archaeoglobi и являются строгими анаэробами, способными к диссимиляционной сульфатредукции. Образуют также следовые количества метана. Экстремальные термофилы (рост при температуре более 92 °C). Обладают сине-зеленой флуоресценцией при $\lambda = 420$ нм. Имеют в клетках коферменты F₄₂₀ и метаноптерин.

Класс Thermococci содержит строго анаэробные облигатные термофилы. Кокки неправильной формы, окрашивающиеся по Граму отрицательно. Оптимум роста наблюдается при температуре 67—103 °C. Гетеротрофы, некоторые для роста используют элементарную серу.

Домен Bacteria

Филум B1. Aquificae. Это древняя ветвь бактерий, объединяющая грамотрицательные, неспорообразующие палочки или нити. Термофилы с оптимумом роста при температуре 65—85 °C. Метаболизм хемолитоавтотрофный или хемоорганотрофный. Многие виды способны расти анаэробно за счет нитратредукции. Есть микроаэрофилы и аэробы. Представители родов *Aquifex* и *Hydrogenobacter* — микроаэрофилы, гипертермофилы (оптимальная температура роста 85 °C), хемолитоавтотрофы, использующие водород, тиосульфат и элементарную серу в качестве доноров электронов.

Филум B2. Thermotoga. Это грамотрицательные палочки, обитающие в геотермальных зонах, морских гидротермах, сольфатарах, считаются очень древней ветвью. Имеют внешние покровы, отстающие от клетки (*тога*). Пептидогликан не содержит мезодиаминопимелиновой кислоты. Не образуют спор. Это строгие анаэробы, гипертермофилы (оптимальная температура роста 85 °C), сахаро- и пептолитики, использующие гликолиз, хемогетеротрофы. Потребляют широкий спектр органических соединений. Восстанавливают тиосульфат и/или S⁰. H₂ подавляет рост.

Филум B3. Thermodesulfobacteria. Грамотрицательные палочки, внешний мембранный слой которых образует выпячивания. Термофильные, строго анаэробные хемогетеротрофы, способные к диссимиляционной сульфатредукции.

Филум B4. Deinococcus — Thermus. Включает один класс Deinococci из двух порядков.

Порядок I. Deinococcales объединяет грамположительные неподвижные сферические или палочковидные клетки со сложной мно-

гослойной клеточной стенкой, парами или в тетрадах, синтезирующие пептидогликан без тейхоевых кислот. Рост от мезофильного до термофильного. Аэробы с хемоорганотрофным дыхательным метаболизмом. Устойчивы к ионизирующей радиации (выдерживают 3—5 млн рад, тогда как для человека летальной дозой является 100 рад).

Порядок II. Thermales содержит грамотрицательные прямые палочки или нити. Неподвижны, не образуют спор. Термофилы. Хемогетеротрофы со строго дыхательным метаболизмом. Некоторые виды способны использовать нитрат или нитрит в качестве конечного акцептора электронов.

Филум B5. Chrysiogenetes. Включает один класс с тем же названием и объединяет грамотрицательные подвижные изогнутые палочки, способные к анаэробному дыханию, в котором конечным акцептором электронов служит арсенат. Мезофилы. Близки по молекулярно-генетическим тестам к кластридиям, бациллам и дельтапротеобактериям.

Филум B6. Chloroflexi. Объединяет грамотрицательные нитчатые бактерии, обладающие скольльзящим движением. Пептидогликан содержит в качестве диаминокислоты L-орнитин. Внешняя мембрана, содержащая липополисахарид, не обнаружена. Один класс с тем же названием делится на два порядка.

Порядок I. Chloroflexales включает нитчатые аноксигенные фототрофные бактерии, образующие бактериохлорофилл и каротиноиды. Светособирающие пигменты находятся в хлоросомах. Все виды факультативно аэробны и предпочитают использовать органические субстраты как при фото-, так и при хемотрофном метаболизме. В этот порядок входят два семейства: Chloroflexaceae (роды *Chloroflexus*, *Chloronema*, *Heliothrix*) и Oscillochloridaceae (род *Oscillochloris*).

Порядок II. Herpetosiphonales содержит всего один род *Herpetosiphon*, у которого отсутствуют бактериохлорофиллы и имеются только каротиноиды. Метаболизм аэробный, хемогетеротрофный.

Филум B7. Thermomicrobia. Характеризуется грамотрицательными короткими неправильными неподвижными палочками. Спор не образуют. Пептидогликан не содержит диаминокислот в значительных количествах. Гипертермофилы (оптимальная температура роста 70—75 °C). Облигатные аэробы и хемоорганотрофы.

Филум B8. Nitrospirae. Грамотрицательные изогнутые, вибриоподобные или спиральные клетки с различными типами метаболизма. Большинство представителей — аэробные хемолитотрофы, включающие нитрификаторы, железобактерии и формы с магнитотаксисом (роды *Nitrospira*, *Leptospirillum*, *Candidatus Magnetobacterium*). Один род *Thermodesulfobacterium* — термофил, облигатный ацидофил и анаэроб. Близки к кластридиям, бациллам и дельтапротеобактериям.

Филум B9. Deferribacteres. Хемоорганогетеротрофы, дышащие анаэробно и использующие в качестве конечного акцептора электронов Fe^{3+} , Mn^{4+} , S^0 , Co^{3+} и нитрат (роды *Deferribacter*, *Geovibrio*, *Geobacter*). Близки к дельтапротеобактериям и нитроспирам.

Филум B10. Cyanobacteria. Состоит из пяти подсекций, выделенных в соответствии с морфологией, способом деления и дифференцированностью входящих в них организмов. Подсекции подразделяются на формо-роды. В целом это грамотрицательные одноклеточные, колониальные или нитчатые окислительные фототрофные бактерии, имеющие жизненные циклы разной сложности. Фотосинтетический аппарат содержит две фотосистемы, что позволяет использовать H_2O в качестве фотовосстановителя при фотосинтезе. Все известные представители способны к фотоавтотрофии, а некоторые виды и штаммы могут расти фотогетеротрофно или хемогетеротрофно. Содержат хлорофилл *a*, а фикобилипротеины (аллофиокцианин, фикоцианин, иногда фикоэритрин) могут присутствовать или отсутствовать. Клеточная стенка имеет толстый слой пептидогликана (до 200 нм). По филогении близки к фирмикутам.

Филум B11. Chlorobi. Состоит из одного класса Chlorobia, содержащего пять родов (*Chlorobium*, *Ancalochloris*, *Chloroherpeton*, *Pelodictyon*, *Prosthecochloris*). Это грамотрицательные сферические, овоидные, прямые или изогнутые палочки. Строгие анаэробы, облигатные фототрофы (зеленые серные бактерии). Клетки растут преимущественно за счет фотоассимиляции простых органических соединений. Некоторые виды могут использовать сероводород или тиосульфат как донор электронов для фиксации CO_2 . Глобулы серы запасаются на внешней стороне клетки в присутствии сульфида и света, сера редко окисляется дальше до сульфата. Большинство родов способно расти как хемогетеротрофы в микроаэробных или аэробных условиях. В качестве источника азота используют аммоний и N_2 . Большинство родов требует одного или больше факторов для роста (биотина, тиамина, ниацина, ПАБК). Группа имеет общие корни с бактериоидами.

Филум B12. Proteobacteria. Объединяет морфологически и физиологически разнообразные формы. Полифилетическая группа, включающая пять классов — Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta- и Epsilonproteobacteria. Филум условно подразделяют на двенадцать фенотипических групп.

Первая группа — грамотрицательные аэробные/микроаэрофильные палочки и кокки, в основном хемоорганогетеротрофы, но некоторые могут расти автотрофно, используя H_2 как донор электронов. Строго дыхательный тип метаболизма с кислородом в качестве конечного акцептора. Некоторые рода также способны к анаэробному дыханию. Обитают в почве, пресной и морской воде, на различных частях растений, во внутренних органах че-

ловека и животных. Некоторые патогенны для человека и животных.

В этой группе два главных подтипа:

- аэробные палочки и кокки, которые могут расти на воздухе при 21%-й концентрации O_2 ; некоторые роды в микроаэрофильных условиях фиксируют азот, а при наличии связанного азота растут как аэробы;

- микроаэрофильные прямые палочки, показывающие кислородзависимый рост при уменьшенных концентрациях кислорода и в отсутствие альтернативных акцепторов электронов; некоторые роды могут дышать анаэробно с использованием нитрата, фумарата и т.д. Такие фенотипы представлены среди Alpha-, Beta-, Gamma- и Deltaproteobacteria.

Вторая группа — это анаэробные прямые, изогнутые и спиральные грамотрицательные палочки, хемоорганогетеротрофы, получающие энергию путем анаэробного дыхания или брожения. Сюда не относят роды, использующие соединения серы как акцепторы электронов. Обычны среди Beta-, Gamma- и Deltaproteobacteria.

Третья группа включает аноксигенные фототрофные бактерии, содержащие бактериохлорофилл и способные использовать свет как источник энергии. При наличии света эти организмы растут анаэробно и не образуют кислород при фотосинтезе. В темноте способны к кислородному дыханию. Не содержат фикобилипротеинов.

Группу разделяют на три подтипа:

- клетки, способные расти с сульфидом и серой как единственными донорами электронов для фотосинтетической ассимиляции CO_2 . Хорошо растут в фотоавтотрофных условиях. Глобулы серы запасают внутри клетки, а затем могут дальше окислять до сульфата. Содержат бактериохлорофиллы *a* и *b* и каротиноиды. Могут нуждаться в витамине B_{12} (Gammaproteobacteria);

- клетки, растущие преимущественно за счет фотоассимиляции простых органических соединений. Некоторые виды могут использовать сульфид или тиосульфат как донор электронов для фиксации CO_2 . Глобулы серы формируются только вне клетки и редко окисляются до сульфата. Большинство родов способно расти как хемогетеротрофы в микроаэробных или аэробных условиях. Источник азота — аммоний и молекулярный азот. Большинство родов нуждается в факторах роста (биотине, тиамина, ниацине, ПАБК) (Alpha- и Betaproteobacteria);

- клетки, растущие хемогетеротрофно в аэробных условиях. Не растут анаэробно на свету. Метаболизм преимущественно дыхательный. Содержат бактериохлорофилл *a* и каротиноиды (Alphaproteobacteria).

Четвертая группа — нефототрофные скользящие бактерии, не образующие плодовые тела. Объединяет палочки или нити без жгу-

тиков, способные скользить по твердой поверхности. Имеют простые жизненные циклы. Некоторые представители формируют чехлы, иногда образуют микроспоры.

Группа подразделяется на четыре подтипа:

- одноклеточные палочковидные скользящие бактерии, часто плейоморфные. Хемоорганотрофы, аэробы, факультативные или облигатные анаэробы (некоторые Gammaproteobacteria);

- плоские, нитчатые скользящие бактерии. Хемоорганотрофы, аэробы, сахаролитики. Найдены в ротовой полости теплокровных (Betaproteobacteria);

- окисляющие соединения серы скользящие бактерии; размеры клеток сильно варьируют. Большинство — нитчатые. В присутствии сульфида и тиосульфата сера накапливается внутри клеток. Хемоорганотрофы, для которых показана миксотрофия. Метаболизм дыхательный (Gammaproteobacteria);

- организмы, не вошедшие в первые три подтипа (некоторые Beta- и Gammaproteobacteria).

Пятая группа — *аэробные хемолитотрофы* — условно подразделяется на три подтипа:

- нитрификаторы, использующие восстановленные неорганические соединения азота как источник энергии для роста;

- организмы, окисляющие серу и серные соединения для получения энергии;

- облигатные окислители водорода.

Первые встречаются среди Beta-, Gamma- и Epsilonproteobacteria, вторые — только среди Betaproteobacteria, третьи — везде, кроме Epsilonproteobacteria.

Шестая группа — *факультативно анаэробные грамотрицательные палочки* — содержит хемоорганогетеротрофы, некоторые из которых могут расти автотрофно с H_2 в качестве донора электронов. На воздухе растут за счет дыхания, в анаэробных условиях — за счет брожения. Живут как свободно, так и в ассоциациях с животными, человеком или растениями. Некоторые патогенны (энтеробактерии).

Седьмая группа — *почкующиеся и/или простековые нефототрофные бактерии* — подразделяется на два подтипа по присутствию или отсутствию простек и по способу клеточного деления. Оба фенотипа встречаются среди Alphaproteobacteria, а беспростековые формы — среди Gammaproteobacteria.

Восьмая группа — *аэробные/микроаэрофильные подвижные спиральные/вибриоидные грамотрицательные бактерии*. Клетки в виде вибрионов или спиралей, движутся с помощью полярных жгутиков. Аэробы или микроаэрофилы. Метаболизм дыхательный, некоторые способны к фумаратному или нитратному анаэробному дыханию. Большинство хемоорганотрофы, но некоторые представители способны расти автотрофно с молекулярным водородом.

Находят в почве, пресной и морской воде, на корнях и репродуктивных органах растений, в кишечнике человека. Некоторые являются хищниками по отношению к другим микроорганизмам. Имеются среди всех классов протеобактерий.

Девятая группа — *симбиотические и паразитические бактерии позвоночных и беспозвоночных* — содержит облигатные внутриклеточные паразиты эукариотических хозяев. Могут быть палочковидными, кокковидными или плейоморфными. Размножаются бинарным делением. Клеточная стенка содержит муравовую кислоту. Некоторые патогенны для человека, других позвоночных и беспозвоночных. Присутствуют среди Alpha- и Gammaproteobacteria.

Десятая группа — *скользящие бактерии, образующие плодовые тела* — являются хемоорганотрофами и строгими аэробами без жгутиков, которые могут скользить по твердой поверхности. При истощении питательных веществ клетки агрегируют и формируют плодовые тела, состоящие из модифицированной слизи и клеток, часто ярко окрашенные и имеющие макроскопические размеры. Плодовые тела различаются по сложности строения и размерам. Внутри плодовых тел формируются микроспоры или микроцисты (пор. Muxococcales).

Одиннадцатая группа — *бактерии в чехлах* — объединяет нефототрофные аэробные микроорганизмы, не обладающие скользящим движением. Характер роста — нитчатый, клетки находятся в прозрачных чехлах. Окраска чехлов — от желтого до темно-коричневого — в зависимости от мощности отложений оксидов железа или марганца. Единичные клетки могут двигаться с помощью полярных или субполярных жгутиков или быть неподвижными (два рода из класса Betaproteobacteria).

Двенадцатая группа — *неподвижные или малоподвижные изогнутые грамотрицательные бактерии* — включает хемоорганогетеротрофные сапрофиты четырех морфотипов (по степени «извитости») — от слабо закрученных до кольцевых структур. Наиболее оригинальная морфология у рода *Ancylobacter* — изогнутые или C-образные клетки могут образовывать кольца путем перехлестывания концов клетки. Аэробы, иногда с газовыми вакуолями (Alphaproteobacteria).

На примере строения филума Proteobacteria видно, что выделенные на основании молекулярно-генетического подхода большие группы получаются «сборными» с точки зрения морфолого-физиологической классификации бактерий. Стремление ввести филогенетические критерии вызвало передвижку многих таксонов в другие группы, разделение и переопределение таксонов.

Итак, филум Proteobacteria состоит из пяти классов.

Класс I. Alphaproteobacteria включает шесть порядков.

Порядки I и III. Rhodospirillales и Rhodobacterales объединяют фототрофные пурпурные несерные бактерии (например, из родов *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodobacter*).

Порядок II. Rickettsiales содержит облигатные внутриклеточные паразиты, возбудители болезней человека. Род *Rickettsia* включает палочковидные формы со сложным жизненным циклом, имеющие очень маленький геном. Они не могут самостоятельно катаболизировать углеводы и другие вещества и синтезировать АТФ, не содержат флавопротеинов и цитохромов, но имеют транслоказы для АТФ хозяина. Нуждаются в предшественниках для синтеза ДНК, РНК, гликогена, липидов и белков. Сами способны синтезировать некоторые аминокислоты и коферменты, имеют белки-порины.

Порядок IV. Sphingomonadales объединяет скользящие бактерии (сфингобактерии). К роду *Cytophaga* относятся длинные гибкие палочки с заостренными концами, аэробы, разлагающие целлюлозу или хитин при тесном контакте с субстратом. Клетки содержат каротиноид флексирубин. Представители рода *Sporocytophaga* образуют покоящиеся округленные клетки-цисты. Бактерии, формирующие длинные нити, способные к лизису структурных белков (кератина) и клеток других бактерий (образование «пятен» на газоне), относятся к родам *Flexibacter*, *Microscilla* и *Lysobacter*. Образующие трихомы *Vitreoscilla* и *Leucothrix* обитают на поверхности илов. Организмы рода *Sphingomonas* содержат в клеточной стенке сфинголипиды. Роды *Erythrobacter*, *Erythromicrobium*, *Erythromonas*, *Porphyrobacter* относятся к «квазифототрофам». В группу скользящих бактерий входят также нитчатые серобактерии родов *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*, *Thiomargarita*, *Macromonas* и др.

Порядок V. Caulobacterales содержит почкующиеся и простекобактерии. У таких организмов материнская и дочерняя клетки легко различимы. Представители рода *Hyphomicrobium* образуют дочернюю клетку на гифе в виде небольшого вздутия со жгутиком. Вместо почки могут образовываться экзоспores. Гифы иногда ветвятся. Типичные обитатели почвы и воды, метилотрофы. Микроорганизмы рода *Pedomicrobium* разлагают почвенный гумус. Простекобактерии характеризуются клетками, имеющими вид «келли», из-за того, что нитевидные выросты раздуваются вошедшей в них цитоплазмой. Это типичные обитатели водоемов и почв, аэробы, олиготрофы. Представители рода *Caulobacter* образуют розетки из клеток, соприкасающихся простеками, дочерняя клетка имеет жгутик и способна двигаться после деления. Клетки рода *Prosthecomicrobium* могут формировать несколько простек. Организмы, относящиеся к роду *Stella*, образуют клетки в виде плоской шестилучевой звезды.

Порядок VI. Rhizobiales объединяет симбиотические и свободноживущие азотфиксаторы, а также так называемые квазифототро-

фы (род *Photorhizobium*). Микроорганизмы рода *Rhizobium* относятся к симбиотическим азотфиксаторам, обитающим в клубеньках на корнях бобовых растений. Свободноживущие азотфиксаторы почвы — представители родов *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*. Раковые разрастания в тканях высших растений образуют организмы рода *Agrobacterium*, обладающие Ti-плазмидами.

Класс II. Betaproteobacteria состоит из шести порядков (Burkholderiales, Hydrogenophilales, Methylophilales, Neisseriales, Nitrosomonadales, Rhodocyclales) и содержит микроорганизмы с разной физиологией (хемоорганогетеротрофы, водородные бактерии, метилотрофы, возбудители тяжелых заболеваний человека, нитрификаторы I фазы, фототрофные пурпурные несерные бактерии). Сюда же входит род *Roseateles*, способный разлагать антропогенные полимеры, синтезирующий компоненты фотосинтезирующего аппарата и осуществляющий аноксигенный фотосинтез в аэробных условиях. К этому классу также относятся граммотрицательные палочки в цепочках, заключенные в общий чехол, органотрофы, аэробы, обитающие в загрязненной воде и в активных илах аэротенков. У рода *Sphaerotilus* клетки заключены в трубчатый чехол и формируют серые обрастания в воде. Организмы рода *Leptothrix* имеют чехлы, инкрустированные оксидами металлов. Представители рода *Haliscamenobacter* ответственны за «вспухание» активного ила. У бактерий рода *Crenothrix* чехол расширяется к концу и в этом месте путем дробления образуются мелкие клетки.

Класс III. Gammaproteobacteria включает тринадцать порядков (Chromatiales, Xanthomonadales, Cardiobacteriales, Thiothrichales, Legionellales, Methylococcales, Oceanospirillales, Pseudomonadales, Alteromonadales, Vibrionales, Aeromonadales, Enterobacteriales, Pasteurellales). Самые значимые из них содержат пурпурные серные бактерии родов *Chromatium*, *Thiocystis*, *Thiospirillum*, *Thiocapsa*, *Thiodictyon*, *Amoebobacter*, *Thiopedia*, *Ectothiorhodospira*, возбудители тяжелых легочных заболеваний человека рода *Legionella*, метилотрофы различной морфологии родов *Methylobacter*, *Methylomonas*, *Methylococcus*, свободноживущие водные микроорганизмы родов *Aquaspirillum* и *Oceanospirillum*. Псевдомонады быстро растут на богатых средах и способны к использованию разнообразных органических веществ, в том числе ксенобиотиков. Представители рода *Pseudomonas* являются космополитами в мире микробов. Род *Alcaligenes* включает палочки с редкими перитрихальными жгутиками, растущие на средах с водородом. Микроорганизмы рода *Zymomonas* осуществляют термофильное спиртовое брожение. Род *Zoogloea* объединяет аэробные, труднокультивируемые организмы, образующие хлопья в виде слизистых, разветвленных микроколоний, обитающие в аэротенках. Коккобациллы с широкими мета-

большими возможностями объединены в род *Paracoccus*. В аэробных условиях они используют сахара, метанол и органические кислоты, могут осуществлять анаэробное нитратное дыхание, а в присутствии H_2+CO_2 вести хемолитоавтотрофный образ жизни. Микроорганизмы, осуществляющие неполные окисления и являющиеся ацидофилами, относятся к роду *Acetobacter*. Род *Halomonas* объединяет хемоорганотрофные аэробы, растущие в высокоминерализованных водоемах с большим количеством поваренной соли. Водородные бактерии рода *Acidovorax* используют в своем метаболизме молекулярный водород и органические кислоты. Представители рода *Aleromonas* обитают в морской воде. Изогнутые подвижные палочки с полярным жгутиком относятся к роду *Vibrio* и являются алкалифилами с преимущественно бродильным типом метаболизма. Энтеробактерии являются грамотрицательными подвижными палочками, факультативными анаэробами, органотрофами, в анаэробных условиях обладающими бродильным типом метаболизма. Легко растут на агаризованных средах, большинство является сахаролитиками. Перитрихальное жгутикование присуще микроорганизмам родов *Escherichia* (типичные обитатели кишечника, относятся к условно патогенным, оппортунистическим организмам), *Proteus* (гнилостные бактерии, обитающие в почве и на продуктах питания), *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* (возбудители кишечных инфекций), *Klebsiella* (свободноживущие азотфиксаторы, обитающие в воде и почве), *Serratia* (типичные почвенные организмы, синтезирующие ярко-красные пигменты), *Erwinia* (возбудители болезней растений). Свободноживущие и симбиотические микроорганизмы рода *Photobacterium* обладают способностью к биолюминесценции.

Класс IV. *Deltaproteobacteria* состоит из семи порядков.

Порядки I—IV (*Desulfurellales*, *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales*) включают сульфидогены. Сюда относятся сульфат- и серуредуктирующие бактерии разной морфологии: *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfonatronovibrio* (экстремальные алкалифилы), *Desulfohalobium* (экстремальные галофилы), *Desulfosarcina*, *Desulfococcus*. Сульфатредукторы в анаэробных сообществах обычно функционируют как вторичные анаэробы, удаляющие молекулярный водород из анаэробной системы. К серуредуктирующим микроорганизмам относятся, например, представители родов *Desulfuromonas* и *Desulfurella* (термофилы).

Порядок V. *Syntrophobacterales* объединяет микроорганизмы, склонные к существованию в синтрофных ассоциациях.

Порядок VI. *Bdellovibrionales* состоит из водных хищников (паразитов) грамотрицательных бактерий и водорослей, очень мелких подвижных вибрионов родов *Bdellovibrio* и *Vampirovibrio*.

Порядок VII. *Mucosoccales* содержит грамотрицательные палочки со скользящим движением и сложным жизненным циклом, приводящим к образованию плодовых тел. Это аэробные органотрофы, обладающие мощными гидролазами и способные разлагать природные полимеры. Обладают индивидуальной дифференциацией от вегетативной клетки до микроцисты и коллективной дифференциацией от колонии до образования плодового тела. Вегетативные клетки делятся перетяжкой и образуют координированно движущуюся колонию (рой). Когда запасы питательных веществ достаточны, такая колония движется по поверхности, поедая субстрат и выделяя слизь. При истощении питания миксобактерии агрегируют и образуют плодовые тела. Этот процесс запускается кроме голодания еще пятью сигналами. Два из них: А-фактор — смесь пептидов и аминокислот и белковый С-фактор, выделяют сами клетки. На плодовых телах некоторые клетки дифференцируются в микроспоры в спорангиях. Миксобактерии обитают в почве, компостах, навозе, многие являются «микрохищниками». Веретеновидные клетки, образующие круглые миксо(микро)цисты без спорангиев, объединяют в род *Mucococcus*. К роду *Archangium* относятся организмы, формирующие палочковидные микроцисты. Род *Cystobacter* имеет спорангии без стебельков, спорангии на стебельках образуют клетки рода *Mellitangium*. Представители рода *Polyangium* отличаются клетками с прямыми концами и округлыми спорангиями. Род *Nannocystis* образует сложные плодовые тела.

Класс V. *Epsilonproteobacteria* объединяет представителей семейств *Helicobacteraceae* и *Campylobacteraceae*. Это грамотрицательные подвижные прямые, изогнутые и спиральные палочки, микроаэрофилы, обитающие в ЖКТ человека и других млекопитающих. Есть как непатогенные виды, так и возбудители септицемии, диареи, энтеритов, гастритов и язв. Обладают мощной уреазой. Кампилобактеры являются хищниками (паразитами) микроводорослей, внедряясь под клеточную оболочку и лизируя клеточное содержимое.

Филум B13. Firmicutes. Преимущественно грамположительные бактерии с низким содержанием Г + Ц в ДНК. Включает три класса.

Класс I. *Clostridia* включает три порядка.

Порядок I. *Clostridiales* подразделяется на ряд семейств, самые значимые из которых сем. *Clostridiaceae*, *Eubacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Hellobacteriaceae*.

Порядок II. *Thermoanaerobacterales* объединяет термофильные микроорганизмы, осуществляющие брожения с выделением H_2 и органических кислот (роды *Moorella*, *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobium*).

Порядок III. *Haloanaerobiales* существуют при повышенных концентрациях поваренной соли.

Класс II. Mollicutes объединяет микроорганизмы, лишенные клеточной стенки, со сложными пищевыми потребностями.

Класс III. Bacilli включает два порядка.

Порядок I. Bacillales содержит ряд семейств, из которых наиболее значимы Bacillaceae, Planococcaceae, Thermoactinomycetaceae, Staphylococcaceae, Sporolactobacillaceae, Listeriaceae.

Порядок II. Lactobacillales включают значительное количество семейств, наиболее известные — Aerococcaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Streptococcaceae.

Филум объединяет фенотипически разнородные микроорганизмы (14 групп).

Первая группа — термофильные и гипертермофильные бактерии — растут при температурах выше 65 °C. Это два рода из класса Clostridia — *Coprothermobacter* и *Carboxydotherrmus*.

Вторая группа — анаэробные прямые, изогнутые и спиральные грамотрицательные палочки (несмотря на характер окраски по Граму отнесены в этот филум в соответствии с молекулярно-генетическими тестами) — хемоорганогетеротрофы, получают энергию за счет анаэробного дыхания или брожения (кроме организмов, использующих окисленные соединения серы или S⁰ в качестве акцепторов электронов). Широко распространены в классе Clostridia и есть в одном роде класса Bacilli — *Acetanaerobium*.

Третья группа — аноксигенные фототрофные бактерии. Клетки растут за счет фотоассимиляции простых органических соединений. Строгие анаэробы и фотогетеротрофы. Не используют восстановленные соединения серы. Источник азота — аммоний и N₂. Внутренние мембранные системы и хлоромеры отсутствуют. Клетки содержат бактериохлорофилл *g* и каротиноиды. Клеточная стенка без ЛПС (сем. Heliobacteriaceae).

Четвертая группа — скользящие нефототрофные бактерии, не образующие плодовые тела, — палочки или нити без жгутиков, способные скользить по твердой поверхности. Имеют простые жизненные циклы (два рода из класса Bacilli — *Filifactor* и *Agitococcus*).

Пятая группа — аэробные нефототрофные хемолитотрофные бактерии — могут окислять восстановленные неорганические соединения серы (род *Sulfobacillus* из класса Bacilli).

Шестая группа — бактерии, способные к диссимиляционной сульфат- или сульфитредукции, — хемоорганогетеротрофы, дышащие анаэробно с сульфатом и другими окисленными соединениями серы или с S⁰ в качестве конечного акцептора электронов (род *Desulfotomaculum* из класса Clostridia).

Седьмая группа — симбионты или паразиты позвоночных и беспозвоночных — облигатные внутриклеточные паразиты эукариотических хозяев. Палочковидные, кокковидные или плейоморфные организмы. Многие виды патогенны. Встречаются среди классов Mollicutes и Bacilli.

Восьмая группа — анаэробные грамотрицательные кокки (несмотря на характер окраски по Граму отнесены в этот филум в соответствии с молекулярно-генетическими тестами) — хемоорганогетеротрофы со строго бродильным типом метаболизма (сем. Acidaminococcaceae из класса Clostridia).

Девятая группа — грамположительные кокки — хемоорганотрофы, мезофилы, не образующие спор. Первый подтип содержит аэробные кокки, образующие пары, гроздьи или тетрады (роды *Streptococcus*, *Sarcina*). Имеют каталазу и цитохромы. В клеточной стенке нет тейхоевых кислот. При росте на углеводах часто отсутствует кислотообразование. Второй подтип объединяет факультативно анаэробные или микроаэрофильные кокки в парах, цепочках, гроздьях или тетрадах (род *Staphylococcus*). Наличие каталазы, цитохромов и тейхоевых кислот варьирует. Третий подтип — строго анаэробные кокки в парах, цепочках, тетрадах или кубических пакетах (роды *Peptococcus*, *Ruminococcus*). Цитохромы не обнаружены. Реакция на каталазу обычно негативная.

Десятая группа — образующие эндоспоры грамположительные палочки и кокки, — формируют устойчивые к нагреванию эндоспоры. Подвижны, в основном палочки или нити. Один род (*Sporosarcina*) содержит подвижные кокки в тетрадах или кубических пакетах. Строгие аэробы, микроаэрофилы, факультативные или строгие анаэробы (представители родов *Bacillus*, *Clostridium*).

Одиннадцатая группа — правильные, не образующие спор грамположительные палочки (от коккобацилл до удлиненных палочек или нитей) — обычно непигментированные мезофильные хемоорганотрофы, растущие только в сложных средах. Некоторые патогенны для животных. Первый подтип содержит бродящие сахаролитические микроаэрофилы без гемсодержащей каталазы, цитохромов или менахинонов, использующих кислород через флавиновые оксидазы и пероксидазы. Второй подтип включает аэробы или факультативные анаэробы, которые имеют кофакторы и ферменты дыхания. Эти организмы также способны сбраживать сахара, в основном до лактата в лимитированных по кислороду или анаэробных условиях. Третий подтип объединяет строгие аэробы, которые не используют глюкозу как источник углерода и энергии и не сбраживают сахара до органических кислот (встречаются во всех трех классах филума Firmicutes, например роды *Lactobacillus*, *Caryophanon*).

Двенадцатая группа — неправильные неспорулирующие грамположительные палочки. Окраска грамвариабельна. Растут в присутствии воздуха и не образуют эндоспор. От строгих аэробов до строгих анаэробов. Могут быть патогенны для животных и растений (во всех трех классах филума Firmicutes).

Тринадцатая группа — микоплазмы — плейоморфные клетки, лишенные клеточной стенки. Колонии на агаре имеют вид яични-

цы-глазуньи. Могут передвигаться скольжением. Имеют сложные пищевые потребности, некоторые нуждаются в стеролах. Факультативные или облигатные анаэробы. Отдельные представители осуществляют гликолиз и молочнокислое брожение, не имеют полного ЦТК. Содержание Г + Ц 23—46 % (класс Mollicutes).

Четырнадцатая группа — *термоактиномицеты* — грамположительные организмы, формирующие субстратный и воздушный мицелий. Клеточная стенка содержит мезо-ДАП. На обоих видах мицелия образуются эндоспores. Термофилы, обитающие в саморазогревающихся субстратах (компостах). Некоторые патогенны для человека (аллергическое заболевание «фермерские легкие») (один род *Thermoactinomyces* из класса Bacilli).

Филум B14. Actinobacteria. Объединяет грамположительные бактерии с высоким содержанием Г + Ц в ДНК и родственные им организмы, красящиеся по Граму отрицательно. Содержит один класс с тем же названием, включающий пять подклассов и десять подпорядков. Морфологически и физиологически разнообразны.

Одноклеточные актинобактерии:

Грамотрицательные аэробные палочки и кокки. Хемоорганогетеротрофы, способные расти на воздухе (21%-й O_2), имеют дыхательный тип метаболизма. В микроаэрофильных условиях могут фиксировать азот (сем. Actinothermaceae).

Аэробные окислители серы. Нефототрофы, способны окислять восстановленные соединения серы с получением энергии (род *Acidimicrobium*).

Почкующиеся и/или простековые бактерии. Нефототрофы (род *Blastococcus* из подпорядка Frankineae).

Грамположительные кокки. Хемоорганотрофы, мезофилы, спор не образуют. Строгие анаэробы. Формируют устойчивые сочетания в виде пар, цепочек, тетрад, кубических пакетов. Не обнаружены цитохромы и каталаза (подпорядок Micrococcineae, Propionibacterineae, сем. Kincoisporiaceae).

Правильные бесспорные грамположительные палочки. От коккоидов до удлинённых палочек или нитей. Обычно не пигментированные, мезофильные хемоорганотрофы. Растут только в сложных средах. Аэробы или факультативные анаэробы. Содержат кофакторы и ферменты дыхания (роды *Cellulomonas*, *Rhodococcus*).

Неправильные бесспорные грамположительные палочки. Могут формировать разветвлённые нитчатые элементы, смеси палочек и нитей, коккоидные формы. Некоторые имеют жизненный цикл «палочки — кокки». От строгих анаэробов до строгих аэробов. Есть представители, патогенные для животных или растений и обычные обитатели ЖКТ и рубца (роды *Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*).

Микобактерии. Аэробные, неподвижные, бесспорные, медленно растущие, кислотоустойчивые палочки. Иногда формируют

ветвящиеся нити. Воздушного мицелия не образуют. Некоторые патогенны для животных и человека (туберкулез, проказа). Обычные обитатели почвы и воды (род *Mycobacterium*).

Спороактиномицеты:

Нокардиоформы. Грамположительные, морфологически различные организмы — прямые и изогнутые палочки — могут формировать рудиментарный и разветвлённый мицелий, фрагментирующийся в бациллярные или коккоидные элементы. Некоторые роды могут образовывать воздушный мицелий и цепочки артротроф. Аэробы или факультативные анаэробы, хемоорганотрофы. Большинство — свободноживущие сапротрофы, обитатели почвы. Некоторые патогенны для человека и животных (дифтерия, нокардиомикозы; подпорядок Corynebacterineae, Pseudonocardineae, сем. Nocardioidaceae, Promicromonosporaceae).

Актиномицеты с многоклеточными спорангиями. Филаменты делятся, формируя цепочки из коккоидных элементов, образуют или не образуют воздушный мицелий. Клетки на поверхности формируют спорангии с подвижными или неподвижными спорами. Аэробы, органотрофы, некоторые — микроаэрофилы, симбиотические азотфиксаторы (подпорядок Frankineae, сем. Dermatoisporiaceae).

Актинопланы. Хемоорганотрофы. Воздушный мицелий не формируется или его мало. Одни имеют подвижные споры, которые образуются в спорангиях, другие создают неподвижные споры, одиночные или в цепочках. Клеточная стенка содержит мезо-ДАП и глицин. Обитают на влажных растительных остатках и в почве (род *Actinoplanes*, сем. Micromonosporaceae).

Стрептомицеты и родственные роды. Большинство — строгие аэробы. Хемогетеротрофы. Мицелиальный рост часто сопровождается сильным развитием воздушного мицелия с длинными цепочками спор. Колонии обычно ярко пигментированы. Растут медленно, используют широкий спектр соединений. Обладают мощными гидролазами. Клеточная стенка содержит L-ДАП и глицин. Типичные обитатели почв, есть патогенные виды (актиномикозы). Ряд представителей является продуцентами важнейших антибиотиков (род *Streptomyces*).

Мадуромицеты. Хемогетеротрофы, аэробы. Воздушный мицелий развит в разной степени. Артротрофы на воздушном мицелии и в цепочках разной длины или в спорангиях. Клеточная стенка содержит мезо-ДАП и мадуру. Первый подтип объединяет актиномицеты с разветвлённым нефрагментированным вегетативным мицелием, который формирует воздушный мицелий, производящий две или более артротрофы или спорангии с одной или более спорами, подвижными или неподвижными (рода *Actinomadura*, *Microbispora*). Второй подтип содержит актиномицеты с сильно разветвлёнными, нефрагментированными гифами, которые об-

разную плотный вегетативный мицелий. Воздушного мицелия может не быть. Цепочки артроспор могут быть прямыми и спиральными (роды *Spirillospora*, *Streptosporangium*).

Термомоноспоры. Мицелиальный рост с разной степенью развития воздушного мицелия. Споры одиночные, в цепочках или в спорангиоподобных структурах. Клеточная стенка содержит мезо-ДАП (род *Dactylosporangium*).

Другие спороактиномицеты. Хемоорганотрофы. Мицелиальный рост, длинные цепочки артроспор на воздушном мицелии; не образуют миколовые кислоты (сем. *Actinomycetaceae*).

Филум B15. Planctomycetes. Включает один класс с тем же названием из одного порядка Planctomycetales, содержащего одно семейство Planctomycetaceae и четыре рода (*Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, *Isosphaera*). Грамотрицательные сферические, овоидные и пузыревидные клетки, размножающиеся почкованием. Клетки могут формировать один или больше слизистых стебельков. Клеточная стенка не содержит пептидогликана. Представители родов *Pirellula* и *Gemmata* имеют мембрану, покрывающую нуклеоид. Олиготрофы, водные организмы. Относятся к труднокультивируемым формам.

Филум B16. Chlamydiae. Состоит из одного класса Chlamydia, включающего один порядок Chlamydiales из четырех семейств (Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Simkaniaceae, Waddliaceae). Неподвижные облигатные паразиты, коккоиды, размножающиеся внутри вакуолей, связанных с мембраной, в цитоплазме клеток млекопитающих. За исключением организмов рода *Parachlamydia*, красящихся грамвариабельно, остальные представители филума — грамотрицательные. Клеточная стенка не содержит муравовой кислоты или она есть в следовых количествах. Размножение происходит в сложном жизненном цикле. В клетках отсутствует ряд ферментов и кофакторов катаболических и анаболических путей, АТФ транспортируется из клеток хозяина, для синтеза основных биологических полимеров необходимы предшественники. Имеют очень маленький геном (272 гена). Некоторые являются возбудителями болезней человека (пневмония, трахома, хламидиозы).

Филум B17. Spirochaetes. Состоит из одного класса с тем же названием, включающего один порядок Spirochaetales из трех семейств (Spirochaetaceae, Serpulnaceae, Leptospiraceae). Это грамотрицательные, длинные спиральные клетки, имеющие аксиальные фибриллы (эндожгутики). Хемогетеротрофы. Род *Spirochaeta* — анаэробы, осуществляющие брожение сахаров по пути Эмбдена — Мейергофа, отличаются широкой адаптацией к физическим факторам (температуре, минерализации среды, pH). Являются типичными свободноживущими членами целлюлозоразрушающих сообществ, обитают в ротовой полости человека, метантенках, анаэробных осадках морей и щелочных озер. Представители рода *Leptospira* имеют характерный крючок на конце клетки. Являются

свободноживущими аэробными водными формами. Роды *Treponema*, *Borrelia*, *Cristispira* содержат возбудители тяжелых заболеваний человека и животных (сифилис, возвратные тифы и т.д.).

Филум B18. Fibrobacteres. Состоит всего из одного рода *Fibrobacter*. Это грамотрицательные палочковидные или плейоморфные бактерии, не образующие спор. Облигатные анаэробы. Хемоорганогетеротрофы. Связаны с пищеварительным трактом млекопитающих. Родственны спирохетам и хламидиям.

Филум B19. Acidobacteria. Включает один класс Acidobacterin из одного порядка Acidobacteriales, содержащего одно семейство Acidobacteriaceae из трех родов (*Acidobacterium*, *Sporohalobacter*, *Geothrix*). Это грамотрицательные бесспорные палочки. Мезофилы. Хемоорганогетеротрофы. Первый подтип содержит аэробные ацидотолерантные микроорганизмы, второй — анаэробные организмы, получающие энергию за счет анаэробного дыхания или брожения.

Филум B20. Bacteroidetes. Состоит из трех классов (Bacteroidetes, Flavobacteria, Sphingobacteria). Содержит грамотрицательные микроорганизмы разной морфологии и физиологии.

Аэробные/микроаэрофильные палочки. Преимущественно хемоорганогетеротрофы, но некоторые могут расти автотрофно с H_2 как донором электронов. Способны расти на воздухе и имеют строго дыхательный метаболизм. Акцептор электронов чаще всего O_2 , но некоторые способны к анаэробному дыханию. Обитают в почве, пресной и морской воде, на разных частях растений, во внутренних органах человека или животных. Есть патогенные представители. Первый подтип содержит аэробные палочки, которые растут на воздухе (21%-й O_2). Представители ряда родов в микроаэрофильных условиях фиксируют азот, при наличии связанных форм азота растут как аэробы (представители класса Flavobacteria). Второй подтип объединяет микроаэрофильные прямые палочки, которые не растут при концентрации кислорода 21 %. Кислородзависимый рост наблюдается при уменьшенных концентрациях O_2 и в отсутствие альтернативного акцептора электронов. Микроорганизмы некоторых родов могут дышать анаэробно с нитратом, фумаратом и др. (представители класса Sphingobacteria). Коккоиды разного размера входят в род *Bacteroides*, изогнутые палочки с пучком жгутиков на вогнутой стороне — в роды *Succinivibrio*, *Selenomonas*.

Анаэробные грамотрицательные палочки. Хемоорганогетеротрофы, получают энергию путем анаэробного дыхания или брожения. Сюда не включают организмы, дышащие анаэробно с использованием окисленных соединений серы в качестве акцепторов электронов (микроорганизмы класса Bacteroidetes и рода *Psychrotonas* из класса Flavobacteria).

Скользкие нефототрофные бактерии, не образующие плодовые тела. Одноклеточные скользкие палочки, часто плейоморфные. Жгутиков не имеют. Хемоорганотрофы, аэробы, факультативные

или облигатные анаэробы. Имеют простой жизненный цикл (представители класса *Sphingobacteria*).

Симбионты беспозвоночных. Облигатные внутриклеточные паразиты эукариотических хозяев, грамотрицательные палочки (род *Blattabacterium* из класса *Bacteroidetes*).

Бактерии в чехлах. Нефототрофные аэробные организмы, не способные к скользящему движению. Растут в виде филаментов, в которых клетки покрыты прозрачными чехлами от желтого до темно-коричневого цвета в зависимости от отложений оксидов железа и марганца. Отдельные клетки могут быть неподвижны или передвигаться с помощью полярных или субполярных жгутиков (несколько родов класса *Sphingobacteria*).

Неподвижные или малоподвижные изогнутые грамотрицательные бактерии. Хемоорганогетеротрофы, сапротрофы. Клетки могут быть изогнутые, сильно извитые, спиральные или кольцевидные за счет перехлестывания концов С-образных клеток. Газовые вакуоли отсутствуют. Аэробные, аэротолерантные или анаэробные. Обитатели почвы, пресной и морской воды (роды *Ancyclobacter*, *Renobacter*, *Tetrarcus*).

Филум B21. *Fusobacteria*. Включает один класс с тем же названием, один порядок *Fusobacteriales* и одно семейство *Fusobacteriaceae*. Объединяет анаэробные грамотрицательные палочки с хемоорганогетеротрофным метаболизмом. При брожении образуют смесь органических кислот. Обитают в рубце жвачных, ЖКТ и ротовой полости человека и животных. Имеются патогенные представители.

Филум B22. *Verrucomicrobia*. Содержит два рода *Verrucomicrobium* и *Prostheco bacter*, объединенные в одно семейство *Verrucomicrobiaceae*, один порядок *Verrucomicrobiales* и один класс *Verrucomicrobiae*. Это грамотрицательные бактерии с пептидогликаном клеточной стенки, содержащим ДАП. Некоторые виды способны формировать простеки или фимбрии. Облигатные или факультативные аэробы. Хемогетеротрофы, мезофилы. Размножаются бинарным делением или почкованием. Почки могут образовываться на верхушке простеки или прямо на клеточной поверхности. Микроорганизмы рода *Prostheco bacter* имеют кеглевидные клетки, соединенные доньшками.

Филум B23. *Dictyoglomi*. Включает всего один род *Dictyoglomis*. Это грамотрицательные экстремально термофильные палочки, не образующие спор. Облигатные анаэробы, хемоорганогетеротрофы с бродильным типом метаболизма. Отдельные клетки могут собираться в сферические агрегаты, содержащие несколько сотен особей, покрытых общей оболочкой.

Следует отметить, что в этой главе описаны лишь те филогенетические группы, которые имеют культивируемых представителей, все или часть из которых выделены в виде чистых культур. С учетом групп, не содержащих культивируемые формы и состав-

ленных только из генетических клонов микроорганизмов, общее количество филумов прокариот в настоящее время достигает 56.

Контрольные вопросы

1. Какие филумы в настоящее время не обладают типичной иерархией таксонов и почему?
2. Назовите филумы, включающие фототрофных представителей.
3. Какие филумы содержат представителей, отличающихся наиболее высоким морфофизиологическим разнообразием?
4. Какие группы микроорганизмов считаются наиболее древними?
5. Назовите филум, состоящий только из облигатных внутриклеточных паразитов.
6. Для представителей какого филума особую значимость имеют метаксономические признаки?

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РНК	— рибонуклеиновая кислота
тРНК	— транспортная РНК
иРНК	— информационная РНК
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
16S рРНК	— рибосомальная РНК с коэффициентом седиментации 16 ед. Сведберга
Г, Ц, Т, А, У	— гуанин, цитозин, тимин, аденин, урацил
F ₄₂₀ , F ₄₃₀	— коферменты с максимумами поглощения при 420 и 430 нм соответственно
ЦПМ	— цитоплазматическая мембрана
РубисКО	— рибулзобисфосфаткарбоксилаза-оксигеназа
АТФ, АДФ, АМФ	— аденозинтри-, аденозинди-, аденозинмонофосфорная кислота соответственно
ГТФ, ЦТФ, УТФ	— гуанозин-, цитидин-, уридинтрифосфорная кислота соответственно
ЛПС	— липополисахарид
УФ	— ультрафиолет
ЖКТ	— желудочно-кишечный тракт
КоА или КоА-SH	— кофермент А
ФМН	— флавиномононуклеотид
ФАД	— флавинадениндинуклеотид
НАД ⁺ и НАДН	— никотинамиддинуклеотид окисленный и восстановленный соответственно
НАДФ ⁺ и НАДФН	— никотинамиддинуклеотидфосфат окисленный и восстановленный соответственно
ПАБК	— пара-аминобензойная кислота
СОД	— супероксиддисмутаза
ФЕП	— фосфоенолпируват
ФФ _n или PP _i	— пирогосфат
S	— субстрат
ФГК	— фосфоглицериновая кислота
ЭТЦ	— электронтранспортная цепь
Цит	— цитохром
КДФГ	— 2-кетог-3-дезоксифосфоглюконат
Фд и ФдН ₂	— ферредоксин окисленный и восстановленный
ЦТК	— цикл трикарбоновых кислот
ФГА	— фосфоглицериновый альдегид
Ф _n или P _i	— неорганический фосфат
ОВП или Eh	— окислительно-восстановительный потенциал
ДОАФ	— диоксиацетонфосфат
ММО	— метанмонооксигеназа

РМФ-путь	— рибулзозомонофосфатный путь
МХ	— менахинон
УХ	— убихинон
ПХХ	— пирролохинолинхинон
ТГФ	— тетрагидрофолат
МФ	— метанофуран
ДОА	— диоксиацетон
H ₄ -МП	— тетрагидрометаноптерин
АО	— алкогольоксидаза
Кат	— каталаза
ДОА-цикл	— диоксиацетоновый цикл
АнаммОкс	— анаэробное окисление аммония
РЦ	— реакционный центр
Хл или Chl	— хлорофилл
ФС	— фотосистема
Бхл	— бактериохлорофилл
или Bchl	— ацилпереносающий белок
АПБ	— 5-фосфорибозил-1-пирогосфат
ФРПФ	— диаминопимелиновая кислота
ДАП	— уридиндифосфат
УДФ	— поли-β-гидроксимасляная кислота
ПОМ	— CAP-белок (catabolite
activator protein)	— белок, активируемый катаболитом
цАМФ	— циклическая АМФ
НФБ	— «некультивируемая форма бактерий»
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
МЭЖК	— метиловые эфиры жирных кислот
ВЭЖХ	— высокоэффективная жидкостная хроматография
TGGE	— термический градиентный гель-электрофорез
DGGE	— денатурирующий градиентный гель-электрофорез
ГЕМОМ	— генетически модифицированные микроорганизмы
ДМСО	— диметилсульфоксид
ДМС	— диметилсульфид
ТМА, ДМА	— три-, ди- и метиламин соответственно
и МА	— N-оксид триметиламина
NO-ТМА	— гуанозиндифосфат
ГДФ	— аденозинфосфосульфат
АФС	— фосфоаденозинфосфосульфат
ФАФС	— фосфоаденозинфосфат
ФАФ	— метилредуктаза
МР	— гетеродисульфидредуктаза
ГДР	— кофермент В
КоВ или КоВ-SH	— кофермент М
КоМ или	— флавопротеид
КоМ-SH	— квант света
ФП	— изоцитратлиаза
hν	
ИЦЛ	

МО аммиака	— монооксигеназа аммиака, или аммиакмонооксигеназа
ГАОР	— гидроксиламинооксидоредуктаза
ФЭ	— фикоэритрин
ФЦ	— фикоцианин
АФЦ	— аллофикоцианин
Фео	— феофитин
Х или Q	— хинон
ПЦ или PC	— пластоцианин
ПХ или PQ	— пластохинон
Бфео	— бактериофеофитин
РБФ-оксигеназа	— рибулозобисфосфатоксигеназа
ВМ	— внешняя (наружная) мембрана
ОП	— оптическая плотность
[С]	— концентрация
ЭПА	— элиминирующий плазмиды агент

Бабьева И. П. Биология почв / И. П. Бабьева, Г. М. Зенова. — М.: Изд-во МГУ, 1983.

Биотехнология / под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1984.

Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология / Л. Б. Борисов [и др.]. — М.: Медицина, 1994.

Варфоломеев С. Д. Биотехнология. Кинетические основы микробиологических процессов / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калужный. — М.: Высшая школа, 1990.

Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. — М.: Мир, 1982.

Гусев М. В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — М.: Издат. центр «Академия», 2005.

Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. — М.: Изд-во МГУ, 2004.

Заварзин Г. А. Введение в природоведческую микробиологию / Г. А. Заварзин, Н. Н. Колотилова. — М.: Книжный дом «Университет», 2001.

Кожевин П. А. Микробные популяции в природе / П. А. Кожевин. — М.: Изд-во МГУ, 1989.

Кондратьева Е. Н. Автотрофные прокариоты / Е. Н. Кондратьева. — М.: Изд-во МГУ, 1996.

Нетрусов А. И. Экология микроорганизмов / А. И. Нетрусов [и др.]. — М.: Издат. центр «Академия», 2004.

Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]. — М.: Издат. центр «Академия», 2005.

Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и [др.]. — М.: Мир, 1997.

Плакунов В. Г. Основы энзимологии / В. Г. Плакунов. — М.: Логос, 2002.

Прист Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов / Ф. Прист. — М.: Мир, 1987.

Промышленная микробиология / под ред. Н. С. Егорова. — М.: Высшая школа, 1989.

Протисты. Руководство по зоологии / под ред. А. Ф. Алимова — СПб.: Наука, 2000.

Современная микробиология : в 2 т. / под ред. И. Ленгелера [и др.]. — М.: Мир, 2005.

Стейниер Р. Мир микробов: в 3 т. / Р. Стейниер [и др.]. — М.: Мир, 1979.

Умаров М. М. Ассоциативная азотфиксация / М. М. Умаров. — М.: Изд-во МГУ, 1986.

Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. — М.: Мир, 1986.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / L. R. Boone, R. W. Castenholz. — N. Y., Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2001. — Vol. 1.

Brock's Biology of Microorganisms Web site: <http://www.prenhall.com/brock/>

The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 2nd Ed. / Eds. A. Balows et al. — Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 1992. V.1—4. Web-site: <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автохтонные микроорганизмы 282
Адаптационная изменчивость 239
Адгезины 45
Аденилатциклаза 236
Азотфиксация **211**, 193
— ассоциативная 278
— симбиотическая 279
Акинета 64, **196**
Аксиальная нить 62
Актобактерии 23, 39, 64, 125, **332**
Актомицеты 39, 289, **333**
Актинориза 269
Аллостерическая регуляция 232
Аллохтонные (имогенные) микроорганизмы 282
Аммонификация 151
Аммонификация нитрата 136
Амфиболизм 106
Амфиболиты 219
Амфиболические пути 216
Анаболизм 106, **216**
Анаболические пути 216
АнаммОкс 168
Анаплеротические реакции 117
Анаэробное дыхание 134
— «железное» 139
— карбонатное 143
— нитратное 135
— серное 139
— сульфатное 136
— фумаратное 143
Анаэробы 96
Антибиотики **83**, 308
Антимикробные агенты **82**, 304, 308
Антисмысловые гены 237
Антисмысловые РНК 237
Арбускулы 281
Аспартаза 221
Ассимиляционная нитритредукция 135
Аттенуация 236
Аттрактанты 63, 212, 250, 276, **280**
Ауксотроф 72
Ацетил-КоА-путь (путь Вуда—Льюнга-дала) 17, **133**, 136, 143, 217
Ацетокластический метаногенез 144, **147**
Ацилпереносающий белок 234
Аэробное дыхание 149
Аэробные аноксигенные фототрофные бактерии (эритробактерии) 200
Аэробы 96
Базоцит (байоцит) 64, 167, **194**
Бактериальная хромосома 25, 239
Бактериальный тазовый фильтр 290
Бактериородопсин 200
Бактероиды 212, 213, **280**
Белки-порины 39, 102
Биогаз 144
Биогенные элементы 71
Биодеградация (биоразрушение) 291
Биоконтролирующие агенты 278
Биолюминесценция 154
Биопленка 45, 266, **284**
Биоповреждения (биокоррозия) 304
Биоремедиация 292, 313
Биосенсор 316
Биоциды 315
Ботулин 131, **306**
Брожения **118**
— бутандиоловое 126
— гомоацетатное 131
— гомо- и гетероферментативное молочнокислое 122
— маслянокислое и ацетобутилокс 128
— пропионовокислое 124
— смешанное, или муравьинокислое брожение 126
— спиртовое 118
— сукцинат-этанольное 131
«Быстрые» и «медленные» болезни 308
Вакцина 309
«Вариация фаз» 241
Везикулы 280, **281**
Вино 300
Вирулентность 307
Вирусы 18, 227
Витамины 72
Включения серы 34, **228**
Внеклеточные протеазы 151
Внеклеточные целлюлазы 152

Внешняя (наружная) мембрана 39
Водородные бактерии 171
Волютин 34, **228**
Восстановительное аминирование кетокислот 222
Восстановительные эквиваленты 110
Восстановительный цикл дикарбоновых кислот **192**, 217
Вторичные метаболиты 228
Вынос азота из почвы 111
Выщелачивание металлов из бедных руд (гидрометаллургия) **181**, 314

Галобактерии (галоархеи) 87, **198**, 210, 319
Гелиобактерии 186, **193**, 209, 330
Гем 226
Генетически модифицированные микроорганизмы (ГЕМОМ) 262
Генные зонды 258
Генотип 239
Геосмин 197, **289**
Гетеротрофная фиксация углекислоты 126, 219
Гетеротрофный потенциал 260
Гетероциста 64, **195**, 213
Гибридизация колоний 258
Гидроксаматы 103
Гидроксиламинооксидоредуктаза 170
Гидроксипропионатный цикл **192**, 217
Гидролитики 73, **282**
Гликоген 34
Гликогенотоподобные полисахариды 228
Гликокаликс 54
Гликолиз 116
Глиоксилатный шунт 117
Глобальные циклы элементов 292
— азота 294
— кислорода 293
— серы 294
— углерода 292
Глутаматдегидрогеназа 221
Глутаматсинтаза 222
Глутамин/глутаматный путь 222
Глутаминсинтаза 221
Глюконеогенез 219
Гонидии 64
Гормогонии 64, 196
Гумус 277, 287

Двухфазность брожений 129
Денитрификация 135
Дiazотрофы (азотфиксаторы) 212
— ассоциативные 212

— истинно свободноживущие 212
— свободноживущие 212, 320
— симбиотические 212, 320
Диауксия 76, 235
Диссипотрофы 73, **282**
Диссоциация 241
Дифференциально-диагностические среды 73, **307**
ДНК-полимеразы 225
ДЦА-цикл **163**, 167
Домен **12**, 14, 319

Жгуты 49, 62

Замкнутые системы жизнеобеспечения 314
Запасные вещества 33, **227**
Защита сельскохозяйственных растений 309
Зеленые бактерии **190**, 209, 321, 322

Идентификация 11
Идиофаза 230
Изоферменты 233
Иммобилизация 311
Иммунитет 307
Ингибирование 233
Индуктор 235
Индукция 235
Индукцибельные ферменты 234
Инициация репликации 238
Инфекция 307

Капсулы 53
Карбамоилфосфат 221
Карбоксидобактерии **174**, 214
Карбоксисома **34**, 181
Катаболизм 106
Катаболитная репрессия 236
Катаболические пути 190
Каталаза 98, 128
Кетолезоксифосфоглюконатный (КДФГ) путь 116
Классификация 11
Клеточная стенка **34**, 259
Клеточное деление 64, 237
Клостридии **128**, 331
— протеолитические (пептолитические) 129
— пуринолитические клостридии 129
— сахаролитические 129
Клубеньки 262, **280**
Ковалентная модификация 232
Коли-индекс 126
Коли-титр 126

Колонка Виноградского 282
Кометаболизм 291
Комменсализм 269
Компартментализация 231
Компетентность 240
Конкурентные взаимоотношения 266
Консорциум 268
Константа скорости роста 78
Конститутивные ферменты 234
Конъюгация 65, **240**
Кооперация факультативная и облигатная 266
Копиотрофы 73, 282
Корепрессор 235
Корневые депозиты (ризодепозиты) 277
Корневые экссудаты 277
Кор-фермент 234
Кофермент 108
Крахмалоподобный полисахарид (гранулеза) 228
Кривая роста 75
Ксенобиотики 291
Ксерофилы 86

Лаз-фаза 76
Леггемоглобин 213, **280**
Лектины 212, **280**
Люциферазная система (люцифераза) бактерий — **155**, 316

Макроэлементы 71
Матрица 224, 225
Матричный синтез 225
Межвидовой перенос водорода, формата 268
Мезосома 33
Метабиотические связи 269
Метаболизм 106
Металлоксилирующие микроорганизмы 174
Метаногены 15, **144**, 319
Метилотрофия 156
Метилотрофные микроорганизмы **156**, 219, 327
Микобактерии 24, **332**
Микоплазмы 331
Микориза 269, **280**
Микробиота рубца 267, **272**
Микробный мат 284
Микроокружение 265
Микрофосилии 295
Микроэлементы 71
Миксобактерии **65**, 329

Минерализация 291
Множественная лекарственная устойчивость 85, **307**
Морфо-физиологическая классификация 318
Муреин (пептидогликан) 17, 34, **36**, 65, 226
Мутагены 239
Мутации 239
Мутуализм 268

НАД⁺-зависимые дегидрогеназы 151
Накопительная культура 76
Наследственная изменчивость 240
Нейтрализм 268
«Некультивируемая форма бактерий» 246
Неполное окисление 154
Низин 306
Нитратредукция 134
— ассимиляционная 134, **220**
— диссимиляционная 135
Нитрификация 168
Нитрогеназа 213
Номенклатура 11
Нормальная микрофлора человека 268, **275**
Нуклеоид 26, 44
Нумерическая таксономия 12

Облегченная диффузия 102
Окисление восстановленных соединений серы 177
Окислительный пентозофосфатный путь 151
Олиготрофы 73, 282
Оппортунисты 269, **275**
Определитель Бержи 12, **318**
Осмофилы 87

Паразитизм **268**, 281
Параспоральные тела 34
Парниковые газы 290
«Парниковый эффект» 149
Пассивная диффузия 102
Пастеризация 7, 303, **306**
Патогенность 307
Пентозофосфатный путь 116
Пептидогликан (муреин) 17, 34, 36, 65, **226**
Первичная экологическая ниша 265
Переаминирование 222
Периплазматическое пространство (периплазма) 39

Пермеазы 102
Пероксидаза 98
Пероксисома 166
Пиво 301
Пили 42
Пиноцитоз 102
Плазмиды **28**, 239
Плазмолиз 86
Планктомикеты 334
Плейоморфизм 25
Полигидроксиалканоаты 230
Поли-β-гидроксибутират 34, 137, **227**
Полифилетическая таксономия 14
Полное окисление 151
Порча пищевых продуктов 303
Почва 287
Принцип биохимического единства 106
Природные термопластики 173
Пробы 250
— биологических образцов 252
— воды 251
— воздуха 252
— осадков 252
— почвы 250
Продукты из молока 299
Продуценты 311
Прорастание споры **61**, 208
Протестическая группа 108
Протеобактерии 322
«Протонная помпа» 110
Протопласт 41
Прототроф 72
Прохлорофиты -197
Процент дыхания 261
Псевдомурсин **15**, 36
Психротрофы 93
Психрофилы 92
Пункт сопряжения 151
Пурпурные бактерии **187**, 203, 326, 328
«Пурпурные мембраны» 200

Реакция Вула—Вермана 217
Реакция Стикланда **131**, 247
Регуляция клеточного цикла 237
Резиденты 275
Репарационные системы 239
Репелленты **63**, 276
Репликация 225
Репрессибельные ферменты 235
Репрессия 235
Рибулозобисфосфатный цикл (цикл Кальвина) 217
Ризоплана 277
Ризосфера **212**, **277**

Риккетсии 73, **326**
РМФ-цикл 161
РНК-полимеразы 225
Рубец жвачных **153**, **271**
РубисКО 190

Санитарно-показательные организмы 126, **306**
Сбалансированный рост 75
Светящиеся бактерии **128**, **154**
Связывающие белки 106
Сериновый цикл 162
Сигма-фактор 234
Сидерофоры **103**, 140
Симбиоз 202, **268**, 281
— облигатный и факультативный 269
— экзосимбиоз 269
— эндосимбиоз 269
Синглетный кислород 98
Синтрофия **268**, 291
Синхронные культуры 79
Систематика 11
Слияние протопластов 311
Смешанная культура 76
Совместимые растворители (осмолиты) 89
Сообщество **265**, **267**
Соокисление 291
Спирохеты 334
Споруляция **59**, 237
Стационарная фаза 76
Стекла обрастания **250**, 266
Стерилизация **82**, 306
Стимуляторы роста растений **212**, 278
Стрептомицеты 333
Строматолиты **285**, **295**
Сульфатредукция **136**, 138
— ассимиляционная 136, 222
— диссимиляционная 136
Сульфидогенез **112**, 114
Супероксиддисмутаза **98**, 128
Супероксидрадикал **98**, 189
Сфероласт 41
Сыворотка 309

Таксис 63
Таксон 11
Тейховые кислоты 39
Темновая репарация **100**, 239
Темновые реакции ассимиляции 187
«Терминаторная шпилька» 236
Термофилы 93
Тога 320
Трансаминаза 222

Трансдукция **65**, **240**
Транскрипция **225**, 234
Транслокация групп 104
Трансмембранный потенциал 107
Транспорт 32, **103**
— активный 103
— вторичный 104
— первичный 103
Трансформация (ген.) **65**, **240**
Трансформация (хим.) 291
Триада Коха 8
Трофические связи 245
Трофофаза 230
Турбидостат 82

«Узкое место» **154**, **233**
Ультрамикробактерии (нанобактерии) 286
Урожай клеток **79**, 235

Фагоцитоз 102
Фаза замедления роста 76
Фаза отмирания 76
Фенотип 239
ФЕП-фосфотрансферазная система 236
Филлоплана 279
Филлосфера 279
Филогенетическая система 318
Филогенетический подход 12
Фимбрии 42
Фитанол 15
Фитоалексины 277
Фитонциды **279**, 304
Формы брожения по Нейбергу 120
Фосфорилирование 107
— мембранное 107
— нециклическое фотофосфорилирование 185
— субстратное 107
— циклическое фотофосфорилирование 184
Фотокинезис 196
Фотореактивация **100**, 239
Фотосинтез **100**, **182**
— аноксигенный **185**, 197
— оксигенный **185**, 197
Фототаксис 196
Фотофобная реакция 196
Фрагментация 291
Фракционирование изотопов 248
Функциональные дублиеры 282

Хемолитоавтотрофия 8, **167**
Хемостат 80
Хламидии 73, **334**
Хлоросома (хлоробиум-везикула) **182**, **190**, 192
Хлорофилл **182**, 226, 259
цАМФ 235

Циано-бактериальный мат 203, **209**
Цианобактерии **194**, 203, 209, 322
Цианофицин 34, **196**, 228
Цикл Арнона, или восстановительный ЦТК **173**, **191**, 217
Цикл дикарбоновых кислот 151
Цикл трикарбоновых кислот, или цикл Кребса 116
Циста 61
Цитоплазматическая мембрана 29
Цитрамалатный цикл 189

«Черные курильщики» **95**, 101,
Чистая культура 76

Элификаторы 284
Экологическая стратегия 281
Экология микроорганизмов 282
Экономический коэффициент 79
Экосистема 264
Экспоненциальная (логарифмическая) фаза 76
Экстремальные галофилы **15**, **87**, 319
Экстремофилы, зависящие от серных соединений 15
Экто- и эндомикориза 280
Элективные условия 76
Эндоспоры 55
Эндоцитоз 102
Энергетический заряд 236
Энергетический коэффициент 79
Энтеробактерии **126**, 328
Энтомопатогенные субстанции 309
Эффектор 232
Эффект Пастера 119

САР-белок 236
СО-дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза **132**, 137, 148
F-плазида (половая плазида) 29, **240**
Fe²⁺-оксидоредуктаза 176
L-форма 41
S-слои 54

Полужирным шрифтом выделены наиболее значимые страницы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	4
Глава 1. Микробиология как наука. История микробиологии	6
Микробиология как наука	6
История развития микробиологии	7
Современная микробиология	9
Глава 2. Систематика микроорганизмов	11
Основные понятия. Критерии определения микроорганизмов	11
Современная классификация микроорганизмов	12
Глава 3. Морфология микроорганизмов	18
Общие сведения	18
Размеры, форма и группирование клеток	20
Строение прокариотических клеток	25
Движение клеток	61
Размножение и развитие прокариот	64
Глава 4. Культивирование и рост микроорганизмов	71
Питание бактерий	71
Рост и развитие микроорганизмов	75
Культивирование микроорганизмов	76
Контроль роста микроорганизмов	82
Глава 5. Действие физико-химических факторов на микроорганизмы	86
Активность воды	86
Показатель кислотности среды (рН)	89
Температура	91
Гидростатическое давление	94
Наличие кислорода	96
Радиация	100
Глава 6. Метаболизм микроорганизмов	102
Проникновение веществ в клетку	102
Энергетические процессы у микроорганизмов	106
Общая схема катаболизма микроорганизмов	111
Брожения	118
Анаэробное дыхание	134

Аэробное дыхание	149
Фотосинтез	182
Глава 7. Фиксация молекулярного азота	211
Значение процесса азотфиксации	211
Микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот	211
Процесс фиксации молекулярного азота	213
Глава 8. Биосинтетические процессы у микроорганизмов	216
Общие понятия	216
Ассимиляция углерода	217
Метаболизм азота	220
Метаболизм серы	222
Пути синтеза основных органических соединений	222
Пути синтеза некоторых сложных веществ	225
Вторичные метаболиты	228
Глава 9. Регуляция метаболизма у микроорганизмов	231
Значение процессов регуляции	231
Основные способы регуляции микробного метаболизма	231
Глава 10. Наследственность и изменчивость микроорганизмов	239
Основные термины	239
Рекомбинация генетического материала у прокариот	240
Явление диссоциации у прокариот	241
Глава 11. Экология микроорганизмов	245
Методы исследования экологии микроорганизмов	245
Изучение активности микроорганизмов в природе	247
Сбор образцов	249
Обработка проб	253
Фенотипическое обнаружение микроорганизмов	254
Обнаружение микроорганизмов химическими методами	255
Обнаружение отдельных генов и геномных последовательностей	256
Определение численности микроорганизмов	257
Определение микробной биомассы	258
Количественная оценка метаболизма микроорганизмов	260
Генетически модифицированные микроорганизмы (ГЕМОМ) и их интродукция в природные ценозы	262
Роль микроорганизмов в природных местообитаниях	264
Взаимодействия микроорганизмов с другими организмами	266

Физиологический статус микроорганизмов в экосистемах	281
Проблема загрязнения природных экосистем и возможности самоочищения	290
Глобальные циклы основных биогенных элементов	292
Роль микроорганизмов в эволюции биосферы	294
Глава 12. Практическое применение микроорганизмов	298
Сферы использования микроорганизмов	298
Пищевые производства, основанные на микробном метаболизме	299
Порча пищевых продуктов	303
Болезнетворные микроорганизмы	307
Микробиологические процессы получения соединений различного назначения	308
Пути совершенствования микробиологических производств	311
Микробиологическая очистка сточных вод и переработка отходов	313
Биокоррозия промышленных и бытовых объектов и материалов	315
Микроорганизмы — инструменты научных исследований	316
Глава 13. Краткий систематический обзор микроорганизмов- прокариот	318
Общие понятия	318
Домен Archaea	319
Домен Bacteria	320
Список сокращений	338
Список литературы	341
Предметный указатель	343

Учебное издание

**Нетрусов Александр Иванович,
Котова Ирина Борисовна**

Микробиология

Учебник

Редактор *Л. В. Честная*
Технический редактор *О. Н. Крайнова*
Компьютерная верстка: *Л. А. Смирнова*
Корректоры *Г. Н. Петрова, В. А. Жилкина*

Изд. № А-1617-І. Подписано в печать 31.01.2006. Формат 60 × 90/16.
Гарнитура «Таймс». Печать офсетная. Бумага офсет. № 1. Усл. печ. л. 22,0.
Тираж 3000 экз. Заказ № 1975.

Издательский центр «Академия». www.academia-moscow.ru
Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.02.953.Д.004796.07.04 от 20.07.2004.
117342, Москва, ул. Бултерова, 17-Б, к. 360. Тел./факс: (495) 330-1092, 334-8337.

Отпечатано с готовых диапозитивов издательства в
ОАО «Тверской полиграфический комбинат», 170024, г. Тверь, пр-т Ленина, 5.
Телефон: (4822) 44-52-03, 44-50-34. Телефон/факс (4822) 44-42-15
Интернет/Home page - www.tverpk.ru Электронная почта (E-mail) - sales@tverpk.ru

