

А. И. Нетрусов, И. Б. Котова

МИКРОБИОЛОГИЯ: ТЕОРИЯ И ПРАКТИКА

Часть 1

УЧЕБНИК ДЛЯ БАКАЛАВРИАТА И МАГИСТРАТУРЫ

*Рекомендовано Учебно–методическим отделом высшего образования
в качестве учебника для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по естественнонаучным направлениям*

**Книга доступна в электронной библиотечной системе
biblio-online.ru**

Москва • Юрайт • 2018

Авторы:

Нетрусов Александр Иванович — доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заслуженный профессор Московского университета;

Котова Ирина Борисовна — доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, заслуженный преподаватель Московского университета.

Рецензенты:

Егоров Н. С. — доктор биологических наук, профессор Международного учебно-научного биотехнологического центра, заслуженный профессор Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, академик РАЕН, лауреат Государственной премии СССР;

Ножевникова А. Н. — доктор биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии антропогенных местообитаний Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, лауреат Государственной премии Российской Федерации.

Нетрусов, А. И.

Н57

Микробиология: теория и практика. В 2 ч. Часть 1 : учебник для бакалавриата и магистратуры / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. — М. : Издательство Юрайт, 2018. — 315 с. — Серия : Бакалавр и магистр. Академический курс.

ISBN 978-5-534-03805-7 (ч. 1)

ISBN 978-5-9916-5291-9

В учебнике представлены все основные разделы микробиологии. Выделены важнейшие вехи в истории микробиологии. Отмечено значение работ А. Левенгука, Л. Пастера, Р. Коха, С. Н. Виноградского, Д. И. Ивановского, М. Бейеринка, А. Клейвера, А. Флеминга. Изложены работы И. И. Мечникова и теория фагоцитоза. Рассмотрены свойства микроорганизмов, их признаки, принципы систематики. Рассказано о форме клеток и движении, физиологии и метаболизме микроорганизмов. Учебник знакомит студентов с основными методами изучения микроорганизмов в лаборатории и в природных местообитаниях. Внимание уделено повсеместному распространению микроорганизмов в биосфере, выполняемым ими функциям, биоразнообразию. Представлены сведения об эволюции жизни на Земле и роли прокариот в этом процессе. Рассмотрены симбиозы с участием микроорганизмов. Кратко изложены сведения о развитии инфекционных процессов у растений, животных и человека. Показана роль микроорганизмов в жизни людей, в решении глобальных энергетических и продовольственных проблем, защите окружающей среды и сохранении здоровья населения.

Соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования.

Для студентов, обучающихся по естественнонаучным направлениям «Биология», «Экология», «Зоология» и «Ботаника», «Охрана природы и ресурсов» в рамках дисциплин «Микробиология», «Экология», «Биохимия», «Охрана ресурсов», «Рациональное природопользование».

УДК 579(075.8)

ББК 28.4я73



Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».

ISBN 978-5-534-03805-7 (ч. 1)

ISBN 978-5-9916-5291-9

© Нетрусов А. И., Котова И. Б., 2017

© ООО «Издательство Юрайт», 2018

Оглавление

Предисловие	8
-------------------	---

Раздел I МИКРОБИОЛОГИЯ КАК НАУКА. ЕЕ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Глава 1. Предмет и задачи микробиологии, основные этапы ее развития	13
1.1. Микробиология и ее место в современной биологии	13
1.2. Основные события в истории микробиологии	14
1.2.1. Открытие микроорганизмов А. Левенгуком	14
1.2.2. Л. Пастер — родоначальник экспериментальной микробиологии.....	16
1.2.3. Изучение патогенных микроорганизмов Л. Пастером и Р. Кохом. Значение работ Дж. Листера	17
1.2.4. Микроорганизмы в природных процессах. Значение работ С. Н. Виноградского и М. Бейеринка	20
1.2.5. Открытие вирусов Д. И. Ивановским	21
1.2.6. Открытие пенициллина А. Флемингом.....	21
1.2.7. Значение работ А. Клейвера и К. ван Нила	23
1.2.8. Вклад российских ученых в развитие микробиологии	23
1.3. Значение микробиологических исследований в современном мире.....	27
1.3.1. Значение микроорганизмов в природных процессах, в народном хозяйстве и здравоохранении	27
1.3.2. Главные направления развития современной микробиологии и решение глобальных проблем человеческой цивилизации	27
Резюме	28
Вопросы и задания для самоконтроля.....	29
Глава 2. Методы микробиологии.....	30
2.1. Особенности работы с микроорганизмами.....	30
2.2. Микроскопические методы	30
2.2.1. Световая микроскопия	30
2.2.2. Электронная микроскопия.....	32
2.2.3. Другие современные виды микроскопии	32
2.2.4. Препараты для световой микроскопии.....	33
2.3. Контролируемое культивирование	35
2.3.1. Требования микроорганизмов к питательным веществам.....	35
2.3.2. Типы сред	37
2.3.3. Микробиологическая посуда и инструменты.....	39

2.3.4. Способы выделения чистых культур микроорганизмов	41
2.3.5. Особенности роста микробных культур	43
2.4. Методы хранения микробных культур	44
2.5. Методы стерилизации	44
2.5.1. Основные понятия	44
2.5.2. Термическая стерилизация	45
2.5.3. Холодная стерилизация	47
Резюме	48
<i>Практикум</i>	49
Глава 3. Строение микроорганизмов	59
3.1. Типы клеточной организации (эукариоты и прокариоты) и неклеточная форма жизни (вирусы)	59
3.2. Цитология прокариотической клетки	64
3.2.1. Основные молекулы и процессы	64
3.2.2. Ядерная зона и генетический аппарат клеток прокариот	65
3.2.3. Дополнительные генетические элементы микроорганизмов	67
3.2.4. Цитоплазма, включения и запасные вещества	68
3.2.5. Цитоплазматическая мембрана	69
3.2.6. Клеточная стенка	73
3.2.7. Пили	77
3.2.8. Капсулы	79
3.2.9. S-слои	80
3.3. Морфология клеток микроорганизмов	80
3.3.1. Размеры микробных клеток	80
3.3.2. Формы и устойчивые сочетания микробных клеток	81
3.3.3. Дифференциация у микроорганизмов	83
3.4. Способы движения микроорганизмов	84
3.4.1. Жгутиковое движение	84
3.4.2. Скольжение	87
3.4.3. Таксисы	88
Резюме	88
<i>Вопросы и задания для самоконтроля</i>	89
Глава 4. Размножение и развитие микроорганизмов. Их наследственность и изменчивость	90
4.1. Способы размножения микроорганизмов	90
4.2. Наследственная и ненаследственная изменчивость	91
4.3. Рекомбинация у прокариот	92
4.3.1. Трансформация	92
4.3.2. Трансдукция	93
4.3.3. Конъюгация	94
4.4. Гетерогенность популяции микроорганизмов, понятие о диссоциации	96
4.5. Микроорганизмы со сложными жизненными циклами и «коллективным» поведением	100
4.6. Покоящиеся формы микроорганизмов	101
4.7. Генетически модифицированные микроорганизмы	106

Резюме.....	108
<i>Практикум</i>	109
Глава 5. Рост и культивирование микроорганизмов.....	114
5.1. Основные параметры роста культур.....	114
5.2. Периодическое и непрерывное культивирование микроорганизмов	118
5.2.1. Особенности периодического культивирования.....	118
5.2.2. Непрерывное культивирование и его виды.....	119
5.2.3. Сбалансированный и несбалансированный рост, синхронные культуры	122
5.2.4. Некультивируемое состояние микроорганизмов.....	123
5.3. Возможности контроля роста микроорганизмов	123
5.3.1. Классификация антимикробных веществ.....	123
5.3.2. Антибиотики как особый класс антимикробных агентов	125
5.3.3. Проблема устойчивости к антимикробным веществам	125
Резюме.....	126
<i>Практикум</i>	127

Раздел II МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 6. Основные этапы и особенности микробного обмена веществ	133
6.1. Деление микроорганизмов по отношению к количеству и качеству питательных веществ. Типы питания.....	133
6.1.1. Основные термины	133
6.1.2. Олиготрофы и копиотрофы.....	133
6.1.3. Гидролитики и диссипотрофы.....	134
6.1.4. Типы питания.....	134
6.1.5. Миксотрофия	136
6.2. Проникновение веществ в клетки микроорганизмов	137
6.3. Единство метаболизма и его особенности у микроорганизмов.....	141
6.3.1. Принцип биохимического единства.....	141
6.3.2. АТФ — универсальная энергетическая валюта	142
6.3.3. ЭТЦ и ее компоненты	143
6.3.4. Ферменты и их классификация.....	148
Резюме.....	149
<i>Вопросы и задания для самоконтроля</i>	150
Глава 7. Энергетические процессы у микроорганизмов	151
7.1. Основные стадии катаболизма и его связь с анаболизмом.....	151
7.1.1. Пути использования сахаров.....	151
7.1.2. Дальнейшие превращения пирувата.....	154
7.1.3. Конечные пути окисления органических веществ.....	154
7.1.4. Особенности катаболизма анаэробных микроорганизмов	154
7.2. Брожения.....	156
7.2.1. Спиртовое брожение.....	157
7.2.2. Молочнокислое брожение.....	158

7.2.3. Пропионовокислое брожение.....	162
7.2.4. Смешанное (муравьинокислое) и бутандиоловое брожения.....	164
7.2.5. Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение.....	165
7.2.6. Гомоацетатное брожение.....	168
7.3. Виды анаэробного дыхания.....	170
7.3.1. Основные термины	170
7.3.2. Нитратное дыхание	171
7.3.3. Сульфатное дыхание	172
7.3.4. Серное дыхание	175
7.3.5. «Железное» дыхание	176
7.3.6. Фумаратное дыхание.....	178
7.3.7. Карбонатное дыхание.....	178
7.4. Модификации аэробного дыхания	183
7.4.1. Основные понятия	183
7.4.2. Особенности использования многоуглеродных субстратов микроорганизмами.....	185
7.4.3. Микробная биолюминесценция.....	187
7.4.4. Метилотрофия (использование одноуглеродных соединений).....	189
7.4.5. Хемолитоавтотрофия (окисление восстановленных неорганических соединений для получения энергии)	199
7.5. Фотосинтез	214
7.5.1. Основные понятия	214
7.5.2. Пурпурные бактерии	219
7.5.3. Зеленые бактерии	224
7.5.4. Гелиобактерии	229
7.5.5. Цианобактерии	230
7.5.6. Эритробактерии	236
7.5.7. Бесхлорофильный фотосинтез галоархей	239
7.5.8. Сравнительная характеристика групп фототрофных микроорганизмов.....	241
7.5.9. Симбиозы с участием фототрофных микроорганизмов	242
Резюме	244
<i>Практикум</i>	247
Глава 8. Конструктивный метаболизм у микроорганизмов.....	261
8.1. Связь анаболизма и катаболизма.....	261
8.2. Пути ассимиляции основных биогенных элементов	262
8.2.1. Ассимиляция углерода у микроорганизмов.....	262
8.2.2. Пути ассимиляции азота.....	265
8.2.3. Микробная ассимиляция серы	273
8.2.4. Ассимиляция фосфора микроорганизмами	274
8.2.5. Микробная ассимиляция железа	275
8.3. Основные стадии синтеза сложных органических веществ, биополимеров и запасных веществ у микроорганизмов.....	275
8.3.1. Синтез нуклеиновых кислот.....	275
8.3.2. Синтез белков	280

8.3.3. Синтез полисахаридов	282
8.3.4. Биосинтез липидов.....	284
8.3.5. Образование запасных веществ	286
8.3.6. Вторичные метаболиты	287
Резюме	288
<i>Практикум</i>	290
Глава 9. Регуляция обмена веществ у микроорганизмов	293
9.1. Способы регуляции микробного метаболизма	293
9.1.1. Основные уровни регулирования	293
9.1.2. Пространственное и временное разделение ферментов и метаболитов.....	293
9.1.3. Контроль активности ферментов.....	294
9.1.4. Управление синтезом ферментов	296
9.2. Регуляция клеточного цикла.....	300
Резюме	301
<i>Вопросы и задания для самоконтроля</i>	302
Список литературы.....	303
Предметный указатель.....	304

Предисловие

Предлагаемый учебник, состоящий из двух частей, рассчитан на студентов биологических специальностей университетов. Материал издания изложен в соответствии с программой курса лекций по общей микробиологии, разработанной на кафедре микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова, и базируется на лекциях, прочитанных студентам биохимических, физиологических, зоологических и ботанических специальностей университета.

Авторы представили современные сведения о мире микроорганизмов в наиболее компактной форме с огромным количеством рисунков и схем, которые позволяют быстрее и лучше понять суть изучаемых понятий. Наряду с традиционным материалом, описанным в курсе микробиологии по биохимии, физиологии и генетике микроорганизмов, в сборнике дана актуальная информация о систематике прокариот, основанная на анализе последовательностей гена, кодирующего синтез 16S рРНК, о методах современной экологии микроорганизмов, морфологии и цитологии прокариот.

Учебник содержит пять разделов, включающих 18 глав, в которых рассказано об основных свойствах микроорганизмов, начиная от строения клетки, метаболизма, генетики прокариот до биотехнологического применения микробов для хозяйственной деятельности человека. Небольшой раздел посвящен патогенным микроорганизмам и описанию болезней, ими вызываемых. В конце учебника приведен краткий обзор систематических групп микроорганизмов, основанный на современной молекулярно-биологической их классификации. Каждый параграф сборника содержит вопросы и задания для самоконтроля, предоставляющие возможность для творчества преподавателей и углубления практических навыков студентов, и суммирующие заключения-резюме, в сжатой форме повторяющие прочтенную информацию.

Издание в двух частях удовлетворяет требованиям общероссийских стандартов специальностей «Биология», «Микробиология» и других биологических дисциплин и может быть рекомендовано в качестве базового учебника по микробиологии для подготовки студентов-бакалавров всех биологических специальностей: «Микробиология», «Зоология», «Ботаника», «Физиология», «Генетика», «Биофизика», «Биохимия», «Антропология» и др.

Данный учебник состоит из двух книг и соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования (ФГОС ВО) по направлениям: биология, экология, зоология и ботаника, охрана природы и ресурсов в рамках дисциплин:

микробиология, экология, биохимия, охрана ресурсов, рациональное природопользование.

Методический уровень информации достойно высок — учебник в двух частях может и должен быть использован при любой из применяемых в высшей школе образовательной технологии: он написан простым языком и подходит как для самостоятельной подготовки студентов, так и для аудиторных занятий.

При написании двух частей учебника были соблюдены современные психолого-педагогические требования к трактовке излагаемого материала и его применению в ходе преподавания курса микробиологии в высшей школе.

По окончании курса микробиологии студенты, успешно сдавшие экзамены, будут:

знать

- основные группы микроорганизмов, их метаболизм и роль в окружающей среде;

уметь

- выращивать сапротрофные микроорганизмы на соответствующих средах и изучать их свойства;

владеть

- навыками выделения микроорганизмов из природных местообитаний с целью их количественного учета и определения систематического положения.

В обе части учебника вошел весь материал, который был накоплен преподавателями и научными сотрудниками кафедры микробиологии МГУ по дидактике и методологии изложения курсов общей микробиологии для студентов, специализирующихся по специальности «Микробиология», а также для студентов других биологических специальностей университетов и вузов. Учебник является первым опытом написания и издания учебника такого рода, поэтому в нем могут быть недочеты, которые авторы постараются исправить в последующих изданиях. Они были бы признательны за высказанные замечания и пожелания, которые можно присылать в адрес редакции.

Настоящий учебник написан: А. И. Нетрусовым, доктором биологических наук, профессором, заведующим кафедрой микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова и И. Б. Котовой, доктором биологических наук, профессором кафедры микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова.

Раздел I
МИКРОБИОЛОГИЯ КАК НАУКА.
ЕЕ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ



Глава 1

ПРЕДМЕТ И ЗАДАЧИ МИКРОБИОЛОГИИ, ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ЕЕ РАЗВИТИЯ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- историю и основные этапы развития микробиологии;

уметь

- определять роль различных исследователей в развитии микробиологических методов;

владеть

- навыками объяснения роли микроорганизмов в природных процессах.
-

1.1. Микробиология и ее место в современной биологии

Микробиология (от греч. «микрос» — малый; «биос» — жизнь; «логос» — учение) — это наука о живых организмах, не видимых невооруженным человеческим глазом (размером не более 1 мм).

Критерию малого размера соответствуют представители нескольких групп живых существ — археи, бактерии, простейшие, микроскопические водоросли и низшие грибы, которые и составляют объекты микробиологии.

Организмы, которые можно рассмотреть только в увеличительные приборы, называются **микроорганизмами**.

Подавляющее большинство микроорганизмов являются одноклеточными, но внутреннее строение клеток у представителей разных групп существенно различается: археи и бактерии относятся к прокариотам, а простейшие, микроводоросли и низшие грибы — к эукариотам. Некоторые микроорганизмы предпочтительно существуют не как отдельные клетки, а в виде устойчивых ассоциаций, где разные клетки могут различаться по морфологии, занимать различное положение в пространстве и даже специализироваться на выполнении определенных функций.

Термин «микроорганизм» не имеет таксономического смысла, так как мельчайшие одноклеточные представители могут входить в одну таксономическую группу с многоклеточными организмами, иногда гигантских размеров. Например, низшие плесневые грибы являются «родственниками» шляпочным грибам, употребляемым человеком в пищу, а среди водорослей наряду с микроскопическими особями существуют такие, как ламинария, отличающиеся значительными размерами. Микроорганизмы представляют

собой самую большую группу живых существ на Земле, и ее члены распространены повсеместно.

Специфика объектов микробиологии, которые, с одной стороны, в большинстве своем являются одной клеткой, а с другой — представляют собой полноценный организм, определяет особое место микробиологии в системе биологических наук. Как наука об определенном классе объектов и их разнообразии микробиология аналогична таким дисциплинам, как ботаника и зоология. В то же время она относится к физиолого-биохимической ветви биологических дисциплин, так как изучает функциональные возможности микроорганизмов, их взаимодействие с окружающей средой и другими организмами.

Микробиология — это наука, исследующая общие фундаментальные законы существования всего живого, явления на стыке одно- и многоклеточности, развивающая представления об эволюции живых организмов.

Микробиология подразделяется на ряд дисциплин. Например, исследования основных законов существования микроорганизмов и их разнообразия относят к **общей микробиологии**, а **частная микробиология** изучает особенности их разных групп. **Природоведческая микробиология (экология микроорганизмов)** занимается изучением роли микроорганизмов в естественных местах обитания, **медицинская** и **ветеринарная микробиология** имеют дело с микроорганизмами, вызывающими заболевания человека и животных, **сельскохозяйственная** — исследует микробные процессы в земледелии и животноводстве, **почвенная, морская, космическая** и т.д. **микробиология** — это разделы, посвященные свойствам специфических для этих природных сред микроорганизмов и процессам, с ними связанным, **промышленная микробиология (микробная биотехнология)** как часть биотехнологии изучает микроорганизмы, используемые для различных производств, и т.д.

1.2. Основные события в истории микробиологии

1.2.1. Открытие микроорганизмов А. Левенгуком

История микробиологии берет свое начало с середины XVII в., когда были изобретены первые **микроскопы** и стало известно о существовании целого мира мельчайших живых существ. Первооткрывателем мира микробов стал голландский торговец сукном Антони ван Левенгук (1632—1723), который в свободное от коммерции и общественных обязанностей время занимался конструированием увеличительных приборов (рис. 1.1). Существующие в то время микроскопы были двух типов: **простые** имели одно увеличительное стекло с очень коротким фокусным расстоянием, а у **сложных** присутствовали две системы линз — объектив и окуляр. А. Левенгук в своих микроскопах использовал одну тщательно отшлифованную короткофокусную линзу, закрепленную в металлическую оправу, перед ней была помещена толстая игла, которую можно было передвигать с помощью двух фокусирующих винтов. К кончику этой иглы прикреплялся исследуемый

объект. Увеличение менять было нельзя. Наблюдатель должен был приложить линзу к глазу и через нее рассматривать объект на кончике иглы.

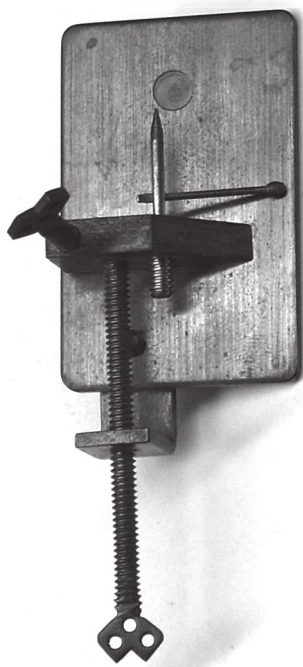


Рис. 1.1. Один из микроскопов А. Левенгука

Несмотря на простоту, такие микроскопы позволяли достичь увеличения от 50 до 270 раз и увидеть микроскопические существа, которые Левенгук назвал «зверушками». Он описал представителей основных групп микроорганизмов (простейших, плесневые грибы и дрожжи, различные формы бактерий — палочковидные, сферические, извитые), характер их движения и устойчивые сочетания клеток. Левенгук не получил серьезного образования, но, будучи по складу характера любознательным и наблюдательным человеком, сумел исследовать под микроскопом огромное количество объектов и сделать очень точные рисунки. Следует отметить его вклад в развитие других биологических дисциплин, поскольку Левенгук изучал различные субстраты естественного и искусственного происхождения, микроструктуру растительных и животных клеток, сперматозоиды и эритроциты, строение сосудов растений и животных, особенности развития мелких насекомых. Он с удовольствием демонстрировал свои препараты многочисленным гостям, в числе которых были английская королева и Петр I.

Данные открытия так и остались бы известными лишь достаточно узкому кругу его посетителей, если бы приблизительно в то же время не было создано Английское Королевское общество, которое имело целью поддерживать обмен информацией среди научной общественности. Именно туда Левенгук с 1661 г. посылал описания своих наблюдений, сопровожда-

емые тщательными зарисовками. Эти письма были переведены со староголландского на английский язык и опубликованы в трудах Общества.

После его смерти микроскопическое исследование микроорганизмов долго сдерживалось несовершенством увеличительных приборов. Введение ряда усовершенствований в конструкцию светового микроскопа к середине XIX в. упростило микроскопические наблюдения и позволило другим исследователям детально описать основные группы микроорганизмов.

1.2.2. Л. Пастер — родоначальник экспериментальной микробиологии

Экспериментальный этап развития микробиологии, исчисляемый приблизительно с середины XIX в., связан с именами французского химика-кристаллографа Луи Пастера и немецкого сельского врача Роберта Коха. Эти ученые существенно обогатили методологический арсенал микробиологии.

Первой биологической работой Л. Пастера (1822—1895) стало исследование причин прокисания партии вина, проведенное по просьбе виноделов г. Лилля. При изучении процесса сбраживания виноградного сока ученый доказал, что причиной химических изменений субстратов являются микроорганизмы (дрожжи), а порчу вина вызывают другие микроорганизмы, деятельность которых приводит к появлению посторонних запахов, вкусов и ослизнению напитка. Для предохранения от порчи Пастер предложил нагревать вино в закрытых сосудах до 70°C сразу после брожения, чтобы уничтожить посторонние бактерии. Такой способ тепловой обработки продуктов, получивший название **пастеризация**, применяют и сегодня для увеличения сроков хранения молока, вина и пива.

Исследуя другие виды брожения, Пастер показал, что состав конечных продуктов зависит от того, какая группа микроорганизмов развивается в питательной среде.

Изучение маслянокислых бактерий привело ученого к открытию **бескислородного (анаэробного) образа жизни**, при котором кислород не только не нужен, но и вреден для таких микроорганизмов и угнетает их жизнедеятельность.

В то же время есть значительное число микроорганизмов, для которых наличие молекулярного кислорода — это необходимое условие их существования. Такие организмы Пастер назвал **аэробными**.

Доказательство способности изменять свой обмен веществ в зависимости от наличия или отсутствия кислорода воздуха ученый получил, работая с дрожжами: в бескислородных условиях дрожжи осуществляли брожение, превращая сахар в спирт и углекислый газ, а в присутствии кислорода переходили на аэробное дыхание, когда основным конечным продуктом становился CO₂, спирт практически не образовывался, а клеток накапливалось значительно больше.

Пастер сделал вывод о том, что аэробный обмен веществ более выгоден, чем анаэробный, а микроорганизмы, способные к такому переключению, получили название **факультативных анаэробов**.

В это время среди научной общественности происходила бурная дискуссия о возможности самозарождения живых существ из неживой мате-

рии в обычных условиях. Противники такого взгляда пытались доказать, что даже мельчайшие организмы возникают только из живых «зародышей» или «семян». Ко времени открытия мира микробов вопрос о самозарождении животных и растений из неживого материала был уже решен отрицательно, а относительно микроорганизмов спор продолжался. Убедительные опыты итальянского ученого Ладзаро Спалланцани и французского исследователя Франсуа Аппера по длительному прогреванию питательного бульона или пищи в герметичных сосудах для предотвращения развития микробов подвергались критике сторонников теории самозарождения из-за замкнутости пространства, куда не может проникнуть некая «жизненная сила». Пастером был проведен убедительный эксперимент, поставивший точку в этой дискуссии: прогретый питательный бульон он поместил в открытый стеклянный сосуд, горлышко которого было вытянуто трубкой и S-образно изогнуто (рис. 1.2). Это позволяло воздуху беспрепятственно проникать внутрь колбы, а клетки микроорганизмов оседали в нижнем изгибе горлышка и не попадали в бульон. В этом случае бульон мог оставаться стерильным неопределенно долго. Если же колбу наклонить так, что жидкостью будет заполнен нижний изгиб, а затем вернуть бульон обратно в сосуд, то внутри быстро начнут развиваться микроорганизмы.

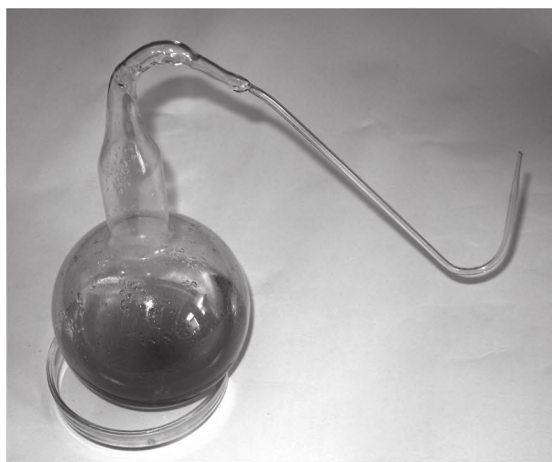


Рис. 1.2. Колба для опыта по опровержению возможности самозарождения жизни

1.2.3. Изучение патогенных микроорганизмов Л. Пастером и Р. Кохом. Значение работ Дж. Листера

Работы по изучению возбудителей «болезней» пива и вина привели Л. Пастера к мысли, что микроорганизмы, возможно, являются возбудителями инфекционных заболеваний человека и животных. Ученому удалось выделить возбудителей ряда болезней и изучить их свойства. Опыты показали, что при определенных условиях **болезнетворные (патогенные) микроорганизмы** становились менее агрессивными и не убивали зараженный организм. Пастер сделал вывод о возможности прививать ослабленных возбудителей здоровым и зараженным людям и животным, чтобы

стимулировать защитные силы организма в борьбе с инфекцией. В память о работах Эдварда Дженнера, предложившего прививать людям коровью оспу, чтобы спасти их от смертельной черной оспы, ученый назвал материал для прививок **вакциной**, а сам процесс — **вакцинацией**. Пастером были разработаны способы прививок против некоторых опасных заболеваний сельскохозяйственных животных и человека, в том числе и против такой смертельной болезни, как бешенство (хотя в дальнейшем стало известно, что возбудителем является вирус, а не бактерия). Позже во многих странах, в том числе и в России (в 1886 г.), были открыты пастеровские станции прививок от бешенства.

Роберт Кох (1843—1910) начал свои микробиологические исследования с экспериментального доказательства того, что сибирская язва — опасное заболевание домашних животных, передаваемое человеку, вызывается бактериями. При этом он использовал мелких подопытных животных и наблюдал под микроскопом развитие бактериальных клеток в кусочках тканей зараженных мышей. При работе с возбудителями Кохом были разработаны методы выращивания бактерий вне организма, различные способы окраски препаратов для микроскопии и предложена схема получения чистых культур (т.е. содержащих микроорганизмы только одного вида) на твердых средах в виде отдельных колоний.

Кох окончательно сформулировал и экспериментально подтвердил постулаты, названные в дальнейшем **триадой Коха**, доказывающие микробное происхождение заболевания.

1. Микроорганизм должен присутствовать в материале больного и быть выделенным в виде чистой культуры.

2. Чистая культура предполагаемого возбудителя должна вызывать ту же болезнь у подопытного животного.

3. Выделенный в чистую культуру при экспериментально вызванном повторном заболевании возбудитель должен быть идентичен первой чистой культуре.

При работе с возбудителем сибирской язвы *Bacillus anthracis* ученый сделал вывод, что устойчивость этих бактерий в окружающей среде связана с образованием ими особых плотных телец (эндоспор), которые в течение длительного времени способны заражать скот в тех местах, где ранее находились или были захоронены больные люди и животные (рис. 1.3).

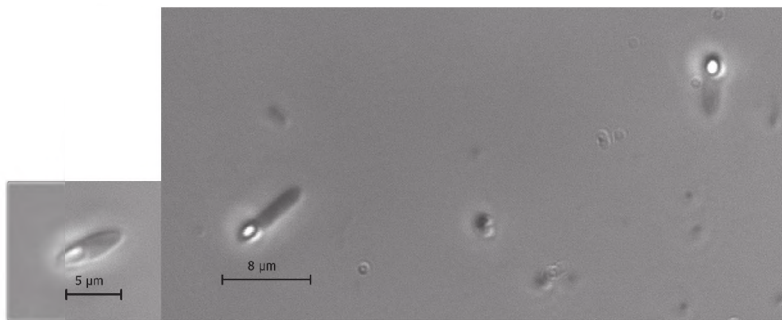


Рис. 1.3. Эндоспоры в микробных клетках

Коха по праву считают основоположником медицинской микробиологии, поскольку он выделил в виде чистых культур и изучил свойства возбудителей многих серьезных заболеваний (холеры, бубонной чумы, столбняка, туберкулеза и др.). Микобактерии туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) в честь своего первооткрывателя часто называют «палочками Коха». В его лаборатории было начато широкое использование в микробиологических исследованиях твердых сред на основе сначала желатина, а затем и агара. Знаменитая чашка Петри и бактериальные фарфоровые фильтры Шамберлана также были введены в практику сотрудниками института Р. Коха. Методы, разработанные Кохом и его сотрудниками, в настоящее время применяют ученые, работающие в самых разных областях микробиологии. В 1905 г. он был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине за разработку метода дифференциальной окраски препаратов, позволившей обнаруживать клетки микробактерий туберкулеза в легочной ткани.

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

Английский хирург Джозеф Листер (1827—1912) разработал и ввел в медицинскую практику принцип **антисептики**. В этот период при хирургических операциях смертность достигала 25—90% из-за послеоперационного сепсиса. Скученность, грязь и соседство пациентов с гноящимися ранами, вода и мыло как единственный способ очистки рук персонала, медицинских инструментов и материалов, грязная одежда хирургов, в которой проводились как операции, так и вскрытие трупов, приводили к быстрой передаче инфекции от одного больного к другому. Большинство врачей полагало, что причиной заражения может быть «испорченный воздух» или «миазмы». Русский хирург Николай Иванович Пирогов (1810—1881) и австрийский врач Игнац Филипп Земмельвейс (1818—1865) для предотвращения перенесения «миазмов» с раны на рану руками персонала, перевязочным материалом, инструментами, независимо друг от друга предложили использовать в качестве дезинфицирующих средств хлорную известь, этанол, спиртовую настойку йода, азотнокислое серебро. Опыты Пастера привели Листера к мысли, что как брожение и гниение вызывается мельчайшими живыми существами, так и нагноение ран может происходить под действием микробов, находящихся в воздушной пыли. Листер предположил, что те же средства, что препятствуют возникновению брожения и гниения, могут предотвратить возникновение болезней, приводящих к госпитализации. Он рассматривал неповрежденную кожу человека как барьер, препятствующий проникновению из воздуха к тканям тела микробных клеток, вызывающих разложение. Чтобы избежать заражения при повреждении кожи (образовании открытых ран), необходимо обезвреживать воздух путем нагревания, фильтрации или с помощью веществ-антисептиков. В 1865 г. Листер предложил комплекс мероприятий по борьбе с хирургической инфекцией (наложение на раны герметичных антисептических повязок, распыление карболовой кислоты в воздухе операционной, применение стерилизованных дренажных трубок, марли и кетгута). С введением этих мероприятий смертность после операций из-за септических

осложнений резко снизилась. В дальнейшем антисептический принцип хирурга подвергся значительным изменениям, поскольку было установлено, что основное инфицирование ран происходит путем контакта рук персонала с загрязненными микроорганизмами предметами, а не через воздух. Он был существенно дополнен принципом **асептики**, согласно которому уже к началу операции стерильными должны быть руки медперсонала, операционное поле, инструменты и материалы. В честь Дж. Листера один из родов бактерий назван *Listeria*.

1.2.4. Микроорганизмы в природных процессах. Значение работ С. Н. Виноградского и М. Бейеринка

Изучению роли микроорганизмов в природных процессах на нашей планете посвящены работы русского ученого Сергея Николаевича Виноградского (1856—1953) и голландского исследователя Мартина Бейеринка (1851—1931).

Независимо друг от друга эти ученые изучали группы микроорганизмов, способных осуществлять химические превращения основных элементов и участвовать в биологически важных круговоротах на Земле. С. Н. Виноградский работал с микроорганизмами, использующими неорганические соединения серы (рис. 1.4, *а*), азота, железа, и открыл уникальный образ жизни прокариотических микроорганизмов — **хемолитоавтотрофию**, при которой микробная клетка для получения энергии окисляет восстановленные неорганические соединения, а для биосинтезов использует углерод углекислого газа.

К такому способу существования не способны ни животные, ни растения. Виноградский и Бейеринк открыли также способность некоторых прокариот фиксировать атмосферный молекулярный азот, т.е. использовать его в своем конструктивном обмене. Учеными были выделены свободноживущие (рис. 1.4, *б*) и симбиотические микроорганизмы-**азотфиксаторы**. При этом была показана глобальная роль таких микроорганизмов в **цикле азота**: микроорганизмы использовали газообразный азот для синтеза компонентов клетки, тем самым переводя его в связанные формы, становящиеся доступными для других организмов после отмирания клеток азотфиксаторов.

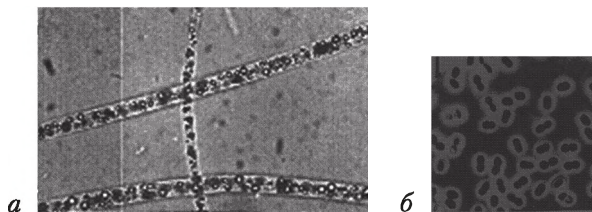


Рис. 1.4. Микроскопические препараты:

а — нити *Beggiatoa* sp., окисляющей сероводород и накапливающей серу; *б* — клетки азотфиксирующей бактерии *Azotobacter* sp. с капсулами

При работе с образцами из природных источников, где всегда присутствует смесь микроорганизмов, обладающих различными свойствами, учеными был применен новый **метод накопительных культур**, с успехом используемый и современными микробиологами. Он заключается в создании определенных условий роста (**элективных условий**), обеспечивающих преимущественное развитие желаемой группы микроорганизмов. В такой культуре количество клеток данной группы существенно превосходит содержание всех других микроорганизмов, которые также изначально присутствовали в пробе. Поэтому из накопительной культуры значительно проще получить чистую культуру преобладающего микроорганизма.

1.2.5. Открытие вирусов Д. И. Ивановским

На рубеже XIX—XX вв. русский физиолог растений и микробиолог Дмитрий Иосифович Ивановский (1864—1920) открыл вирус табачной мозаики. Исследуя инфекционную природу мозаичной болезни растений табака, ученый для очистки сока растения от возбудителя применил пропускание через фильтр, задерживающий бактериальные клетки. Однако вопреки ожиданиям, профильтрованный сок растения сохранил инфекционность, т.е. возбудитель оказался гораздо меньше всех известных микроорганизмов. Позже появились данные, что многие распространенные заболевания вызываются подобными возбудителями, которые назвали **вирусами**. Только применение электронной микроскопии в дальнейшем позволило установить, что это особая группа биологических объектов, не имеющих клеточного строения (рис. 1.5). Изучением вирусов в настоящее время занимается наука **вирусология**.

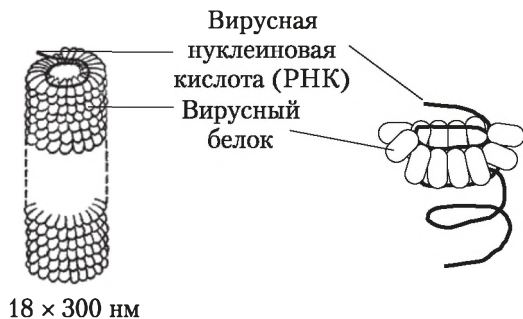


Рис. 1.5. Схема строения вируса табачной мозаики

1.2.6. Открытие пенициллина А. Флемингом

Открытие, совершенное английским бактериологом и иммунологом Александром Флемингом (1881—1955), имело не только научное, но и практическое значение для всего человечества. В 1929 г. им был открыт первый **антибиотик** — пенициллин, что в дальнейшем привело к разработке целого класса лекарственных препаратов. Начав работать в бактериологической лаборатории, ученый заинтересовался вопросами развития инфекционных болезней и воздействием различных химических препаратов на их течение. Такие препараты применялись при непосредствен-

ном лечении больных. Так, Флеминг изучал применение сальварсана для борьбы с сифилисом, а также ставил опыты с использованием **антисептиков** (соединений, препятствующих заражению) при фронтовых ранениях. Во время Первой мировой войны призванный в армию в качестве офицера медицинской службы, Флеминг имел возможность наблюдать трагические последствия загрязнения рваных ран землей и кусками одежды — в госпитале раненые сотнями умирали от заражения крови. Повязки с борной, карболовой кислотами и перекисью водорода ненамного облегчали состояние больных. Чтобы понять, как развивается инфекция, ученый создал модель из стекла, повторяющую сложную форму рваной раны, и заполнил ее питательной средой, загрязненной навозом. Многократное промывание стеклянной «раны» раствором сильного антисептика и последующее заполнение ее чистой средой показало, что в неровностях «раны» сохраняются микроорганизмы, которые размножаются затем в свежей среде. Этот опыт показал, что при фронтовых ранениях антисептики неэффективны, а все отмирающие ткани следует тщательно удалять хирургическим путем, тем самым очищая рану и способствуя притоку фагоцитов, уничтожающих микроорганизмы. Желание найти средство борьбы с заражением крови привело Флеминга к открытию **лизоцима**, содержащегося в слезной жидкости и слизистых выделениях человека и убивающего некоторые болезнетворные бактерии. Эти исследования требовали осуществления множества посевов на твердые среды в чашках Петри, которые длительное время сохранялись Флемингом и многократно просматривались. Наблюдательность ученого позволила ему заметить, что в тех чашках, куда случайно попали споры грибов и выросли колонии плесени, вокруг этих колоний не было роста бактерий (рис. 1.6).

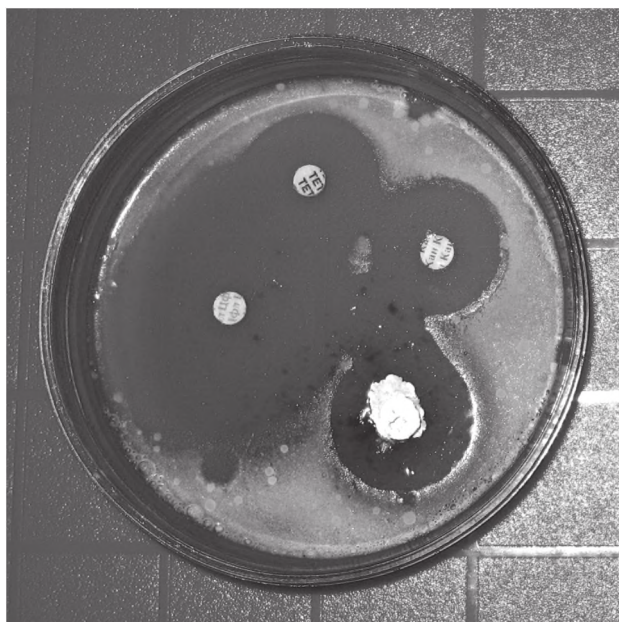


Рис. 1.6. Чашка Петри с зонами задержки роста

Поставленные с плесневым грибом опыты показали, что выделяемое им вещество губительно для бактерий, но не опасно для подопытных животных. Флеминг назвал это вещество **пенициллином** по латинскому названию производящего его гриба (*Penicillium*). Однако применение пенициллина в качестве лекарства стало возможным только после выделения его из питательного бульона в химически чистом виде в 1940 г. Х. Флори и Э. Чейном, получившими в 1945 г. Нобелевскую премию совместно с А. Флемингом. Исследования пенициллина повлекли за собой поиск новых продуцентов антимикробных веществ и открытие новых антибиотиков. Так, в 1944 г. американским микробиологом Зелманом Ваксманом (1888—1973) был получен широко применяемый антибиотик **стрептомицин**, который образовывали ветвящиеся бактерии рода *Streptomyces*.

1.2.7. Значение работ А. Клейвера и К. ван Нилы

Ко второй половине XIX в. микробиологами был накоплен огромный материал, свидетельствующий о чрезвычайном разнообразии типов микробного обмена веществ. Изучению многообразия жизненных форм и выявлению их общих черт посвящены работы голландского микробиолога и биохимика Альберта Яна Клейвера (1888—1956) и его учеников. Под его руководством было проведено сравнительное изучение биохимии далеко отстоящих друг от друга систематических и физиологических групп микроорганизмов, а также анализ данных физиологии и генетики. Эти работы позволили сделать вывод об однотипности макромолекул, составляющих все живое, и об универсальности биологической «энергетической валюты» — молекул АТФ. Разработка общей схемы метаболических путей в значительной степени базируется на исследованиях фотосинтеза высших растений и бактерий, проведенных учеником А. Я. Клейвера Корнелиусом ван Нилем (1897—1985). К. ван Ниль изучил обмен веществ различных фотосинтезирующих прокариот и предложил обобщающее суммарное уравнение фотосинтеза: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{A} + h\nu \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + \text{A}$, где H_2A — либо вода, либо другое окисляемое вещество. Такое уравнение предполагало, что именно вода, а не углекислый газ, разлагается при фотосинтезе с выделением кислорода. К середине XX в. выводы А. Я. Клейвера и его учеников (в частности, К. ван Ниль) легли в основу принципа **биохимического единства жизни**.

1.2.8. Вклад российских ученых в развитие микробиологии

Большой вклад в достижения микробиологии внесли российские исследователи, работающие над проблемами как общей, так и медицинской микробиологии. Впоследствии именами многих из них были названы различные научные учреждения нашей страны. Так, Лев Семенович Ценковский (1822—1887) наряду с изучением биологии микроорганизмов разработал способ прививки против сибирской язвы с применением живой вакцины и организовал пастеровскую станцию вакцинации в Харькове.

Известный физиолог Илья Ильич Мечников (1845—1916) разработал **фагоцитарную теорию иммунитета**, рассматривавшую процесс поглоще-

ния лейкоцитами животных чужеродных агентов как защитную реакцию макроорганизма.

Инфекционное заболевание представлялось в этом случае как противостояние патогенных микроорганизмов и фагоцитов организма-хозяина. В дальнейшем, работая в бактериологических лабораториях сначала в Одессе, а потом в Париже, И. И. Мечников продолжал изучение фагоцитоза, а также принимал участие в исследовании возбудителей сифилиса, холеры и других инфекционных заболеваний и разработке ряда вакцин. На склоне лет И. И. Мечников заинтересовался проблемами старения человека и обосновал полезность использования в пище больших количеств кисломолочных продуктов, содержащих «живые» закваски. Он пропагандировал использование суспензии молочнокислых микроорганизмов, утверждая, что такие бактерии и образуемые ими молочнокислые продукты способны подавлять гнилостные микроорганизмы, производящие вредные шлаки в кишечнике человека.

В 1909 г. за труды по иммунитету русский физиолог И. И. Мечников и немецкий врач-биохимик Пауль Эрлих получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине.

П. Эрлих (1854—1915), занимаясь экспериментальной медициной и биохимией лекарственных соединений, сформулировал **гуморальную теорию иммунитета**, согласно которой макроорганизм для борьбы с инфекционными агентами производит специальные химические вещества — антитела и антитоксины, нейтрализующие микробные клетки и выделяемые ими агрессивные субстанции.

П. Эрлих разработал методы лечения ряда инфекционных заболеваний и участвовал в создании препарата для борьбы с сифилисом (сальварсана). Ученый первым описал феномен приобретения патогенными микроорганизмами устойчивости к лекарственным препаратам.

Русский эпидемиолог Николай Федорович Гамалея (1859—1948) изучал пути передачи и распространения таких серьезных инфекций, как бешенство, холера, оспа, туберкулез, сибирская язва и некоторые заболевания животных. Им усовершенствован разработанный Л. Пастером способ профилактических прививок и предложена вакцина против холеры человека. Ученый разработал и внедрил комплекс санитарно-гигиенических и противоэпидемических мероприятий по борьбе с чумой, холерой, оспой, сыпным и возвратным тифами и другими инфекциями. Н. Ф. Гамалея открыл вещества, растворяющие бактериальные клетки (**бактериолизины**), описал явление **бактериофагии** (взаимодействия вирусов и бактериальной клетки) и внес существенный вклад в изучение микробных токсинов. Георгий Норбертович Габричевский (1860—1907) предложил способ лечения дифтерии с помощью сыворотки и участвовал в организации производства бактериальных препаратов в России. Его ученица Прасковья Васильевна Циклинская (1859—1923) проводила исследования нормальной микрофлоры кишечника человека, ее изменений в зависимости от возраста, питания и условий жизни. Ее докторская диссертация была посвящена изучению термофильных микроорганизмов. Даниилу Кирилловичу Заболотному (1866—1929) принадлежит учение о природ-

ной очаговости чумы. Ученик С. Н. Виноградского Василий Леонидович Омелянский (1867—1928) исследовал микроорганизмы, участвующие в превращениях соединений углерода, азота, серы и в процессе анаэробного разложения целлюлозы. Его работы расширили представления о деятельности микроорганизмов почвы. В. Л. Омелянский предложил схемы круговоротов биогенных элементов в природе. Георгий Адамович Надсон (1867—1940) сначала занимался микробной геохимической деятельностью и воздействием различных повреждающих факторов на микробные клетки, а затем изучал наследственность и изменчивость микроорганизмов и показал возможность получения устойчивых искусственных мутантов под действием излучений.

Одним из основоположников морской микробиологии является Борис Лаврентьевич Исаченко (1871—1948). Им была высказана гипотеза о биогенном происхождении месторождений серы и кальция. Украинский ботаник и микробиолог Николай Григорьевич Холодный (1882—1953) известен своими трудами по биологии железобактерий и разработкой методов прижизненного наблюдения почвенных микроорганизмов.

Основы управляемого культивирования грибов и водорослей заложены Евгением Евгеньевичем Успенским (1889—1945), который заведовал организованной по его инициативе кафедрой микробиологии МГУ. Ученый изучал влияние физико-химических факторов среды на морфологию и физиологию микроорганизмов, работал над проблемами биоэнергетики и основами микробиологической очистки воды. Е. Е. Успенский является основателем журнала «Микробиология».

Владимира Николаевича Шапошникова (1884—1968) по праву считают основателем отечественной технической микробиологии. Его работы по физиологии микроорганизмов посвящены изучению различных видов брожения. Им открыто явление двухфазности ряда микробиологических процессов и разработаны способы управления ими. Исследования В. Н. Шапошникова стали основой для организации в СССР микробиологических производств органических кислот и растворителей.

Работы Зинаиды Виссарионовны Ермольевой (1898—1974) внесли существенный вклад в изучение физиологии и биохимии микроорганизмов, медицинскую микробиологию, а также способствовали становлению микробиологического производства ряда отечественных лекарственных препаратов. Так, она исследовала возбудителей холеры и другие холероподобные вибрионы, их взаимодействие с организмом человека и предложила санитарные нормы хлорирования водопроводной воды в качестве средства профилактики этого опасного заболевания. Ею был создан и применен для профилактики препарат холерного бактериофага, а в дальнейшем — и комплексный препарат против холеры, дифтерии и брюшного тифа. Для контроля эпидемиологической ситуации был успешно внедрен метод экспресс-диагностики холеры, разработанный З. В. Ермольевой и ее сотрудниками. Применение **лизозима** в медицинской практике основано на работах З. В. Ермольевой по обнаружению новых растительных источников лизозима, установлению его химической природы, разработке метода выделения и концентрирования. Неоценимой заслугой З. В. Ермольевой являются

получение отечественного штамма продуцента пенициллина и организация промышленного производства препарата пенициллина-крустозина в годы Великой Отечественной войны. Эти исследования стимулировали поиск и селекцию отечественных продуцентов других антибиотиков (стрептомицина, тетрациклина, левомицетина, эсмолина).

Работы Николая Александровича Красильникова (1896—1973) посвящены изучению мицелиальных прокариотических микроорганизмов — актиномицетов. Подробное исследование свойств этих микроорганизмов позволило Н. А. Красильникову создать определитель актиномицетов. Ученый был одним из первых исследователей явления антагонизма в мире микробов, что позволило ему выделить актиномицетный антибиотик мицетин. Н. А. Красильников изучал также взаимодействие актиномицетов с другими бактериями и высшими растениями. Его работы по почвенной микробиологии посвящены роли микроорганизмов в почвообразовании, распределению их в почвах и влиянию на плодородие.

Большой вклад в эволюционную геносистематику микроорганизмов внес российский биохимик Андрей Николаевич Белозерский (1905—1972). Георгий Францевич Гаузе (1910—1986) разработал метод поиска противораковых антибиотиков. Всестороннее изучение процесса микробиологической трансформации стероидов и внедрение его в производство было проведено Георгием Константиновичем Скрыбиным (1917—1989).

Ученица В. Н. Шапошникова, Елена Николаевна Кондратьева (1925—1995) возглавляла изучение физиологии и биохимии фотосинтезирующих и хемолитотрофных микроорганизмов. Ею подробно проанализированы особенности метаболизма данных прокариот и выявлены общие закономерности фотосинтеза и углеродного обмена. Под руководством Е. Н. Кондратьевой был открыт новый путь автотрофной фиксации CO_2 у зеленых несерных бактерий, проведено выделение и подробное изучение штаммов фототрофных бактерий нового семейства. В ее лаборатории была создана уникальная коллекция бактерий-фототрофов. Е. Н. Кондратьева была инициатором исследований энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов-метилотрофов. Роль микробных сообществ в разных природных и искусственных местообитаниях всесторонне изучена Георгием Александровичем Заварзиным (1933—2011). Им исследованы структура и закономерности функционирования реликтовых экосистем, роль микроорганизмов в формировании состава атмосферы и эволюции биосферы в целом.

Многие методы, широко применяемые современными микробиологами, носят имена своих создателей. Например, для прижизненного наблюдения микробных клеток в естественных условиях используют капилляры Перфильева, стекла обрастания по Холодному, для подсчета клеток под микроскопом — камеру Горяева, для выращивания актиномицетов — среды Красильникова, для накопления разных групп хемолитотрофов — среды Виноградского и т.д.

Нами названы лишь некоторые великие имена, однако не надо забывать, что их открытия были подготовлены работами многих известных и рядовых исследователей.

1.3. Значение микробиологических исследований в современном мире

1.3.1. Значение микроорганизмов в природных процессах, в народном хозяйстве и здравоохранении

Роль микробиологии определяется значением микроорганизмов в природных процессах и в человеческой деятельности. Они обеспечивают протекание глобального круговорота элементов на нашей планете. Такие его стадии, как фиксация молекулярного азота, денитрификация или минерализация сложных органических веществ, были бы невозможны без участия микроорганизмов. Микроорганизмы используются в необходимых человеку производствах продуктов питания, лекарственных препаратов и различных химических веществ, они участвуют в очистке окружающей среды от природных и антропогенных загрязнений. В то же время многие микроорганизмы являются возбудителями заболеваний человека, животных, растений, а также вызывают порчу продуктов питания и различных промышленных материалов. Представители многих научных дисциплин используют микроорганизмы в качестве удобных инструментов и модельных систем при проведении экспериментов.

1.3.2. Главные направления развития современной микробиологии и решение глобальных проблем человеческой цивилизации

В XX в. микробиология полностью сложилась как самостоятельная наука, и дальнейшее ее развитие происходило с учетом открытий, сделанных в других областях биологии (биохимии, генетике, молекулярной биологии и т.д.). Уже к концу XIX в. микробиология в зависимости от выполняемых задач разделилась на ряд направлений и от нее отделились новые научные дисциплины, занимающиеся изучением более узких групп объектов (вирусология, микология, альгология и др.). В то же время в конце XX в. усилилась интеграция биологических наук и многие исследования происходили на стыке дисциплин, образуя такие направления, как молекулярная микробиология, геновая инженерия и др.

В современной микробиологии можно выделить несколько основных направлений. С развитием и совершенствованием методологического арсенала биологии активизировались фундаментальные микробиологические исследования, посвященные выяснению путей метаболизма и способов их регуляции. Бурно развивается систематика микроорганизмов, ставящая цель создать такую классификацию объектов, которая отражала бы место микроорганизмов в системе всего живого, родственные связи и эволюцию живых существ, т.е. осуществить построение филогенетического дерева. Изучение роли микроорганизмов в природных процессах и антропогенных системах (экологическая микробиология) крайне актуально в связи с повышенным интересом к современным экологическим проблемам. Значительное внимание привлекают исследования популяционной микробиологии, занимающейся выяснением природы межклеточных контактов и способов взаимодействия клеток в популяции. Не теряют актуальности те направления микробиологии, которые связаны с применением микроорганизмов в человеческой деятельности.

Дальнейшее развитие микробиологии в XXI в. наряду с накоплением фундаментальных знаний призвано помочь решению ряда глобальных проблем человечества. В результате варварского отношения к природе и повсеместного загрязнения окружающей среды антропогенными отходами возник значительный дисбаланс в круговоротах веществ на нашей планете. Только микроорганизмы, обладая широчайшими метаболическими возможностями, высокой пластичностью обмена веществ и значительной устойчивостью к повреждающим факторам, могут преобразовать стойкие и токсичные загрязнения в безвредные для природы соединения, а в ряде случаев и в пригодные для дальнейшего использования человеком продукты. Тем самым понизится выброс так называемых «парниковых газов» и стабилизируется газовый состав атмосферы Земли. Осуществляя **защиту окружающей среды** от загрязнений, микроорганизмы одновременно будут способствовать постоянству глобального круговорота элементов. Микроорганизмы, развиваясь на отходах промышленности и сельского хозяйства, могут служить альтернативными источниками топлива (биогаза, биоэтанола и других спиртов, биоводорода и т.д.). Это позволит решить **энергетические проблемы** человечества, связанные с истощением полезных ископаемых (нефти, угля, природного газа, торфа). Восполнение **продовольственных ресурсов** (особенно белковых) возможно путем введения в рацион питания дешевой микробной биомассы быстрорастущих штаммов, полученной на отходах пищевой промышленности или на очень простых средах. **Сохранению здоровья** человеческой популяции будут способствовать не только тщательное изучение свойств патогенных микроорганизмов и выработка методов защиты от них, но и переход на «природные лекарства» (пробиотики), повышающие иммунный статус человеческого организма.

Резюме

Микробиология изучает организмы микроскопических размеров — археи, бактерии, простейшие, микроводоросли, низшие грибы. Среди микроорганизмов есть прокариоты и эукариоты. Большинство микроорганизмов — одноклеточные. Представители мира микробов повсеместно распространены и играют значительную роль во всех природных процессах и человеческой деятельности. Микробиология занимает особое место среди наук о живом, изучая как особую группу объектов и их функционирование, так и фундаментальные законы развития живого мира.

Первые систематические наблюдения за представителями мира микробов провел в середине XVII в. А. ван Левенгук. Большой вклад в изучение жизнедеятельности микроорганизмов и становление экспериментальной микробиологии внес Л. Пастер. Р. Кохом и Л. Пастером независимо друг от друга был выделен ряд возбудителей опасных заболеваний человека и животных и изучены их свойства. Р. Кох, которого считают основоположником медицинской микробиологии, окончательно сформулировал и экспериментально подтвердил постулаты, доказывающие микробное про-

исхождение заболевания («триаду Коха»). Л. Пастером были разработаны способы прививок против некоторых заболеваний. С. Н. Виноградский и М. Бейеринк показали роль разных групп микроорганизмов в природных процессах. С. Н. Виноградским был открыт уникальный образ жизни — хемолитоавтотрофия. Работы Д. И. Ивановского привели к обнаружению вирусов — особой группы биологических объектов, не имеющих клеточного строения. Изучая антимикробные вещества и работая с лизоцимом, А. Флеминг открыл пенициллин, ставший первым соединением нового типа лекарственных препаратов-антибиотиков. В решение проблем общей, медицинской и промышленной микробиологии большой вклад внесли российские исследователи. В XX в. микробиология полностью сложилась как самостоятельная наука и ее развитие происходило с учетом открытий, сделанных в других областях биологии. Дальнейшее развитие микробиологии в XXI в. наряду с накоплением фундаментальных знаний призвано помочь решению ряда глобальных проблем человечества: защите окружающей среды, восполнению энергетических и продовольственных ресурсов, сохранению здоровья человеческой популяции.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Почему микроорганизмы считают сборной группой биологических объектов?
2. Почему микроорганизмы, несмотря на свои малые размеры, играют такую существенную роль в природных процессах?
3. В чем значение работ А. ван Левенгука?
4. Назовите основные достижения Л. Пастера как микробиолога.
5. Почему Р. Коха считают родоначальником медицинской микробиологии? Каков вклад Л. Пастера в данную отрасль науки о микробах?
6. Каково значение открытия хемолитоавтотрофии как способа существования?
7. Перечислите этапы работы А. Флеминга, приведшие его к открытию пенициллина.
8. Каков вклад отечественных ученых в развитие микробиологии?
9. Какие методические приемы экспериментальной микробиологии были предложены вышеперечисленными учеными и их сотрудниками?

Глава 2

МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИИ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- основные методы работы с микроорганизмами;

уметь

- выращивать сапротрофные микроорганизмы на соответствующих средах;

владеть

- навыками приготовления препаратов для микроскопического изучения микроорганизмов.
-

2.1. Особенности работы с микроорганизмами

Специфика объектов микробиологии и прежде всего их малые размеры требуют использования специальных методов работы с ними. Основными методами микробиологических исследований являются микроскопия, выделение чистых культур и контролируемое культивирование. Для изучения свойств микроорганизмов микробиологи применяют также аналитические методы, разработанные в других областях биологии.

Наблюдение за объектами микробиологии возможно только с помощью увеличительных приборов **микроскопов**, дающих увеличение от сотен до десятков тысяч раз. Из-за малых размеров микроорганизмов исследователь работает не с одной особью, а с большой группой организмов — **популяцией**, или **культурой**. Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, называется **чистой культурой**. Если число видов в популяции два или больше, то говорят о **смешанной культуре**. Чтобы получить чистую культуру из смешанной, используют различные способы ее **выделения**, т.е. изоляции от клеток других видов. 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 путем создания элективных условий культивирования. Выращивание и поддержание культуры в лабораторных условиях называется **культивированием**.

2.2. Микроскопические методы

2.2.1. Световая микроскопия

Для того чтобы можно было рассмотреть мелкий объект, необходимо его увеличить. Увеличение достигается с помощью системы линз, располо-

женных между глазом исследователя и объектом. Огромное значение для микроскопических наблюдений имеют контрастность и разрешение, позволяющие четко отличать объект от фона и раздельно видеть очень близкие детали изображения. В зависимости от принципа создания изображения микроскопия делится на световую, электронную и лазерную.

Современные световые микроскопы являются сложными и имеют три системы линз (рис. 2.1). Система конденсора отвечает за правильное освещение поля зрения и расположена между источником света и объектом. При внешнем источнике света лучи направляются в конденсор зеркалом. Многие современные микроскопы имеют встроенный источник света, и зеркало у них отсутствует. Увеличивают изображение системы линз объектива, обращенного к объекту, и окуляра, соприкасающегося с глазом исследователя. **Общее увеличение** определяется как произведение увеличения объектива на увеличение окуляра. Разрешающая способность микроскопа зависит от длины волны используемого света, оптических свойств линз и показателя преломления среды, контактирующей с наружной линзой объектива.

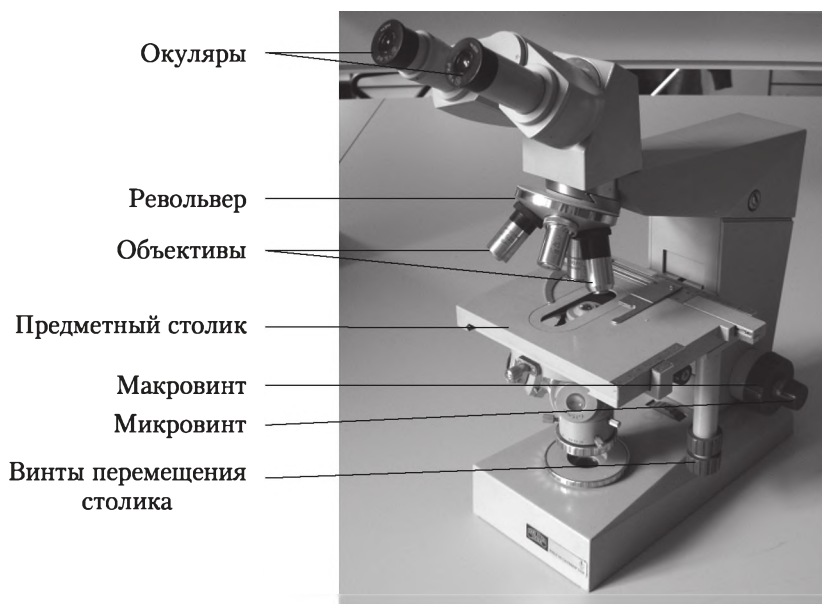


Рис. 2.1. Устройство светового микроскопа

Самым простым приемом, повышающим разрешающую способность микроскопа, является применение **иммерсии**. Между наружной линзой объектива и объектом помещают каплю жидкости, показатель преломления которой превышает показатель преломления воздуха. Для каждой жидкости используют специальный иммерсионный объектив. Наиболее распространены водные (с белым кольцом) и масляные (с черным кольцом) объективы. Модификациями обычной светопольной микроскопии являются ультрафиолетовая, темнопольная, фазово-контрастная микроскопия.

Применение более коротковолновых ультрафиолетовых лучей также позволяет повысить разрешающую способность микроскопа. Однако использование специальных источников света и кварцевой оптики приводят к существенному удорожанию микроскопических исследований.

В темнопольной микроскопии объект освещается только косыми боковыми лучами с помощью специального темнопольного конденсора. При таком освещении поле зрения остается темным, а мелкие частицы светятся отраженным светом. Темнопольная микроскопия позволяет различить контуры объектов, лежащих за пределами видимости обычного микроскопа, например, прокариотических жгутиков. Однако при таком способе наблюдения нельзя рассмотреть внутреннее строение объекта.

При применении фазово-контрастного устройства можно наблюдать живые прозрачные объекты, которые практически не отличаются по плотности от окружающего фона. Цвет и яркость проходящих через такие объекты лучей почти не меняются, но происходит фазовое смещение, не регистрируемое человеческим глазом. Фазово-контрастное устройство, применяемое как приставка к обычному микроскопу, преобразует фазовые различия световых волн в изменения их цвета и яркости. Прозрачные объекты становятся более четкими, и в клетках крупных микроорганизмов можно наблюдать даже отдельные структуры и включения.

2.2.2. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия основана на использовании пучка электронов вместо световых лучей, а фокусирование изображения происходит с помощью электромагнитного поля. Это позволяет достигать увеличений в 100 000 раз. Чтобы пучок электронов не рассеивался и не отклонялся при движении к объекту, вся оптическая часть микроскопа помещена в вакуум. В просвечивающем электронном микроскопе исследуют только очень тонкие срезы, прошедшие процедуру полного обезвоживания. Для повышения контрастности изображения срезы обрабатывают соединениями тяжелых металлов. Сканирующий электронный микроскоп позволяет изучать структуру поверхности различных объектов. Подготовка препаратов включает их химическую фиксацию, обезвоживание и высушивание, а также нанесение на поверхность образца металлического покрытия. С помощью сканирующей электронной микроскопии можно получать объемные изображения объектов. Следует учитывать, что при подготовке препаратов к электронной микроскопии клетки микроорганизмов могут повреждаться. Полученное изображение проецируется на люминесцентный экран и сохраняется на фотопленке (фотопластинках) или в цифровом виде на компьютере.

2.2.3. Другие современные виды микроскопии

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых природных и синтетических соединений светиться под воздействием света. Некоторые структуры и вещества клеток обладают собственной (первичной) люминесценцией, другие получают такую способность при окрашивании особыми красителями. Объект освещают сине-фиолетовыми лучами

или ультрафиолетом. Люминесцентная микроскопия позволяет изучать не только отдельные клеточные структуры, но и различать живые и мертвые клетки, в том числе в сложных природных пробах.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия не требует обезживания объекта и позволяет наблюдать микроорганизмы в их естественном виде и даже в составе природных комплексов (биопленок, почвенных частиц, донных осадков). При этом достигается разрешение, сравнимое с люминесцентной микроскопией. Лазерный луч расщепляется с помощью специального зеркала и постепенно сканирует исследуемую поверхность, возбуждая флуоресценцию в ней. Испускаемый свет улавливается фотоумножителем. За один проход луча получается одно плоское изображение. Затем с помощью компьютера такие изображения складываются в трехмерную форму объекта.

Атомно-силовая микроскопия является разновидностью сканирующей зондовой микроскопии и используется для определения рельефа поверхности объекта с разрешением в десятки ангстрем. Она основана на регистрации отклонений частотных характеристик упругой консоли (кантилевера) с помощью лазерного луча, который отражается от внешней поверхности кантилевера и попадает на фотодетектор. В качестве зонда применяется наноразмерное острие, располагающееся на конце кантилевера. Появление падений или возвышенностей рельефа образца приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и изменению величины изгиба кантилевера. Наиболее универсальным способом атомно-силовой микроскопии, позволяющим работать с биологическими объектами, является полуконтактный режим, когда в нижнем полупериоде колебаний кантилевер касается поверхности образца. Результаты первичного сканирования в дальнейшем подвергаются математической обработке и расшифровке с помощью специального программного обеспечения.

2.2.4. Препараты для световой микроскопии

Наиболее распространенными и доступными для повседневной практики являются наблюдения микроорганизмов в световой микроскоп. При приготовлении препаратов руководствуются определенными правилами работы с изучаемыми образцами. Препарат помещают на **предметное стекло** толщиной не более 1,4 мм. Толстое стекло не позволяет хорошо сфокусировать изображение и не годится для работы с иммерсионным объективом, имеющим очень короткое фокусное расстояние. Толщина **покровного стекла** не должна превышать 0,17 мм. Стекла должны быть тщательно очищены, обезжирены и высушены.

Препараты живых микроорганизмов представляют собой каплю жидкости с микробными клетками, заключенную между предметным и покровным стеклами. При работе с ними иммерсионные системы не используют. Отработанные препараты выдерживают в дезинфицирующем растворе. Существует несколько видов препаратов живых клеток. Препарат **«раздавленная капля»** готовят, нанося небольшую каплю воды на предметное стекло и размешивая в ней микробные клетки, выросшие на твердой среде. Если культура росла на жидкой среде, на предметное стекло наносят каплю

среды с клетками. Затем эту каплю накрывают покровным стеклом. Если покровное стекло плавает на поверхности капли, то избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. Для приготовления препарата **«микрокультура»** на участок предметного стекла, равный по площади покровному стеклу, наносят расплавленную твердую среду. После застывания среды в центр квадрата помещают суспензию клеток микроорганизма. Стекло инкубируют во влажной камере в термостате, а перед микроскопированием накрывают квадрат среды с выросшей микрокультурой покровным стеклом. Препарат **«висячая капля»** отличается тем, что каплю суспензии клеток наносят на покровное стекло, которое помещают каплей вниз на специальное предметное стекло с лункой. Капля оказывается свободно висящей в пространстве лунки. Для препарата **«отпечаток»** чистое покровное стекло прикладывают к поверхности колонии и слегка прижимают его пинцетом. Снятое без сдвига покровное стекло помещают отпечатком вниз в каплю воды на предметном стекле.

Препараты живых клеток позволяют изучать естественную форму и сочетания микроорганизмов, а также характер их движения. Недостатками таких препаратов являются их недолговечность и невозможность достижения большого увеличения.

Работать с иммерсионными объективами и повысить контрастность изображения позволяет процедура приготовления фиксированного окрашенного препарата — специальная обработка, включающая несколько обязательных стадий. Для **приготовления мазка** небольшую каплю клеточной суспензии равномерно распределяют по поверхности обезжиренного предметного стекла. После этого мазок высушивают на воздухе при комнатной температуре. Затем проводят **фиксацию** препарата. Эта процедура убивает микроорганизмы, делая их более восприимчивыми к окраске, и прикрепляет клетки к стеклу. Препарат становится безопасным для исследователя, что важно при работе с патогенными микроорганизмами. Различают термическую и химическую фиксацию. **Термическая фиксация** — это самый простой и распространенный способ, при котором предметное стекло мазком вверх трижды проводят через пламя горелки. После остывания стекла препарат готов к окрашиванию. Более редкая обработка различными химическими веществами применяется при изучении тонкого строения клеток. В зависимости от целей исследования используют различные виды окраски. **Простое окрашивание** позволяет лучше рассмотреть форму клетки и определить ее размеры, так как прокрашивается вся клетка. В этом случае чаще всего пользуются такими красителями, как фуксин или метиленовая синь, наливая его раствор прямо на мазок и выдерживая 3—5 мин. **Дифференциальное окрашивание** применяют для выявления структур и включений клетки. При этом используют краситель (или последовательно несколько красителей), окрашивающий определенную клеточную структуру. Иногда сложные способы дифференциальной окраски могут включать дополнительные процедуры. Например, при окраске эндоспор препарат нагревают с красителем, окраска на кислотоустойчивость и по Граму предполагает обработку кислотой или спиртом и т.д. После окрашивания препарат многократно промывают водой и высушивают на воз-

духе или промокают фильтровальной бумагой. На мазок помещают каплю иммерсионного масла и микроскопируют препарат с иммерсионным объективом. В правильно окрашенном препарате фон остается неокрашенным. Иногда применяют **негативные красители**, не проникающие внутрь клетки и окрашивающие только поле зрения. Так, для выявления капсул используют обычную разбавленную тушь. Капсулы при этом остаются неокрашенными и хорошо видны на темно-сером фоне.

Фиксированные окрашенные препараты можно хранить длительное время.

2.3. Контролируемое культивирование

2.3.1. Требования микроорганизмов к питательным веществам

Выращивание микроорганизмов в лаборатории — это один из основных приемов в микробиологии. Культивирование базируется на моделировании естественных условий обитания данного организма в лаборатории, а также на знании особенностей его обмена веществ. Микробная клетка в среднем содержит 50% углерода, 14% азота и 3% фосфора, а также другие элементы таблицы Менделеева. Для роста и развития микроорганизмам необходимы источники энергии и соединения для биосинтеза. Требования разных групп микроорганизмов к питательным веществам определяются их метаболическими возможностями.

Основными **биогенными элементами** являются углерод, азот, фосфор, кислород, водород, сера. Это компоненты белков, углеводов, жиров и нуклеиновых кислот. Такие элементы необходимы в значительных количествах (г/л) и поэтому их называют **макроэлементами**. К макроэлементам также относятся ионы калия, магния, натрия, кальция и железа, выполняющие разнообразные роли. Так, K^+ необходим для активности большого числа ферментов и в частности ферментов белкового синтеза. Ca^{2+} определяет устойчивость бактериальных эндоспор к нагреванию. Mg^{2+} стабилизирует рибосомы, многие ферменты и клеточные мембраны. Fe^{2+} являются частью цитохромов и кофакторами электронпереносящих белков. **Микроэлементы**, требующиеся в микромолярных количествах, — это ионы таких металлов, как хром, кобальт, медь, молибден, марганец, никель, селен, вольфрам, ванадий, цинк, обычно входящие в состав ферментов и кофакторов. Так, Co^{2+} 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, некоторых гидрогеназ, кофактора F_{430} , Zn^{2+} входит в состав карбоангидразы, ДНК- и РНК-полимераз и т.д. Достаточные для микроорганизмов количества микроэлементов содержатся в обычной водопроводной воде. При работе на дистиллированной воде микроэлементы добавляют специально в виде растворов их минеральных солей. У некоторых микроорганизмов имеются специфические потребности. Например, диатомовые водоросли требуют добавления в среду в значительной концентрации соединений кремния, из которых они строят свои клеточные стенки.

Биогенные элементы должны содержаться в питательной среде в доступной для микроорганизмов форме. Как правило, серу, фосфор, ионы металлов и микроэлементы вносят в среды в составе минеральных солей, поэтому для большинства микроорганизмов минеральная основа сред практически одинакова.

Источниками углерода и азота в среде могут служить как неорганические соединения (CO_2 , N_2 , карбонаты, нитриты, нитраты, аммонийные соли), так и органические вещества разной степени сложности и окисленности (сахара, спирты, органические кислоты и аминокислоты, олигосахариды, пептиды и т.д.). Если микроорганизму требуется набор источников углерода или азота, то тогда применяют различные экстракты и гидролизаты, смеси белков и полисахаридов неопределенного состава (сусло, гидролизат молочного белка, пептон и др.).

Некоторые микроорганизмы не растут без добавления определенных веществ или смеси веществ даже тогда, когда в среде имеются все необходимые биогенные элементы. Такие соединения называют **факторами роста**. Для обозначения этих особенностей питания микробной культуры пользуются терминами «прототроф» и «ауксотроф». **Микроорганизмы-прототрофы** не нуждаются в факторах роста, а **ауксотрофы** требуют добавления таких факторов в среду.

Ауксотрофными формами часто являются мутанты или патогенные микроорганизмы. Фактором роста в принципе может быть любое вещество, но чаще всего к ним относятся аминокислоты, пурины, пиримидины и витамины. Так, для молочнокислых бактерий необходимо вносить в среду для роста набор почти всех аминокислот. Смеси различных факторов роста содержатся, например, в дрожжевом и кукурузном экстрактах, которые обычно вносят в среды в небольших количествах.

Часто наблюдаемая ауксотрофность по витаминам объясняется тем, что они входят в состав кофакторов либо являются их предшественниками. Например, пара-аминобензойная кислота (ПАБК) является предшественником фолиевой кислоты — кофактора реакций переноса метильных групп. ПАБК должна поступать животным с пищей или в результате деятельности микроорганизмов кишечника. Биотин (витамин Н) участвует в метаболизме жирных кислот и в реакции гетеротрофной фиксации CO_2 на пирувате (реакции Вуда — Веркмана). V_{12} (кобаламин) принимает участие в переносе C_1 -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 (V_2) — предшественник ФМН и ФАД, распространенных переносчиков электронов. Тиамин (V_1) является кофактором 2-оксоглутаратдегидрогеназы, а также участвует в переносе альдегидных групп. Витамин B_6 (пиридоксаль) участвует в превращениях аминок- и кетокислот. Витамин К (хинон) является переносчиком электронов, участвует в синтезе сфинголипидов, а также активизирует систему свертывания крови у животных. Ниацин (никотиновая кислота) важен как предшественник НАД^+ и НАДФ^+ , переносящих электроны и протоны. Для микроорганизмов, использующих в своем обмене веществ

ионы трехвалентного железа, фактором роста могут считаться сидерофоры (в частности, гидроксаматы), транспортирующие Fe^{3+} в клетку в аэробных зонах. Обычно источником комплекса витаминов служит дрожжевой автолизат (автолиз дрожжей проводят при 50°C с небольшим количеством толуола) с добавлением витамина B_{12} , так как в дрожжевом автолизате его мало. Дрожжевой автолизат — это также и источник азота в виде аминокислот и полипептидов.

У некоторых микроорганизмов спектр потребляемых органических веществ очень широк (например, у *Pseudomonas*, *Actinomyces*), у других — достаточно узок (например, у облигатных метилотрофов). В то же время можно найти микроорганизмы, способные использовать сложные природные соединения типа пластиков, красителей, пестицидов. У ряда культур потребности в питании так сложны, что они растут только внутри живого организма (например, внутриклеточные паразиты риккетсии и хламидии). Концентрации питательных веществ в лабораторных средах, как правило, существенно превышают их содержание в естественных условиях. Также для успешного выращивания микроорганизмов необходимо поддерживать оптимальные для них значения физико-химических параметров (рН, температуры, освещенности, аэрации и т.д.).

2.3.2. Типы сред

Разнообразные питательные среды, используемые в микробиологической практике для культивирования микроорганизмов, подразделяют по составу, физическому состоянию и назначению.

По составу все среды делят на натуральные и синтетические. **Синтетические среды** имеют определенный химический состав, для каждого соединения может быть указана его точная концентрация. Такие среды применяют для изучения обмена веществ у микроорганизмов. **Натуральные среды** содержат продукты животного или растительного происхождения, которые имеют сложный и непостоянный состав. Такие среды используют для накопления биомассы микроорганизмов. Богатые различными органическими веществами натуральные среды позволяют удовлетворить питательные потребности многих групп микроорганизмов, поэтому они широко используются микробиологами для первичного выделения из естественных субстратов. Наиболее распространены натуральные среды на основе мясо-пептонного бульона (МПБ) и солодового сусли. **МПБ** — это прокипяченный экстракт мясного фарша с добавлением пептона и поваренной соли в определенных концентрациях, богатый азотсодержащими органическими соединениями, но бедный по углеводам. **Солодовое сусло**, напротив, содержит преимущественно углеводы. Готовят сусло путем настаивания размоленного солода в водопроводной воде при постепенном нагревании. Солод получают, замачивая и проращивая зерна ячменя. Проростки высушивают и размалывают в порошок. В процессе приготовления сусли происходят осахаривание крахмала ячменя и экстракция сахаров в воду. В зависимости от партии зерна концентрация сахаров в сусле получается разная, и ее определяют, пользуясь ареометром Баллинга, градусы которого ($^\circ\text{B}$) примерно соответствуют процентному содержанию сахаров в растворе. Для

разных групп микроорганизмов применяют сусло с разной концентрацией сахаров.

По физическому состоянию среды делят на жидкие, твердые и сыпучие. **Жидкие среды** представляют собой растворы или суспензии ингредиентов в воде. Для отверждения сред в жидкую основу добавляют уплотняющие агенты. Наиболее распространенными отвердителями являются желатин, агар и силикагель. **Желатин** стали использовать в этом качестве раньше всего, поскольку это доступный белок из соединительной ткани животных, образующий гель при 25°C. Однако температура роста многих микроорганизмов выше, чем температура плавления желатина, к тому же обладающие протеолитическими ферментами микроорганизмы способны расщеплять этот белок. Примененный впервые в лаборатории Р. Коха агар более удобен как уплотнитель, так как он способен многократно плавиться при 100°C и застывать при 45°C. Большинство микроорганизмов не использует его для питания. **Агар** — это сложный полисахарид, получаемый из морских бурых водорослей. В настоящее время агар является наиболее употребимым уплотнителем питательных сред. Широко применяемые мясо-пептонный агар (МПА), сусло-агар (СА) и их смесь в равных объемах (**бульон-сусло-агар, БСА**) получают, добавляя 2% агара в МПБ и сусло. **Силикагель** — это неорганическое соединение кремния, применяемое в качестве твердой основы для синтетических сред. **Сыпучие среды** представляют минеральный или органический наполнитель, который пропитывают жидкой средой. В качестве наполнителя используют стружку, керамзит, зерно, отруби, твердые отходы сельского хозяйства и пищевой промышленности. На таких средах, которые имитируют естественные условия гетерогенных местообитаний (почвы, например), хорошо развиваются мицелиальные формы микроорганизмов. В настоящее время широко используют порошкообразные синтетические и натуральные среды длительного срока хранения, представляющие собой набор сухих компонентов, которые разводят или смачивают водой в соответствии с прописью.

По назначению среды делят на универсальные, элективные и индикаторные (дифференциально-диагностические). **Универсальные среды** позволяют поддерживать рост большинства микроорганизмов. Их используют для накопления микробных клеток и первоначального выявления видового разнообразия микроорганизмов в смешанных популяциях. В то же время следует помнить, что не существует среды, позволяющей выращивать все известные микробные культуры. **Элективные среды** позволяют накопить желаемую группу микроорганизмов за счет создания условий, благоприятных для данной группы. Такими средами пользуются для получения **накопительных культур**, которые Виноградский предложил применять как первый этап выделения чистой культуры из природных местообитаний. Развитие накопительной культуры приводит к преобладанию в смешанной популяции определенной группы микроорганизмов. Другие микроорганизмы в этих условиях не размножаются или их рост незначителен. **Индикаторные среды** предназначены для быстрого выявления определенных микроорганизмов или выявления особенностей обмена веществ, содержат вещество-индикатор, реагирующий изменением цвета на прояв-

ление какого-либо свойства организма. Индикаторные (дифференциально-диагностические) среды наиболее часто применяют в санитарной и медицинской микробиологии.

2.3.3. Микробиологическая посуда и инструменты

Приготовленную питательную среду помещают в один из стеклянных или пластиковых лабораторных сосудов. Самыми широко используемыми сосудами для культивирования являются чашки Петри, пробирки, колбы и пузырьки разной формы и размера (рис. 2.2).



Рис. 2.2. Лабораторная посуда для культивирования микроорганизмов

Колбы, пузырьки и пробирки закрывают пробками разной конструкции (ватными, резиновыми, металлическими и т.д.) в зависимости от требуемого воздушного режима. Для помещения микробных клеток в среду (посева) используют три основных инструмента (рис. 2.3). **Микробиологическая петля** представляет собой металлическую проволоку, загнутую на конце колечком; ее используют для переноса клеток как на твердые, так и в жидкие среды. Работу с жидкими культурами удобно проводить с помощью пипеток. **Микробиологическая пипетка** — это стеклянная или

пластиковая трубочка различного объема, один конец которой оттянут, а второй заткнут кусочком ваты. Оттянутый конец пипетки погружают в жидкую культуру, а закрытый ватой конец берут в рот и засасывают среду с клетками в пипетку. Указательный палец руки плотно прижимают к закрытому ватой отверстию пипетки и переносят пробу в другой сосуд. Убрав палец, сливают жидкость. Для засасывания культуры в пипетку иногда используют грушу. Можно пользоваться также автоматическими пипетками со сменными носиками разного объема. При работе с анаэробными культурами забор материала часто осуществляют путем прокола резиновой пробки иглой шприца. Движением поршня заполняют шприц жидкостью и сливают ее в другую емкость. В настоящее время существуют сосуды и инструменты как многократного пользования, так и одноразовые.

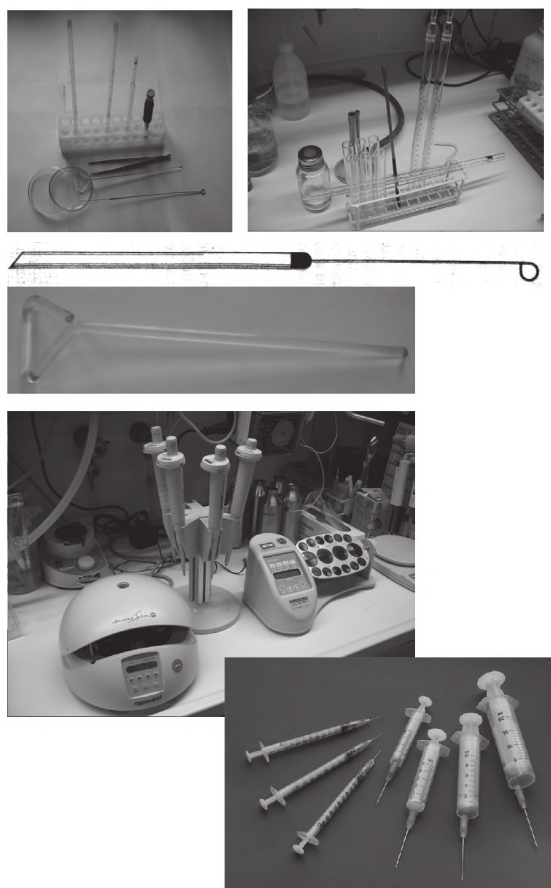


Рис. 2.3. Основные микробиологические инструменты

Все манипуляции с микробными культурами производят около пламени газовой горелки или спиртовки (рис. 2.4). Работы ведут на столе в микробиологической лаборатории или в специальном боксе, куда подается специально очищенный от клеток воздух. В боксе можно работать без использования огня.

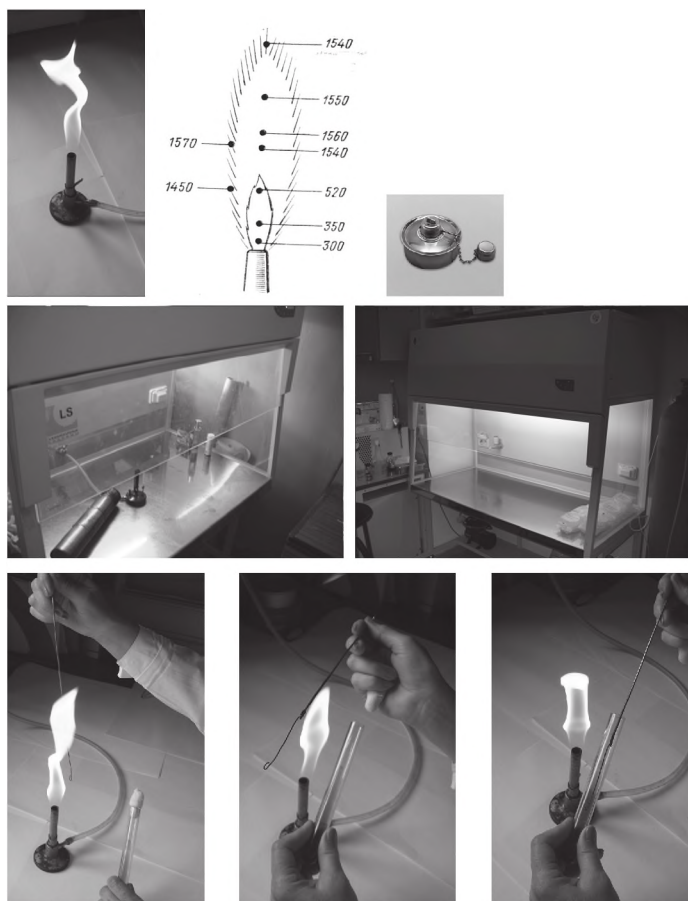


Рис. 2.4. Горелка или спиртовка и приемы стерильной работы около пламени

2.3.4. Способы выделения чистых культур микроорганизмов

Для определения систематического положения, физиолого-биохимических свойств и особенностей развития микроорганизма необходимо получить его чистую культуру. При этом необходимо отделить клетки данного вида от клеток других видов и впоследствии исключить загрязнение культуры посторонними микроорганизмами. Выделение чистой культуры из природного образца проводят в определенном порядке. Сначала получают накопительную культуру, учитывая физиолого-биохимические особенности выделяемой культуры и создавая селективные условия для ее преимущественного развития. Например, для получения накопительной культуры микроорганизмов, способных в качестве источника азота использовать азот воздуха, следует приготовить среду без связанных форм азота. Тогда в смешанной популяции природного образца будут расти прежде всего азотфиксаторы. Чтобы избирательно подавить рост определенных групп микроорганизмов, в среду иногда вносят антибиотики. Так, для замедления развития мицелиальных грибов добавляют нистатин или гризеофульвин, а грамположительные бактерии плохо растут

в присутствии пенициллина. Разные группы микроорганизмов по-разному относятся к физико-химическим условиям культивирования (кислотности среды, температуре выращивания, освещенности и т.д.). Преобладать будет та группа микроорганизмов, для которой созданные исследователем условия культивирования наиболее приемлемы. Устойчивость эндоспор к повышенной температуре также часто используется для накопления спорообразующих микроорганизмов. Для этого пробу кратковременно прогревают при высокой температуре (10–15 мин при 80–100°C). Вегетативные клетки погибают, а эндоспоры сохраняют свою жизнеспособность. Элективные условия — не всегда наилучшие (оптимальные) для роста выделяемой группы, однако сопутствующие микроорганизмы переносят их еще хуже. О преобладании желаемых микроорганизмов судят по характерной микроскопической картине, внешним изменениям среды, появлению определенных продуктов метаболизма.

Затем приступают к выделению чистой культуры. Ее можно получить из единичной клетки или из отдельной колонии. Изоляция одной микробной клетки всегда проходит под микроскопическим контролем. Одну клетку можно извлечь с помощью микроманипулятора или путем изготовления серии препаратов «висячая капля» из сильно разведенной суспензии. В первом случае клетку извлекают микропипеткой или микропетлей и переносят в сосуд со средой. Во втором случае просматривают препараты и выбирают те, в которых присутствует одна клетка. Такие препараты помещают во влажную камеру и микроскопируют вновь через сутки. Капли, в которых произошло размножение клеток, переносят в питательную среду. Данные способы получения чистой культуры пригодны только для достаточно крупных микроорганизмов, поэтому чаще используют метод выделения из отдельной колонии, разработанный в лаборатории Р. Коха. При этом каплю накопительной культуры тем или иным способом распределяют по поверхности или в глубине твердой питательной среды (рис. 2.5). В результате клетки отделяются друг от друга и впоследствии размножаются, образуя скопление клеток определенной формы (**колонию**). Отдельную колонию снимают петлей и переносят в сосуд с питательной средой.

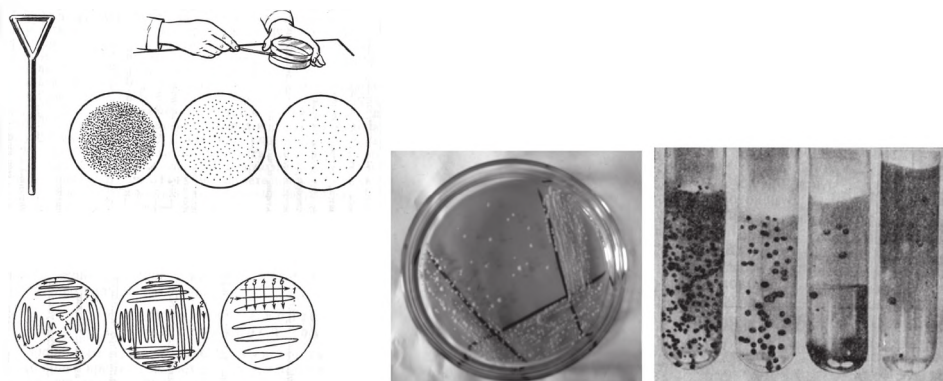


Рис. 2.5. Получение чистой культуры из отдельной колонии по методу Коха

Важным этапом является проверка чистоты выделенной культуры, включающая многократные пересевы и контроль характера роста и микроскопической картины. Признаком чистоты культуры является однородность колоний на определенном наборе сред. Микроскопический контроль заключается в просмотре препаратов живых клеток и фиксированных окрашенных препаратов. Чистая культура, как правило, морфологически однородна, хотя размеры отдельных клеток могут незначительно различаться.

2.3.5. Особенности роста микробных культур

Особенности роста (**культуральные свойства**) могут помочь при определении систематического положения микроорганизма. В зависимости от условий, в которых существует микробная популяция, клетки могут находиться в состоянии суспензии, образовывать микроколонии и обрастания в жидких средах или колонии, штрихи или газон на твердых средах. При развитии на твердых питательных средах колонии могут формироваться на поверхности или в толще среды. **Глубинные колонии** (см. рис. 2.5) имеют довольно однообразную форму чечевичек, тонких пленок или пучков ваты. Иногда при глубинном росте наблюдают разрывы агаризованной среды из-за выделения газов микроорганизмами. **Поверхностные колонии** отличаются большим разнообразием (рис. 2.6). При описании колонии отмечают такие признаки, как форма, размер, цвет, профиль. Учитывают свойства поверхности колонии (гладкая, шероховатая, имеющая различные выпуклости, исчерченность и т.д.), наличие блеска и прозрачности. При малом увеличении микроскопа рассматривают форму края и структуру колонии. Прикасаясь к колонии петлей, определяют ее консистенцию. Колония может быть плотной, мягкой, хрупкой, вращать в агар, сниматься целиком в виде пленки, тянуться за петлей и т.д. Морфология колоний может значительно изменяться в зависимости от состава среды, возраста культуры и температуры культивирования, поэтому эти данные всегда указывают при описании колоний.

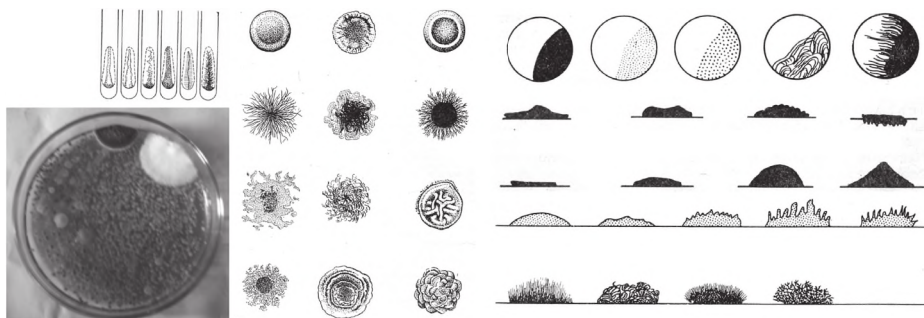


Рис. 2.6. Визуальные признаки поверхностных колоний и роста по штриху

Если на поверхность плотной среды микробные клетки помещены путем проведения прямой линии петлей по агару, то микроорганизмы вырастут в виде **штриха**. Рост по штриху бывает разный (см. рис. 2.6): обильный и скудный, сплошной или в виде цепочек очень мелких колоний, перистый, древовидный. Край штриха может быть ровный, волнистый, лопастной и т.д.

При развитии культуры в жидких средах отмечают степень помутнения, наличие и внешний вид пленки на поверхности среды или осадка на дне сосуда. Образование пены и пузырьков связано с выделением газов. Характерными особенностями развития микроорганизма может быть окрашивание среды и появление запаха.

2.4. Методы хранения микробных культур

Для работы с микроорганизмами большое значение имеет длительное поддержание жизнеспособности культуры без потери ее свойств. Универсального метода, пригодного для любого микроорганизма, пока не существует, поскольку представители разных групп неодинаково реагируют на условия хранения. Наиболее доступным способом является **периодический пересев** культуры на соответствующую питательную среду. Аэробные микроорганизмы обычно пересевают на поверхность скошенной агаризованной среды, а анаэробные — в толщу агаризованной или жидкой среды в пробирках или пузырьках. Частота таких пересевов определяется свойствами конкретного микроорганизма, но может быть снижена хранением материала при пониженных температурах (4–6°C). Увеличить время между пересевами позволяет заливка поверхности среды с выросшей культурой минеральным (вазелиновым) маслом. Слой масла предотвращает быстрое высыхание среды. Применяют также хранение культур в различных растворах, иногда при пониженной температуре (в 1%-м растворе поваренной соли при 4–6°C или в 25%-м глицероле при –20°C). Длительное хранение культуры без пересевов (до 20–50 лет) может достигаться путем лиофилизации клеток. **Лиофилизация** — это высушивание микроорганизмов под вакуумом из замороженного состояния. Клетки предварительно суспендируют в защитных средах, предохраняющих их от повреждения при замораживании и высушивании. Суспензии разливают в стеклянные ампулы, замораживают при минус 20–70°C, высушивают и запаивают. Наиболее универсален метод **хранения при сверхнизких температурах**. Выросшую культуру предварительно помещают в раствор криопротектора (20%-й раствор глицерола или сахарозы, 4–5%-й раствор диметилсульфоксида). Запаиваемые ампулы с суспензией клеток замораживают при –70°C, помещают в сосуд с жидким азотом и хранят при температуре –196°C.

2.5. Методы стерилизации

2.5.1. Основные понятия

Поскольку микроорганизмы распространены повсеместно, то воздух, вода, различные компоненты питательных сред, сосуды, инструменты и рабочие поверхности всегда содержат микробные клетки. Присутствие посторонних организмов может существенно искажать результаты микробиологических исследований, препятствовать выделению и поддержанию чистой культуры. Поэтому все применяемые в работе объекты должны быть простерилизованы и защищены от последующего загрязнения.

Стерилизация — это процесс уничтожения всего живого как на поверхности, так и внутри объекта.

Не может быть состояния «частичной стерильности», объект может быть либо стерильным, либо нет. Наличие даже одной клетки или спор делает его нестерильным. Стерилизующими агентами могут быть вещества или факторы, оказывающие на живое губительное действие, а также процессы, отделяющие живое от неживого. Способы стерилизации делят на холодные и термические. Выбор способа определяется прежде всего физико-химическими свойствами стерилизуемого объекта.

2.5.2. Термическая стерилизация

Основным агентом **термической стерилизации** служит высокая температура. В микробиологии широко используют несколько методов термической стерилизации: прокаливание и обжигание в пламени, стерилизация «сухим жаром» и автоклавирование. **Прокаливание** (нагревание докрасна) в пламени применяют для стерилизации небольших металлических инструментов (петель, пинцетов, ножниц, игл) непосредственно перед их использованием. При этом погибают как вегетативные клетки, так и споры микроорганизмов. Перед прикосновением к пересеваемой культуре инструмент необходимо остудить на воздухе рядом с пламенем, либо о внутренние стенки сосуда для культивирования.

Обжигание (кратковременное внесение в пламя) можно применять для стерилизации предметных и покровных стекол, стеклянных палочек и шпателей, горлышек сосудов для выращивания и внутренних поверхностей пробок при пересевах и разливании сред. Следует помнить, что при длительном нахождении в пламени стекло может треснуть, а пробки загореться. Перед использованием обожженных предметов необходимо их остудить, так как контакт с холодными объектами приведет к растрескиванию стекла. Горячие стеклянные инструменты могут повредить поверхность твердой среды и микробные клетки.

Стерилизация «сухим жаром» (горячим воздухом) широко применяется в микробиологии для обработки пустой стеклянной лабораторной посуды и некоторых вязких жидкостей (вазелиновое масло, глицерол) и порошков (тальк, мел). Подготовленные объекты помещают на полки сухожарового (сушильного) шкафа (рис. 2.7) и после достижения температуры 160–170°C выдерживают 2 ч. Современные шкафы с электрическим нагревом имеют терморегулятор, обеспечивающий поддержание необходимого режима.

Стерилизуют только чистую, сухую посуду, завернутую в плотную бумагу. Чашки Петри заворачивают обычно в пачки по 4–5 шт. В верхние концы пипеток вставляют кусочки ваты, а затем каждую пипетку, начиная с оттянутого конца, обматывают по спирали длинными полосками бумаги. При большом объеме работы можно незавернутые пипетки с ватой в верхнем конце поместить оттянутыми концами вниз в металлические пеналы, плотно закрывающиеся крышками. Стеклянные шпатели индивидуально заворачивают в бумагу, начиная с треугольной части. Колбы, пробирки, пузырьки

закрывают ватными пробками, покрытыми бумажными колпачками. Вязкие жидкости и порошки помещают в закрытый стеклянный сосуд слоем не более 1,5 см. По окончании стерилизации шкаф открывают не раньше, чем температура снизится до 80°C, так как резкое охлаждение может привести к растрескиванию стекла и нарушению стерильности материалов.



Рис. 2.7. Сухожаровой (сушильный) шкаф

Автоклавирование — это способ стерилизации, при котором действующим агентом является насыщенный водяной пар при давлении выше атмосферного. При повышении давления температура пара возрастает и может превышать 100°C. В микробиологии наиболее часто используют давление в 0,5 и 1,0 избыточных атмосфер (ати). Такая обработка убивает и вегетативные клетки, и споры микроорганизмов. Стерилизацию проводят в специальном металлическом сосуде, который заполняют паром под давлением выше атмосферного (рис. 2.8).

Путем автоклавирования обычно стерилизуют питательные среды и растворы в различных емкостях. Сосуды закрывают ватными пробками, прикрытыми бумажными колпачками. Среда и растворы наливают не более чем на половину высоты сосуда во избежание смачивания пробок. При выборе режима стерилизации учитывают термоустойчивость компонентов питательных сред и растворов. Для сред, содержащих термолабильные молоко, желатин, сахара, витамины, выбирают щадящий режим (0,5 ати, 111°C 15–30 мин). МПБ и МПА можно стерилизовать при 1,0 ати (121°C). Вязкие жидкости требуют увеличения времени обработки. Термоустойчивые объекты, в которых могут быть споры, выдерживают 1–2 ч при 2,5–1,0 ати. При рН среды, сильно отличающимся от нейтрального, обра-

ботка перегретым паром может приводить к химическим изменениям компонентов среды (гидролизу, выпадению в осадок, карамелизации). Чтобы этого избежать, некоторые составляющие питательных сред лучше стерилизовать отдельно в виде растворов и добавлять в среду перед посевом. Для емкостей разного объема и с различной толщиной стенок необходимо выбирать разные режимы стерилизации.

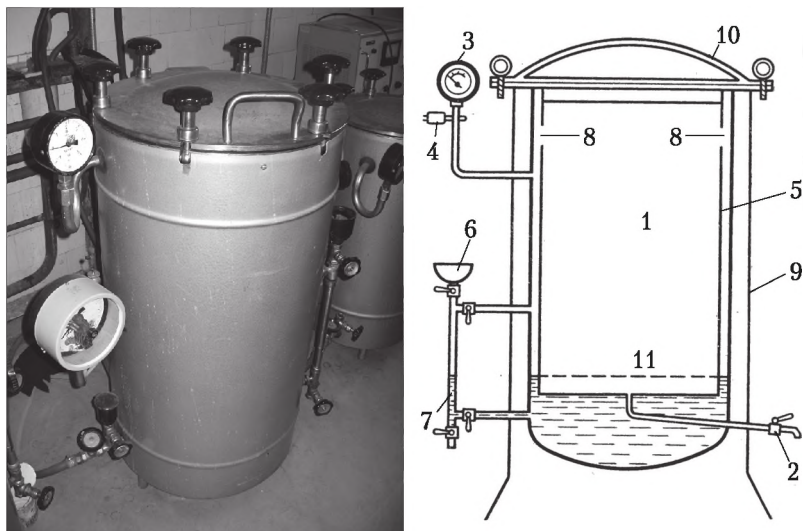


Рис. 2.8. Автоклав и его устройство:

1 — стерилизационная камера; 2 — кран для выхода воздуха; 3 — манометр; 4 — предохранительный клапан; 5 — водопаровая камера; 6 — воронка для заполнения автоклава водой; 7 — водомерная трубка; 8 — отверстия для поступления пара в стерилизационную камеру; 9 — защитный кожух; 10 — крышка автоклава; 11 — подставка для размещения стерилизуемых предметов

2.5.3. Холодная стерилизация

Методы **холодной стерилизации** применяют в том случае, если объект не выдерживает нагревания. **Фильтрованием** стерилизуют синтетические среды и растворы, в состав которых входят термолабильные или летучие компоненты. Фильтры не только задерживают клетки микроорганизмов из-за малого размера пор (0,2–0,7 мкм), но и адсорбируют их. Фильтры могут быть изготовлены из разных мелкопористых материалов (асбеста, каолина, целлюлозы, фарфора). Сами фильтры стерилизуют автоклавированием при 1,0 ати 15–30 мин.

Стерилизация с помощью газов эффективна при обработке оптического и радиоэлектронного оборудования и изделий из термолабильных пластмасс. Стерилизующие вещества должны убивать эндоспоры микроорганизмов. Перед обработкой объекты упаковывают в оберточную бумагу или в пленки, пропускающие газ и влагу и не портящиеся в газовой среде, и помещают в герметически закрывающуюся камеру. Из камеры отсасывают воздух и заполняют ее газом. В зависимости от свойств используе-

мого газа поддерживается определенная температура и длительность стерилизации. После обработки газ из камеры удаляют и выдерживают объект в стерильной воздушной среде не менее 24 ч. Наиболее часто применяют такие газы, как оксиды этилена и пропилена, метилбромид, озон, пары формальдегида и глутарового альдегида.

Стерилизацию облучением используют для обработки помещений, оборудования, объектов медицинской и пищевой промышленности. В качестве действующих агентов применяют различные виды излучений (инфракрасное, ультрафиолетовое, рентгеновское, α -, β - и γ -излучения) с дозами не меньше 2—3 мрад. В микробиологической лаборатории воздух и рабочие поверхности стерилизуют длительным облучением ультрафиолетом ($\lambda = 260$ нм, 12—24 ч). Стерилизацию облучением применяют также при изготовлении одноразовой пластиковой посуды, шприцов и инструментов для микробиологических исследований.

Резюме

Из-за малых размеров микробов исследователь работает с популяцией, или культурой. Культура микроорганизмов, состоящая из клеток одного вида, называется чистой культурой. Если число видов два или больше, то говорят о смешанной культуре. Основными методами микробиологических исследований являются микроскопия, выделение чистых культур и контролируемое культивирование.

Наиболее распространенными и доступными являются наблюдения микроорганизмов в световой микроскоп. Препараты живых микроорганизмов представляют собой каплю жидкости с микробными клетками, заключенную между предметным и покровным стеклами. Они позволяют изучать естественную форму и сочетания клеток, а также характер их движения. Работать с иммерсионными объективами и повысить контрастность изображения позволяет специальная обработка препаратов, включающая стадии приготовления мазка, высушивания, фиксации, окраски, промывки водой и окончательного высушивания. Фиксированные окрашенные препараты можно хранить длительное время. Модификации обычной светопольной микроскопии представлены ультрафиолетовой, темнопольной и фазово-контрастной микроскопией. Высокотехнологичными видами микроскопии, позволяющими достигать увеличений в десятки тысяч раз, являются электронная, люминесцентная, конфокальная лазерная сканирующая и атомно-силовая микроскопия.

Культивируя микроорганизм в лаборатории, исследователь пытается воспроизвести условия существования его в природе с учетом выявленных метаболических возможностей микробной культуры. Для любого микроорганизма среда должна содержать питательные вещества для энергетического и конструктивного обмена в доступной для него форме. Микробиологические питательные среды подразделяются по составу на натуральные и синтетические, по физическому состоянию — на жидкие, твердые и сыпучие, по назначению — на универсальные, селективные и индикаторные. Самыми широко используемыми сосудами для культивирования являются чашки Петри, про-

бирки, колбы и пузырьки разной формы и размера. Для посева микроорганизмов используют три основных инструмента — микробиологическую петлю, пипетку и шприц. Пересевы микробных культур и отбор проб осуществляют стерильно около пламени газовой горелки или спиртовки. При выделении чистой культуры из природного образца сначала получают накопительную культуру, создавая элективные условия для ее преимущественного развития. Чистую культуру чаще всего получают при расसेве на твердую среду по Коху, выделяя ее из отдельной колонии. На твердых средах микробная культура может расти в виде колоний, штрихов или газона, а в жидких — в виде суспензии, микроколоний или обрастаний. Культуральные свойства и особенности морфологии колоний являются дифференцирующими признаками при определении систематического положения микроорганизма.

Длительное поддержание жизнеспособности культуры без потери ее свойств (хранение) осуществляют путем периодических пересевов, лиофилизации и хранения при сверхнизких температурах в растворе криопротектора. Для устранения посторонних организмов, которые могут загрязнять чистые культуры и способствовать искажению результатов опытов, все используемые в экспериментах материалы и инструменты должны быть простерилизованы. При культивировании и хранении используют приемы стерильной работы, обеспечивающие поддержание чистых культур. Способы стерилизации делятся на холодные (фильтрование, обработка газами и облучение) и термические (прокаливание, обжигание, сухой жар и автоклавирование). Выбор способа определяется прежде всего физико-химическими свойствами стерилизуемого объекта.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. От чего зависит разрешающая способность светового микроскопа и как ее можно повысить?
2. Для каких целей используют электронную и лазерную микроскопию?
3. Отметьте преимущества и недостатки фиксированных окрашенных препаратов в сравнении с препаратами живых клеток.
4. Как можно простым способом удовлетворить потребности микроорганизмов в микроэлементах?
5. В каких формах вносят в среду основные биогенные элементы?
6. Для каких целей чаще всего используются натуральные и синтетические среды?
7. Почему агар применяют как уплотнитель питательных сред наиболее часто?
8. Перечислите основные этапы получения чистой культуры микроорганизмов. Какую посуду и инструменты следует применять?
9. Приведите примеры разных способов роста микроорганизмов, которые вы можете наблюдать в природе и в быту.
10. Как можно длительное время сохранить микробную культуру?
11. Какими соображениями руководствуется исследователь при выборе способа стерилизации конкретного объекта?
12. Какие дезинфектанты могут быть использованы для стерилизации поверхностей? Приведите примеры.
13. Как правильно утилизировать микробиологический материал после завершения эксперимента?

14. Предложите способы стерилизации следующих объектов:

- а) бумажных фильтров;
- б) синтетической среды, содержащей глюкозу;
- в) микробиологической петли;
- г) светового микроскопа;
- д) почтовой корреспонденции;
- е) медицинских халатов;
- ж) воздуха врачебного кабинета.

Семинар 1

Техника безопасности при работе с микроорганизмами

Все используемые на практических занятиях микроорганизмы не являются патогенными для человека и животных. Однако для постижения основ асептической техники, которую применяют при работе с неизвестными и болезнетворными культурами, студенты должны научиться работать с безвредными микроорганизмами как с потенциально опасными. Для этого следует строго придерживаться **правил техники безопасности** при работе с микроорганизмами:

1. В микробиологической лаборатории запрещается: есть, пить, курить и использовать жевательную резинку.

2. Работа с микроорганизмами осуществляется у источников открытого огня (газовых горелок и спиртовок), поэтому перед работой необходимо надеть лабораторный халат с длинными рукавами, убрав все свисающие части одежды и заправив длинные волосы под шапочку или косынку.

3. Не следует прикасаться во время экспериментов к поверхности предметов, нагретых на горелке или спиртовке, во избежание ожога.

4. Горючие жидкости (такие как спирт) не должны находиться возле огня. Необходимо ознакомиться с расположением и правилами использования ближайшего огнетушителя.

5. На рабочем столе не должно быть посторонних предметов, его поверхность необходимо содержать в чистоте и перед работой обрабатывать дезинфектантами (спиртом, хлорамином и т.д.). Соблюдайте осторожность при стерилизации рабочей поверхности стола хлорсодержащими веществами, так как они могут вызвать химический ожог.

6. Необходимо быть особо осторожными при работе с неизвестными микроорганизмами, при анализе культуральных и морфологических свойств таких культур сосуды для культивирования следует держать закрытыми. Избегайте разлития суспензий микроорганизмов при посевах.

7. Запрещается брать в рот и проглатывать микробиологический материал и вдыхать микробные аэрозоли. Для всасывания жидких культур следует использовать пипетки с закрытыми ватой концами или автоматические пипетки, для набора агрессивных жидкостей — пипетки с резиновыми грушами или специальными помпами.

8. Пролитую суспензию микроорганизмов или разбитую посуду с культурой необходимо немедленно накрыть бумажными салфетками или полотенцами и затем смочить дезинфектантом. Через 15 мин бумагу и осколки следует собрать и выбросить в мусорное ведро. Поверхность стола необходимо протереть дезинфектантом.

9. Загрязненные микроорганизмами инструменты не следует помещать на поверхность рабочего стола. Микробиологическая петля должна быть предварительно прокалена в пламени горелки или спиртовки, а пипетки, шпатели и другие инструменты — помещены в раствор дезинфектанта. Отработанные чашки и пробирки с посевами необходимо поместить в автоклав для уничтожения микроорганизмов.

10. После работы с микроорганизмами необходимо тщательно вымыть руки водой с мылом. Попавшие в глаза, на кожу и на одежду химические реактивы или культуры немедленно смойте большим количеством проточной воды.

Лабораторная работа 1

Микроскопические методы исследования микроорганизмов. Приготовление разных видов микроскопических препаратов

Цель работы: овладеть техникой приготовления микроскопических препаратов, ознакомиться с приемами световой микроскопии и проанализировать морфологические особенности микроорганизмов разных групп.

1.1. Приготовление препаратов «раздавленная капля» и знакомство с морфологией микроорганизмов.

Необходимые материалы: микробные культуры с разной морфологией на жидких (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Rhodospirillum rubrum*, *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., *Anabaena variabilis*, *Fischerella muscicola*) и твердых (*Micrococcus luteus*) средах; обезжиренные предметные и покровные стекла, микробиологическая петля и стерильные пипетки, водопроводная вода и растворы красителей (фуксин, метиленовая синь, кристалвиолет и др.) в капельницах; спиртовка или газовая горелка; фильтровальная бумага; световой микроскоп с объективами 8X (10X) и 40X, маркер по стеклу.

Препараты «раздавленная капля» готовят на обезжиренных предметных стеклах, сделав необходимые надписи маркером на краях стекла. В случае роста культуры на твердой среде (на скошенном МПА) на предметное стекло помещают каплю водопроводной воды, в нее с помощью простерилизованной в пламени горелки петли вносят небольшое количество клеток микроорганизма, снятых с поверхности агара, и хорошо размешивают. Каплю культуры, выращенной в жидкой питательной среде, наносят на предметное стекло стерильной пипеткой. Каплю полученной суспензии накрывают покровным стеклом, и избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой. На одно предметное стекло можно наносить 1–3 капли, следя, чтобы они не сливались. Препараты «раздавленная капля» просматривают не позже чем через 15 мин после приготовления, так как они теряют свои свойства из-за высыхания суспензии. Препарат помещают на предметный столик микроскопа и устанавливают объектив 8X (10X) напротив одной из капель. Смотря в окуляр, плавными и медленными движениями макровинта фокусируют препарат и осторожно, поворотом револьвера, устанавливают объектив 40X. Макровинт больше не трогают, а фокус находят с помощью плавных движений макровинта. Просмотрев одну каплю, аккуратно передвигают столик микроскопа с пре-

паратом, не поднимая объектив, так, чтобы напротив линзы оказалась вторая капля. Если необходимо, дополнительно фокусируют препарат движением микровинта. Просматривают и зарисовывают микроорганизмы, отметив способность к движению, форму и устойчивые сочетания клеток (*Micrococcus luteus* — кокки в гроздьях и пакетах; *Leuconostoc mesenteroides* — кокки в цепочках, стрептококки; *Lactobacillus delbrueckii* — тонкие длинные одиночные палочки; *Rhodospirillum rubrum* — мелкие спиралевидные активно подвижные клетки; *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., *Anabaena variabilis*, *Fischerella muscicola* — клетки различной формы, собранные в нити). Вместо указанных культур можно использовать другие микроорганизмы с соответствующей морфологией.

1.2. Приготовление фиксированных окрашенных препаратов микроорганизмов и знакомство с их морфологией.

Необходимые материалы: микробные культуры с разной морфологией на жидких (*Streptomyces* sp., *Rhodomicrobium vannielii*) и твердых (*Pseudomonas* sp., *Mycobacterium flavescens*, *Nocardia* sp., *Caulobacter crescentus*) средах; обезжиренные предметные стекла, микробиологическая петля и стерильные пипетки, водопроводная вода и растворы красителей (фуксин, метиленовая синь, кристаллвиолет и др.) в капельницах; иммерсионное масло; спиртовка или газовая горелка; фильтровальная бумага; световой микроскоп с объективами 8X (10X), 40X и 90X (100X), маркер по стеклу, пинцет.

Фиксированные окрашенные препараты готовят на обезжиренных предметных стеклах, сделав необходимые надписи маркером на краях стекла. В случае роста культуры на твердой среде (на скошенном МПА) на предметное стекло помещают каплю водопроводной воды, в нее с помощью простерилизованной в пламени горелки петли вносят небольшое количество клеток микроорганизма, снятых с поверхности агара, и хорошо размешивают. Каплю культуры, выращенной в жидкой питательной среде, наносят на предметное стекло стерильной пипеткой. Полученную каплю суспензии равномерно распределяют по стеклу петлей или пипеткой до тонкого слоя и высушивают на воздухе. На одном предметном стекле можно готовить от 1 до 3 мазков, следя за тем, чтобы они не сливались. Удерживая стекло пинцетом мазком вверх, три раза вводят его в наиболее горячую часть пламени горелки или спиртовки для фиксации клеток. Для окрашивания клеток охлажденный фиксированный препарат помещают на параллельные стеклянные рейки, лежащие над кюветой (рис. 2.9), и заливают мазки красителем на 1–15 мин.

Для окраски фиксированных микроорганизмов чаще всего используют анилиновые красители. При **простой окраске** прокрашивается вся клетка таким образом, что ее форма и размеры хорошо видны. **Дифференциальная окраска** предполагает окрашивание определенных клеточных структур или включений. Необходимо следить, чтобы во время окрашивания раствор красителя на мазке не подсыхал, и в случае необходимости подливать на мазок новые порции красителя. По окончании окраски препарат промывают водой до тех пор, пока стекающая вода не станет прозрачной. Препарат высушивают на воздухе. Можно протереть фильтровальной

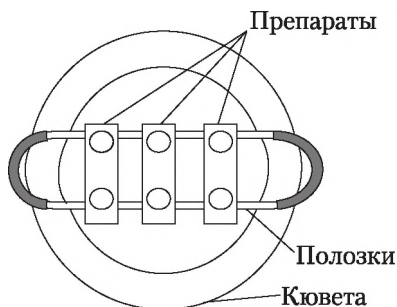
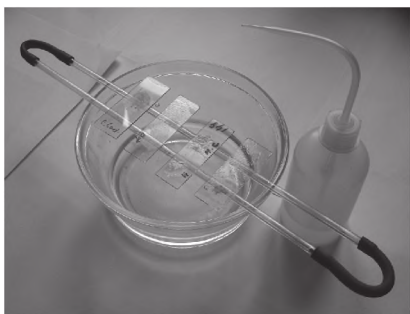


Рис. 2.9. Схема расположения препаратов на рейках над кюветой (вид сверху)

бумагой нижнюю поверхность стекла и промокнуть без сдвига верхнюю поверхность препарата, где находятся мазки. При приготовлении обычных фиксированных окрашенных препаратов покрывное стекло не используют.

Препарат помещают на предметный столик микроскопа мазками вверх. Техника микроскопирования фиксированных окрашенных препаратов существенно отличается от методики просмотра препаратов «раздавленная капля». Сначала на малом увеличении (объектив 8X) фокусируют препарат с помощью макровинта, смотря в окуляр микроскопа. Окрашенные клетки движением столика передвигают в центр поля зрения. Затем поднимают револьвер с объективами вверх до упора и устанавливают иммерсионный объектив 90X (100X). Каплю иммерсионного масла наносят непосредственно на мазок препарата. Наблюдая сбоку (не в окуляр), осторожно опускают объектив микроскопа до соприкосновения линзы с каплей масла на препарате. После этого макровинт микроскопа трогать не следует. Осторожно находят фокус макровинтом микроскопа. Важно не раздавить препарат, иначе это приведет к необходимости его повторного изготовления и может повредить линзу объектива. Для изменения поля зрения препарата пользуются только винтами передвижения столика, при необходимости корректируя фокус макровинтом. После просмотра препарата поднимают объектив, вытирают его мягкой бумажной салфеткой, смоченной спиртом с эфиром. Для очистки поверхности препарата от масла применяют лишь мягкую бумагу. Такой препарат может быть сохранен и просмотрен еще несколько раз, однако постепенно мазки при очистке будут стираться.

Сравнивают морфологию клеток микроорганизмов на фиксированных окрашенных препаратах, отмечая особенности их строения (*Pseudomonas* sp. — мелкие палочки в коротких цепочках и гроздьях; *Mycobacterium flavescens*, *Nocardia* sp. — плейоморфные палочковидные клетки с разной степенью ветвления; *Streptomyces* sp. — мицелиальные формы, образующие экзоспores; *Caulobacter crescentus* — палочки с простеками; *Rhodomicrobium vannielii* — палочки со стебельками, размножающиеся почкованием) и зарисовывая просмотренные препараты. Вместо указанных культур можно использовать другие микроорганизмы с соответствующей морфологией. Также можно использовать готовые фиксированные окрашенные препа-

раты, предназначенные для неограниченного по времени использования. Для большей сохранности зафиксированный окрашенный мазок на предметном стекле залит канадским бальзамом и покрыт тонким покровным стеклом. Процедура просмотра такого препарата с помощью иммерсионного объектива ничем не отличается от приемов, описанных для обычных фиксированных окрашенных препаратов за исключением того, что каплю масла необходимо нанести на поверхность покровного стекла. После просмотра препарата поднимают объектив и вытирают его линзу и поверхность препарата мягкой бумажной салфеткой, смоченной спиртом с эфиром.

1.3. Обнаружение некоторых структур и запасных веществ микроорганизмов микроскопическими методами.

Необходимые материалы: микробные культуры на жидких (*Gloeotheca* sp., *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Beggiatoa* sp., *Chromatium minutissimum*) и твердых (*Azotobacter chroococcum*, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces cerevisiae*) средах; обезжиренные предметные и покровные стекла, микробиологическая петля и стерильные пипетки, водопроводная вода и растворы красителей (фуксин, метиленовая синь по Леффлеру или малахитовый зеленый, сафранин, кристаллвиолет и др.) в капленицах; тушь, раствор Люголя, иммерсионное масло; спиртовка или газовая горелка; фильтровальная бумага; световой микроскоп с объективами 8X (10X), 40X и 90X (100X), маркер по стеклу, пинцет.

Капсулы можно наблюдать в препаратах «раздавленная капля». У некоторых микроорганизмов капсулы имеют плотную структуру и четкие границы, поэтому их видно при небольшом затенении поля зрения путем прикрытия диафрагмы конденсора. Так, у цианобактерии *Gloeotheca* sp. видны агрегаты из 4—6 крупных овальных клеток, покрытых толстой капсулой, имеющей четкие границы. Кроме того, каждая клетка внутри агрегата также имеет свою тонкую капсулу.

Капсулы более рыхлой структуры могут быть обнаружены методом негативного контрастирования. Небольшое количество клеток *Azotobacter chroococcum* с твердой питательной среды помещают петлей на предметное стекло в каплю водопроводной воды, смешивают полученную суспензию с каплей туши, накрывают покровным стеклом, удаляя избыток жидкости фильтровальной бумагой, и просматривают препарат с объективом 40X. При этом на общем сером фоне препарата хорошо видны беловатые рыхлые капсулы, окружающие мелкие палочковидные клетки.

Эндоспоры наблюдают несколькими способами. Они легко обнаруживаются в препарате «раздавленная капля» с помощью фазово-контрастной микроскопии в виде белых включений на фоне темно-серых клеток. При простом окрашивании (например, фуксином) фиксированного препарата они видны в клетке как бесцветные или слабоокрашенные круглые или овальные тельца. Наиболее наглядный результат дает дифференциальная окраска эндоспор. Небольшое количество клеток *Bacillus cereus* (или другого вида спорообразующих бактерий) с твердой среды помещают петлей на предметное стекло в каплю водопроводной воды и распределяют по поверхности в виде тонкого мазка. После высушивания на воздухе и фиксации в пламени горелки мазок заливают раствором

метиленового синего по Леффлеру. Держа предметное стекло пинцетом над пламенем горелки, доводят краситель до кипения в течение 10–15 с. Нагревание повторяют еще два раза, по мере испарения добавляя краситель на мазок. После охлаждения предметного стекла препарат тщательно промывают водой, после чего клетки в течение 30 с докрашивают 0,5%-м водным раствором сафранина. Вместо метиленового синего можно использовать другой краситель, например, 7,5%-й раствор малахитового зеленого, проводя окрашивание с подогревом в течение 7–10 мин, помещая препарат над сосудом с кипящей водой. Докрашивание в этом случае осуществляют 0,25%-м водным раствором сафранина в течение 1–2 мин. Затем препарат промывают водой, высушивают и просматривают с иммерсией (90X–100X). При правильном выполнении в первом случае вегетативные клетки окрашены в красный, а споры — в синий цвет. При втором сочетании красителей споры будут зелеными, а вегетативные клетки — розовыми.

Выявление включений **полифосфатов (волютиновых гранул)** основано на свойстве метахромазии, т.е. изменении цвета некоторых красителей (например, метиленового синего) при взаимодействии с определенным компонентом клетки. Каплю культуры *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, выращенную на жидкой среде, помещают на предметное стекло, делая тонкий мазок. После высушивания его на воздухе и фиксации в пламени горелки мазок заливают раствором метиленового синего по Леффлеру и выдерживают в течение 10–15 мин. Затем препарат промывают водой, высушивают на воздухе и просматривают с иммерсионной системой (90X–100X). При этом клетки окрашиваются в голубой цвет, а гранулы полифосфатов — в фиолетово-красный, т.е. простая окраска в данном случае дает результат дифференциального окрашивания.

Одним из запасных веществ у микроорганизмов являются **гликогенopodobные полисахариды**. К капле слегка подкисленной суспензии клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом 40X. Включения гликогенopodobного полисахарида окрашиваются в красно-коричневый цвет.

Микроорганизмы, окисляющие неорганические восстановленные соединения серы, часто накапливают **элементарную серу** в качестве промежуточного продукта. Благодаря двойному светопреломлению включения серы хорошо заметны в виде ярко-желтых капель без специального окрашивания в клетках *Beggiatoa* sp., *Chromatium minutissimum* и некоторых других микроорганизмов. Поэтому достаточно приготовить из этих культур препарат «раздавленная капля» и промикроскопировать его, пользуясь объективом 40X.

Лабораторная работа 2

Приготовление питательных сред и методы стерилизации

Цель работы: ознакомиться с методами приготовления и стерилизации сред и инструментов, научиться подбирать среды для разных групп микроорганизмов и адекватные способы их стерилизации, а также овладеть техникой посева микробных клеток на разные виды сред.

2.1. Подготовка и стерилизация посуды и инструментов для работы с микроорганизмами.

Необходимые материалы и оборудование: сухие чашки Петри, пробирки или пенициллиновые флакончики с ватными пробками, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл, вата, препаровальные иглы, узкие полоски тонкой бумаги, плотная бумага, шпагат, жестяные пеналы, сухожаровой шкаф.

Чистую и сухую стеклянную посуду готовят к стерилизации «сухим жаром». Чашки Петри заворачивают в плотную бумагу по 3—5 шт. в пачке крышками вверх. В пипетки разного объема с тупого конца вставляют небольшой комочек ваты, так чтобы он не проваливался внутрь пипетки, но при этом позволял через пипетку затягивать воздух ртом. Затем каждую пипетку, начиная с острого конца, плотно заворачивают по спирали в узкую полоску тонкой бумаги. Далее пипетки одного объема пакуют в свертки из плотной бумаги. При больших объемах посевов можно незавернутые пипетки с заткнутыми ватой тупыми концами поместить острыми концами вниз в жестяные пеналы с плотно закрывающимися крышками. Сухие пробирки и пенициллиновые стаканчики закрывают ватными пробками и заворачивают по 10—15 шт. в плотную бумагу. Стеклянные шпатели Дригальского индивидуально заворачивают в бумагу, начиная с треугольной части, а затем 5—10 шт. пакуют вместе в плотную бумагу. Подготовленную таким образом посуду и инструменты стерилизуют в сухожаровом шкафу при 165—170°C в течение 2 ч.

Для работы могут быть использованы одноразовые пластиковые стерильные чашки Петри, пипетки и шпатели в индивидуальной упаковке.

2.2. Приготовление сред и растворов для культивирования микроорганизмов и их стерилизация.

Необходимые материалы и оборудование: автоклав, емкости (колбы) для приготовления сред, мерные стаканы и цилиндры, широкие и узкие пробирки с ватными пробками, порошок МПБ, 4°Б неохмеленное пивное сусло, порошок или пластинчатый агар, горелки или спиртовки, водяная баня, жестяные ведра или банки для помещения пробирок в автоклав.

В нескольких емкостях готовят рассчитанное количество мясо-пептонного бульона (МПБ) из готового порошка, растворяя его в подогретой воде в соответствии с прописью. Часть МПБ наливают в колбы не более чем на треть их высоты, колбы закрывают ватными пробками и бумажными колпачками. На колпачках указывают название среды и режим стерилизации, а также номер комнаты и фамилию исследователя. Колбы с МПБ отдают на стерилизацию в автоклав при 1,0 ати. Другую часть МПБ используют для приготовления мясо-пептонного агара (МПА), добавляя к МПБ в колбах 1,5—2,0%-го агара. Содержимое колб перемешивают до полного смачивания агара. Сосуды закрывают ватными пробками и бумажными колпачками. На колпачках указывают название среды и режим стерилизации, а также номер комнаты и фамилию исследователя. Колбы с МПА отдают на стерилизацию в автоклав при 1,0 ати. Таким же образом можно приготовить сусло и сусло-агар (СА), отдав их на стерилизацию в автоклаве при 0,5 ати.

Для накопления гетеротрофных микроорганизмов, выявления их био-разнообразия и выделения из естественных субстратов готовят бульон-

сусло-агар (БСА), содержащий как большое количество белков, пептидов и аминокислот, так и значительную концентрацию сахаров. Для этого в колбу вносят МПБ и 4°Б (с концентрацией сахара 4°, определенной с помощью ареометра Баллинга) неохмеленное пивное сусло в соотношении 1 : 1, а затем добавляют 1,5–2,0%-го агара. Содержимое перемешивают для смачивания агара и колбу помещают в кипящую водяную баню. После расплавления агара среду разливают по 20 мл в широкие пробирки и по 5 мл — в узкие пробирки. В широких пробирках содержатся порции среды для последующего заполнения стерильных чашек Петри и изготовления агаровых пластинок. БСА в узких пробирках предназначен для изготовления скошенного агара. Пробирки с питательной средой закрывают ватными пробками, складывают в жестяные банки или ведра, сверху оборачивают плотной бумагой, которую закрепляют шпагатом. На бумаге указывают название среды и режим стерилизации, а также номер комнаты и фамилию исследователя. Пробирки с БСА стерилизуют в автоклаве при 0,5 ати. Среду после стерилизации используют для дальнейшей работы с микроорганизмами.

Для приготовления суспензий микроорганизмов обычно берут стерильную воду. Для стерилизации водопроводную воду разливают в колбы (не более трети высоты) или в узкие пробирки по 10 мл. Сосуды закрывают ватными пробками, пробирки складывают в жестяные банки или ведра. Сверху на колбы и ведра следует закрепить бумажные колпачки с указанием названия среды и режима стерилизации, а также номера комнаты и фамилии исследователя. Воду стерилизуют в автоклаве при 1,0 ати.

Поскольку в лабораториях обычно проводится коллективная стерилизация специальными допущенными лицами, студентов следует ознакомить с устройством и принципом работы автоклава.

2.3. Подготовка стерильных сред и растворов к посеву и техника посева микроорганизмов.

Необходимые материалы и оборудование: культуры *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis* на твердых средах, колбы и пробирки со стерильными жидкими и агаризованными средами, пробирки со стерильной водой, стерильные пустые чашки Петри, пробирки или пенициллиновые флаконы, микробиологическая петля, стерильные пипетки разного объема, стерильные стеклянные шпатели, горелки или спиртовки, водяная баня, лоток для скашивания агара в пробирках, термостат.

Если агаризованная среда получена сразу после стерилизации и находится в расплавленном состоянии, то ее можно охладить до 45–50°С и разливать по стерильным сосудам. Если агар уже застыл, то его предварительно надо полностью расплавить, поместив колбы и пробирки со средой в кипящую водяную баню. В стерильные чашки Петри расплавленную и остуженную до 45–50°С агаризованную среду разливают у пламени горелки или спиртовки (по 20–25 мл на чашку) либо из колбы, либо из широких пробирок, где имеется необходимая порция среды (содержимое одной широкой пробирки на чашку). Крышку чашки Петри следует приоткрывать со стороны пламени только в момент наливания МПА, а все остальное время нужно держать закрытой. Чашки с агаром помещают на ровную горизон-

тальную поверхность до застывания среды. Перед посевом на дне чашки с краю подписывают дату посева, наименование микроорганизма и свои инициалы.

Узкие пробирки с агаризованной средой помещают в кипящую водяную баню для расплавления агара, а затем пробками вверх укладывают на лоток для скашивания (можно использовать как подставку под горлышко пробирки толстый карандаш или кусок шланга). Расплавленный агар не должен касаться внутренней части ватной пробки. После застывания агара пробирки следует подписать со стороны, противоположной скошенной поверхности агара.

В стерильные жидкие и на поверхность твердых сред посев осуществляют либо непосредственно петлей, либо изготовив суспензию клеток в стерильной водопроводной воде. В первом случае прокаленной и остуженной петлей набирают клетки микроорганизмов *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis* с твердых сред и суспендируют их в жидкой среде в колбе или пробирке либо проводят линии (штрихи) зеркальцем петли по поверхности агара. Обычно на агаровых пластинках в чашках Петри для получения отдельных колоний посев осуществляют зигзагообразной линией, а на скошенном агаре в пробирках — прямым или зигзагообразным штрихом, начинающимся снизу. Крышки чашек при посеве приподнимают со стороны пламени только на время манипуляций петлей! При посеве в пробирку со скошенным агаром ватную пробку вынимают у огня, прижимая ее верхнюю часть мизинцем и ладонью той руки, которой держат петлю. Внутренняя часть пробки не должна касаться руки и всех окружающих предметов. Горлышко пробирки, находящейся в другой руке, быстро обжигают в пламени. Петлю с клетками микроорганизма вводят в пробирку до дна и, положив плашмя, ведут ей прямой или зигзагообразный штрих вверх по скошенной плоской части агара. Внутреннюю часть пробки быстро обжигают в пламени и вставляют в пробирку.

Во втором случае сначала готовят суспензию клеток *Escherichia coli* или *Bacillus subtilis* в пробирках или пенициллиновых флаконах со стерильной водой. Клетки с твердых сред берут петлей и суспендируют их в воде у огня, соблюдая стерильность. Затем стерильной пипеткой набирают аликвоту суспензии и переносят ее в колбы с жидкими средами или на поверхность агаризованной среды в чашках. По поверхности агаровой пластинки каплю суспензии осторожно растирают треугольной частью шпателя, круговыми движениями, приоткрыв крышку чашки со стороны пламени.

Засеянные сосуды с культурами помещают в термостат при 28—30°C на 1—2 сут. Чашки ставят на инкубацию вверх дном во избежание попадания на агар конденсата. При появлении хорошо видимого роста (штрихов или колоний) следует перенести посевы в холодильник и хранить их до следующего занятия при 4°C.

Глава 3

СТРОЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности клеточного строения различных микроорганизмов;

уметь

- объяснить разницу строения прокариотической и эукариотической клеток;

владеть

- навыками изучения движения клеток микроорганизмов.
-

3.1. Типы клеточной организации (эукариоты и прокариоты) и неклеточная форма жизни (вирусы)

Для большинства микроорганизмов можно считать справедливым утверждение, что это маленькие, просто устроенные организмы, имеющие универсальное строение. В то же время мир микробов, населяющих нашу планету, чрезвычайно разнообразен. Его представители различаются между собой морфологически, а также физиологическими и биохимическими свойствами.

Все живые клетки имеют цитоплазму, цитоплазматическую мембрану (ЦПМ) и наследственный материал. По принципу клеточной организации микроорганизмы могут быть отнесены к двум типам — прокариоты и эукариоты (рис. 3.1). Для прокариот характерно более простое устройство клетки. Клетки **эукариот** имеют оформленное **ядро**, окруженное ядерной мембраной и содержащее набор **хромосом**, в то время как у прокариот ядерный аппарат (**нуклеоид**) представлен, как правило, кольцевой молекулой ДНК, соответствующей одной хромосоме. Эукариотические клетки содержат **органеллы**, отделенные от цитоплазмы собственными мембранами, а внутреннее пространство клетки разделено на множество участков разветвленной сетью мембран (**эндоплазматической сетью**). У прокариот разрастания ЦПМ внутрь клетки значительно, менее выражены, а структуры, участвующие в дыхании и фотосинтезе, находятся в ЦПМ или ее выростах. **Рибосомы** эукариот имеют более сложное строение и могут быть прикреплены к мембранам эндоплазматической сети в отличие от прокариотических рибосом, свободно лежащих в цитоплазме. В клетках эукариот никогда не встречается сетчатый полисахарид **пептидогликан (муреин)**, а у прокариот — это широко распространенный компонент клеточных стенок.

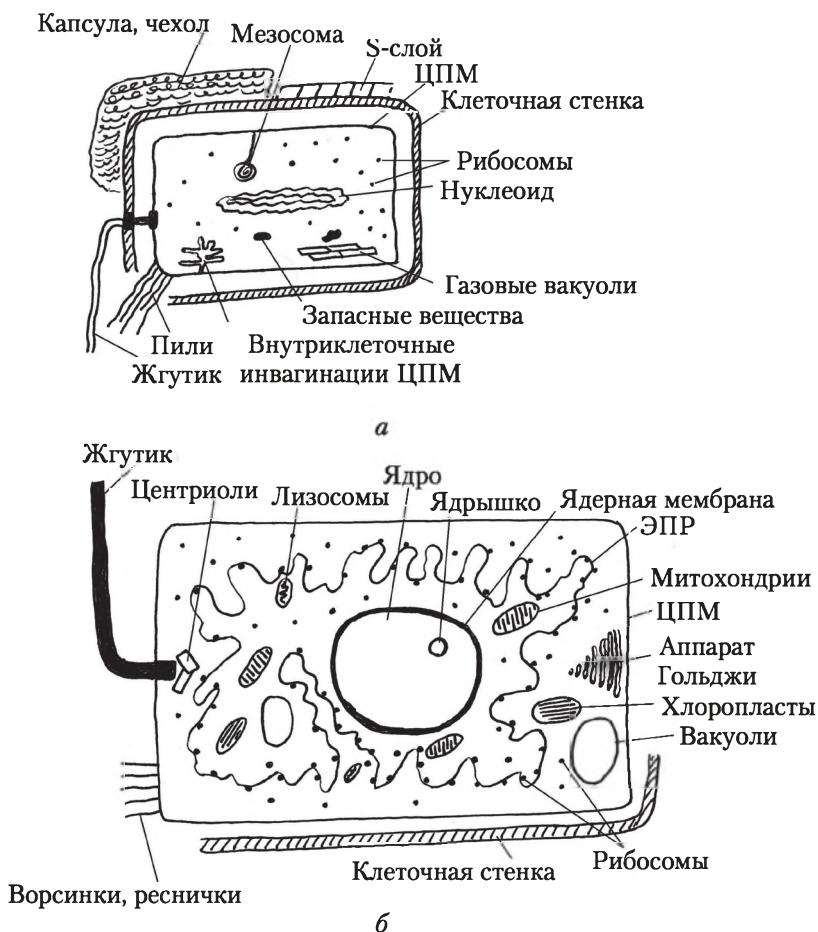


Рис. 3.1. Строение клеток:

а — прокариотической; *б* — эукариотической

Прокариотические клетки способны поглощать из окружающей среды только растворенные в воде соединения, в то время как некоторые эукариоты могут осуществлять поглощение твердых веществ и капель жидкостей, не смешивающихся с водой. Процессы деления прокариотических клеток проще, чем эукариот.

Несмотря на простую организацию, прокариоты обладают значительно более широкими возможностями обмена веществ (**метаболизма**). Прокариоты способны использовать восстановленные неорганические соединения для получения энергии, атмосферный азот для синтеза веществ клетки, осуществлять фотосинтез без выделения кислорода и образовывать метан в процессе жизнедеятельности.

Такие группы микробиологических объектов, как простейшие, микроводоросли и низшие грибы, относят к эукариотам, а клетки бактерий и архей имеют прокариотическую организацию. Ряд отличительных особенностей эукариот и прокариот приведен в табл. 3.1.

Некоторые отличительные признаки эукариот и прокариот

Признак	Прокариоты	Эукариоты
Наименьший размер клетки — 0,05 мкм	+	–
Наличие оформленного ядра	–	+
Наличие автономных органелл	–	+
Рибосомы распределены в цитоплазме	+	+
Рибосомы прикреплены к ЭПР	–	+
Жгутики (если есть) диаметром 0,01–0,02 мкм	+	–
Жгутики (если есть) диаметром около 0,2 мкм	–	+
Число хромосом	1–2 (до 140)	> 1
Кольцевая хромосома	+	–
Линейные хромосомы	–(+)	+
Рибосомы с константой седиментации 70S	+	–
Рибосомы с константой седиментации 80S	–	+
Константы седиментации рибосомальной РНК: 5S; 16S; 23S	+	–
Константы седиментации рибосомальной РНК: 5S; 5,8S; 18S; 28S	–	+
Присутствие пептидогликана	+(-)	–
Клеточное деление происходит в результате митоза	–	+
Возможность мейоза	–	+
Перенос генов и рекомбинация включают гаметогенез и образование зиготы	–	+
Возможность латерального (горизонтального) переноса генов	+(-)	–
Диффузия или транспорт веществ через мембрану	+	+
Эндоцитоз	–	+
Дыхательный и фотосинтезирующий аппарат ассоциирован с ЦПМ или ее выростами	+	–
Способность к хемолитотрофии	+	–
Способность к фиксации молекулярного азота	+	–
Способность к метаногенезу	+	–
Способность к аноксигенному фотосинтезу	+	–

Вирусы, первоначально отнесенные к микроорганизмам, в настоящее время рассматривают как особые биологические формы, не имеющие клеточного строения. Вирусные частицы состоят на 50—60% из белков и на 40—50% — из нуклеиновых кислот одного из типов (ДНК или РНК) (рис. 3.2), одно- или двухцепочечных.

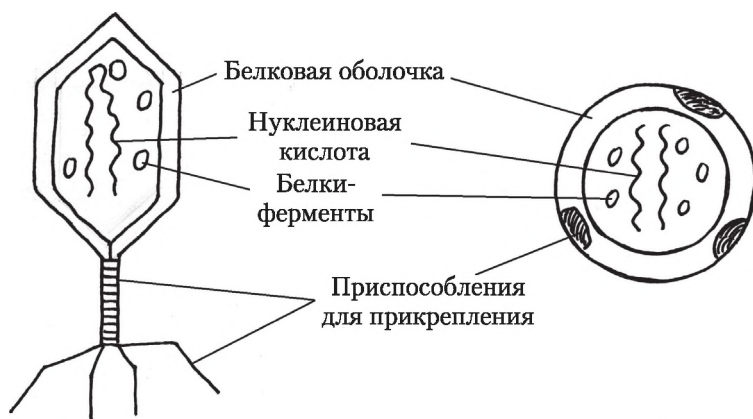


Рис. 3.2. Вирусные частицы

Липиды, гликопротеины, сахара и полисахариды, полиамины представлены как минорные компоненты. Большинство известных вирусов сохраняют активность при pH 3—9, давлении в несколько тысяч атмосфер и после 3—5 лет хранения в лиофильно высушенном состоянии, но инактивируются при температуре 60°C в течение 30—60 мин и при УФ-облучении. Вирусы являются облигатными паразитами, способными развиваться только внутри клеток хозяина. Они поражают как прокариотические, так и эукариотические клетки. Вирусы прокариот называют **фагами (бактериофагами)**. **Литический цикл** развития вируса (рис. 3.3) включает стадию заражения клетки-хозяина, при котором вирусная частица взаимодействует с рецепторами наружной оболочки клетки и прикрепляется к ним. На одной прокариотической клетке может адсорбироваться 200—300 фаговых частиц. Белковая оболочка вирусной частицы (**капсид**) остается на наружной стороне оболочки клетки-хозяина, а нуклеиновая кислота вируса, несущая генетическую информацию, проникает внутрь. Она может оставаться автономной или интегрироваться в наследственный материал хозяина и переключать активность клетки-хозяина на синтез новых вирусных частиц. После их сборки и созревания зараженная клетка разрушается (происходит ее **лизис**) и многочисленные новые вирусные частицы, попадая в окружающую среду, способны заражать новые клетки.

В ряде случаев генетический материал вируса может длительное время присутствовать в клетке-хозяине, не проявляя активности и не нарушая нормального клеточного метаболизма. Такое состояние вируса называют **латентным**, или **лизогенным** (см. рис. 3.3), поскольку при изменении условий генетический материал вируса способен переходить в активное состояние и осуществлять литический цикл. Латентные (умеренные) фаги при

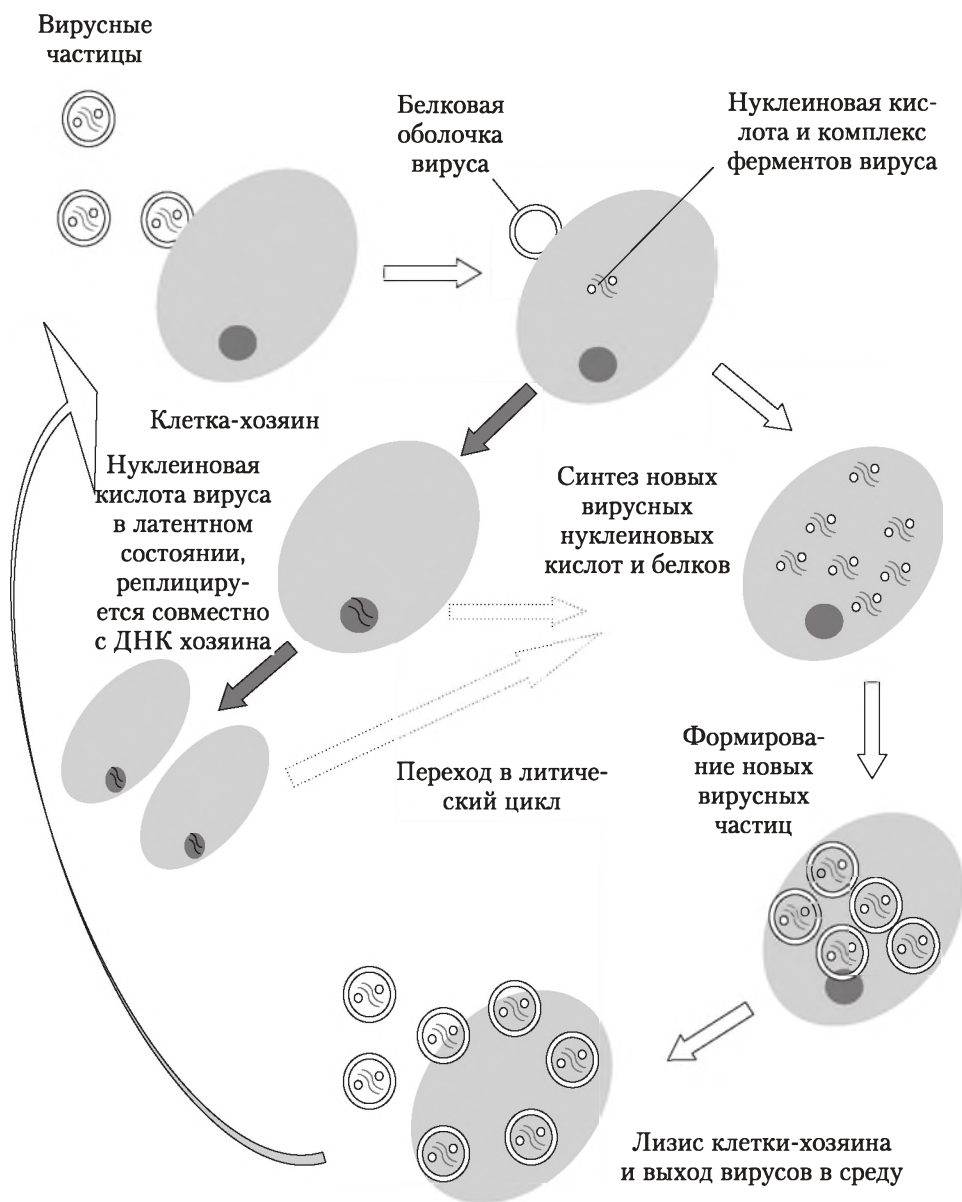


Рис. 3.3. Циклы развития вирусов

инфицировании встраивают свою нуклеиновую кислоту в геном прокариотической клетки и в дальнейшем репродуцируются синхронно с ним при делении. В этом случае дочерние клетки несут в себе неактивную форму фага — **профаг**. **Лизогенные культуры** приобретают устойчивость к повторному заражению этим же фагом, так как в цитоплазме клетки синтезируется белок-репрессор, подавляющий размножение вегетативных фагов и ингибирующий переход профага в активное состояние. Присутствие латентного фага приводит к изменениям свойств клетки-хозяина. Это явление называют **фаговой конверсией**.

3.2. Цитология прокариотической клетки

3.2.1. Основные молекулы и процессы

Все живые существа на Земле, состоящие из клеток, характеризуются присутствием сложных макромолекул — нуклеиновых кислот и белков. **Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)** несет в себе всю наследственную информацию организма, закодированную в форме последовательности дезоксирибонуклеотидов, составляющих эту сложную двухцепочечную молекулу. Чтобы эта информация могла реализоваться в свойствах конкретного организма, должны произойти два события: синтез информационных (матричных) рибонуклеиновых кислот (иРНК или мРНК) и синтез белковых молекул (рис. 3.4); иРНК образуются в процессе **транскрипции**, при котором информация «переписывается» с одной из цепей ДНК в виде последовательности рибонуклеотидов. В процессе **трансляции**, происходящем на **рибосомах**, молекула иРНК используется в качестве матрицы, по которой выстраивается последовательность аминокислот в растущей белковой цепи (т.е. знаки генетического кода — нуклеотиды «переводятся» в «буквы» аминокислот).

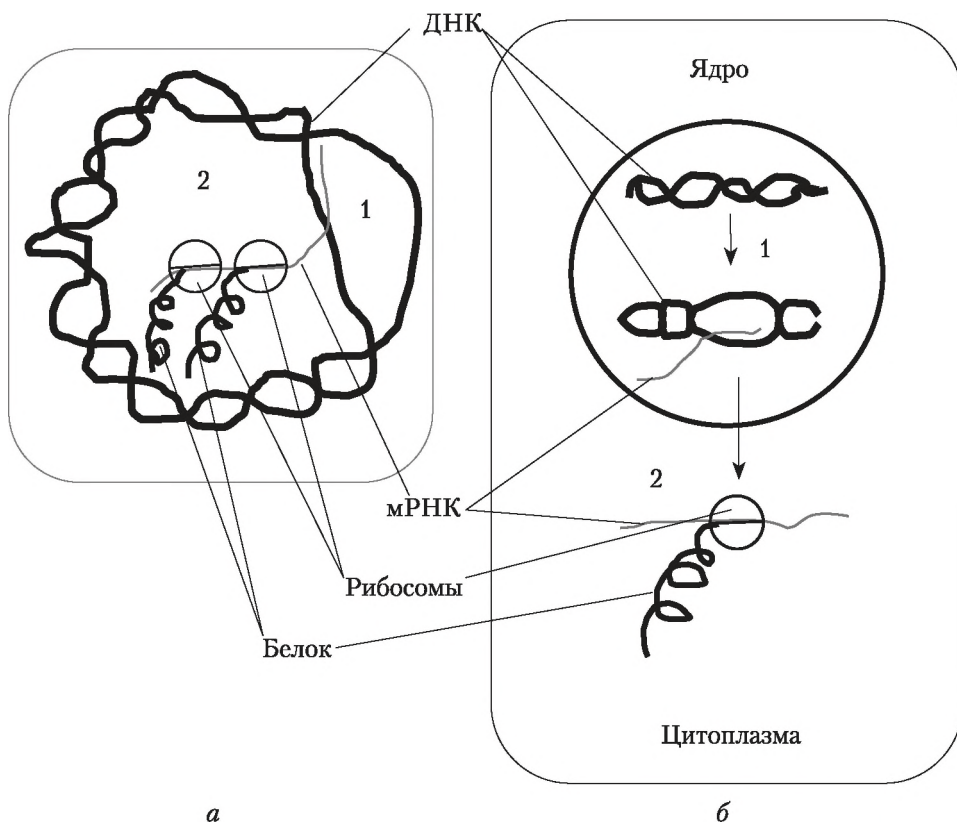


Рис. 3.4. Транскрипция (1) и трансляция (2):

а — прокариоты; б — эукариоты

Рибосома состоит из субъединиц белка и особых рибосомальных РНК (рРНК). Активированные аминокислоты доставляются на рибосому с помощью специальных транспортных РНК (тРНК). Линейная аминокислотная цепь складывается определенным образом и образует белок. Клеточные белки бывают двух типов: белки-ферменты и структурные белки. Первые катализируют различные реакции, а вторые используются для построения компонентов клетки.

Любая живая клетка, в том числе прокариотическая, отделена от окружающей среды тонкой оболочкой особого строения — цитоплазматической мембраной (ЦПМ). Внутри клетки прокариот различают две области — цитоплазму и ядерную зону.

3.2.2. Ядерная зона и генетический аппарат клеток прокариот

Бактериальные хромосомы были открыты много позднее, чем эукариотические, так как они не проявляют свойства конденсироваться в метафазе. В 1956 г. внутри бактериальных клеток была обнаружена «ядерная зона» (нуклеоид), в которой размещена бактериальная хромосома. В середине 60-х гг. прошлого века было установлено состояние суперскрученности бактериальной ДНК, а затем в течение 10 лет исследовали ферменты, которые отвечают за ее сверхспирализацию и раскручивание (топоизомеразы, гиразы). В 70-х гг. XX в. стало возможным выделение компактной формы тотальной ДНК из клеток бактерий.

По современным представлениям молекулярной биологии, хромосома содержит: большие молекулы ДНК как носители генетической информации; молекулы РНК, копирующие и передающие информацию с определенных генов; белки-ферменты, которые репарируют повреждения ДНК, удваивают ДНК и контролируют модели экспрессии генов. Ферменты также скручивают и складывают ДНК внутри клетки. Бактериальная ДНК обнаружена у большинства прокариот в форме кольца и связана с выростом ЦПМ (**мезосомой**). Находясь в состоянии суперскрученности, она собрана в крупные петли (домены). Считают, что ДНК прикреплена к ЦПМ и в других участках. С мезосомой связаны сайты начала (*ori C*) и окончания (*Ter*) репликации. Репликация бактериальной хромосомы происходит постоянно в течение клеточного цикла. Комплекс ферментов, ответственный за образование репликативной вилки, узнает участок *ori C*. После образования репликативной вилки в работу включается ДНК-полимераза III. Две копии хромосомы после репликации разъединяются путем разрастания ЦПМ и клеточной стенки и после построения поперечной перегородки оказываются в дочерних клетках. Также есть данные об участии в этом процессе миозинподобных белков, располагающихся на дистальных концах расходящихся нуклеоидов.

Прокариотическая ДНК обнаружена также в линейной форме. Линейные ДНК найдены в клетках *Borrelia burgdorferi*, *Streptomyces* spp., *Rhodococcus fascines* и *Agrobacterium tumefaciens*. У стрептомицетов на концах линейной хромосомы могут присутствовать молекулы «замыкающего» белка или инвертированные повторы. Такие хромосомы могут находиться в клетках как в линейном, так и в кольцевом состоянии. Считают,

что репликация линейных хромосом, находящихся в форме кольца, идет от *ori C* в двух направлениях, а у находящихся в линейной форме — от концов к центру. У *B. burgdorferi* на концах имеются шпильки, которые функционируют подобно теломерам линейных хромосом эукариот и облегчают полную репликацию. Участок *ori C* находится в центре. У микроорганизмов с линейными хромосомами обнаруживаются и линейные плазмиды.

Индивидуальная клетка прокариот может 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.

Наличие множественных копий хромосомы (полиплоидия) хорошо известно у эукариот. Индивидуальная клетка прокариот в физиологически активном состоянии также может содержать несколько идентичных копий одной хромосомы и мультикопийные гены. Например, *E. coli* содержит примерно 11 геномных эквивалентов на клетку при росте в богатой среде, в то время как количество хромосом в медленно растущих клетках равно 1–2. У самой крупной бактерии *Epulopiscium fishelsoni* на разных стадиях жизненного цикла количество копий ДНК может различаться в 4–5 раз. Предполагают, что клетки используют ДНК как запасное вещество, подобно крахмалу, жиру или гликогену для других организмов. У видов рода *Vibrio*, *Leptospira interrogans*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Brucella* spp. обнаружены две кольцевые хромосомы, у *Rhizobium meliloti* — три, у различных изолятов *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* — от двух до четырех. У некоторых видов, как и у прокариот, в клетке находят две-три неидентичные хромосомы. Например, некоторые виды рода *Agrobacterium* содержат одну кольцевую и одну линейную хромосомы. Клетки *Azotobacter chroococcum* могут на определенных стадиях жизненного цикла содержать до 140 хромосом. 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. Таким образом, хромосомы про- и эукариот не могут больше рассматриваться как совершенно разные по форме молекулы ДНК (оба типа могут быть линейными), по уровню плоидности (оба типа могут быть полиплоидными) и по числу групп сцепления. Самое существенное различие между эу- и прокариотами в организации наследственного аппарата — это наличие ядерной мембраны, гистонов и нуклеосом, в виде которых упакована ДНК эукариот. Действительно, бактерии не имеют таких белков и не образуют нуклеосомы, однако некоторые археи синтезируют гистоноподобные белки и формируют стабильные нуклеосомы. Имеются данные об обнаружении зачатков ядерной мембраны у некоторых бактерий — планктомицетов. Следовательно, различия в организации генетического материала прокариот и эукариот уже не являются столь явными, как считали ранее.

Данные, полученные на *E. coli*, показывают, что при протяженности хромосомы $3,8 \times 10^6$ пар оснований (п.о.) средняя величина гена составляет 1 тыс. п.о. (от 7 до 18 тыс. п.о.). Кодировочные области занимают 85% хромосомы. 10% генома составляют некодирующие последовательности (мигрирующие элементы, сайты рекомбинации, регуляторы транскрипции, поврежденные умеренные фаги и т.д.). Регуляторные области малы и располагаются между структурными генами. Функции около одной трети генов хромосомы не установлены.

3.2.3. Дополнительные генетические элементы микроорганизмов

У микроорганизмов наряду с основной хромосомой обнаружены дополнительные кольцевые и линейные двухцепочечные ДНК как автономные, так и интегрированные в основную хромосому (плазмиды, транспозоны, инсерционные последовательности, геномные острова).

Крупные плазмиды, содержащие более 20 тыс. п.о., обычно представлены в клетке одной копией, тогда как мелкие плазмиды многокопийны. Крупные плазмиды, как правило, реплицируются синхронно с хромосомой, а мелкие — чаще. Плазмиды не являются обязательным для клетки элементом, хотя могут давать определенные преимущества. Известно, что плазмиды могут нести гены для синтеза бактериоцинов и ингибиторов к ним, гены устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам, различным лекарственным препаратам (R-плазмиды), гены факторов патогенности, гены деградации ксенобиотиков (D-плазмиды), гены, определяющие дополнительную метаболическую активность (например, ферменты разложения ароматических соединений) или способность поддерживать симбиозы (Sym-плазмиды). Способность к конъюгации определяется наличием F-плазмиды. Существуют криптические (молчащие) плазмиды, не определяющие какие-либо фенотипические признаки. Суммарное количество плазмидной ДНК может превышать количество хромосомной ДНК. Плазмиды могут распространяться от клетки к клетке при конъюгации, а также путем трансформации и трансдукции плазмидной ДНК.

Инсерционные последовательности (IS-элементы), транспозоны (Tn) и генные острова (ГО) относятся к мигрирующим элементам, которые представляют собой последовательности ДНК, имеющие специфическую структуру и автономно перемещающиеся по геному. IS-элементы и Tn имеют общий принцип организации, при котором центральные гены окаймлены с двух сторон сначала инвертированными, а затем дублированными повторами. Перемещение этих элементов осуществляется кодируемыми ими ферментами (транспозазами), которые могут связываться с однокитевой ДНК. IS-элементы — это последовательности ДНК размером 500—1500 п.о., в центральной части которых содержатся только гены, кодирующие синтез небольших белков, необходимых для их перемещения. Инвертированные повторы IS-элементов имеют размеры от нескольких пар до нескольких десятков пар оснований. Tn, в отличие от IS-элементов, содержат в центральной части гены, кодирующие какие-нибудь фенотипические признаки прокариот. Размеры Tn варьируют от 2 до 20 тыс. п.о. Транспозиция является высокоспецифичной системой рекомбина-

ции. Мигрирующие элементы встраиваются обычно в АТ-богатые районы ДНК, что вызывает мутацию. Генные острова представляют собой крупные гибридные фрагменты ДНК с отличным от хромосомной ДНК клетки-хозяина ГЦ-составом. Они несут в себе группы функционально родственных или неродственных генов и гены, продукты которых участвуют в рекомбинации. Большая протяженность (более 10 тыс. п.о.) делает их нестабильными, а их внедрение в геном хозяина придает нестабильность окружающим группам генов. Некоторые ГО могут утрачивать гены мобильности и становиться стабильными фрагментами, отличающимися по ГЦ-составу от генома клетки-хозяина. В природных микробных популяциях обмен плазмидами и мигрирующими элементами происходит с высокой интенсивностью, в том числе и между таксономически различными микроорганизмами. Однако существуют механизмы, поддерживающие консервативность генома и ограничивающие частоту геномных перестроек. Считают, что плазмиды и мигрирующие элементы представляют собой общий для микробной популяции «запас» генетической информации, распределенный между представителями различных таксономических групп. Любой член популяции может «воспользоваться» любым геном из этого запаса, не перегружая собственный геном. Мультипликация и распространение конкретного гена в популяции будут зависеть от селективного давления факторов окружающей среды.

3.2.4. Цитоплазма, включения и запасные вещества

Цитоплазма является коллоидной системой высокой вязкости (в 800—8000 раз превышающей вязкость воды) и представляет собой сложную смесь участвующих в метаболизме и инертных соединений, а также является местом ферментативных реакций. В цитоплазме прокариот находятся **рибосомы**. Они на 60% состоят из РНК и на 40% — из белка. Рибосомы прокариот меньше рибосом эукариотической клетки, но сходны с рибосомами ее органелл. Прокариотическая рибосома с коэффициентом седиментации 70S состоит из двух субъединиц (30S и 50S). Легкая субъединица содержит 16S рРНК, в тяжелой имеются 23S рРНК и 5S рРНК. В рибосоме обнаружено 55 разных белков. Цитоплазма может содержать включения и запасные вещества. **Включения** — это различные мембранные пузырьки, трубочки, плоские мешочки, образованные инвагинациями цитоплазматической мембраны. К таким структурам относят мезосому, точные функции которой до сих пор 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. После завершения синтеза клеточной стенки мезосомы оказываются на полюсах дочерних клеток, а затем исчезают, появляясь снова в месте контакта ДНК с цитоплазматической мембраной. Мезосомы могут также принимать участие в процессах секреции. Однако некоторые исследователи считают, что мезосома — это артефакт, возникающий при фиксации клеток для электронной микроскопии. Многие фототрофы, нитрифицирующие и метанооксиляющие микроорганизмы имеют развитую сеть внутритоплазматических мембран,

совершенно отличную от мезосом. Для прокариот характерно, что вся эта система представляет собой выросты ЦПМ и всегда с ней связана.

В некоторых клетках содержатся сигарообразные **газовые вакуоли (аэросомы)**, окруженные белковой оболочкой и выполняющие у водных организмов роль регуляторов плавучей плотности. У микроорганизмов, использующих углекислый газ как источник углерода, могут присутствовать **карбоксисомы**, являющиеся местами ключевого фермента цикла Кальвина. Карбоксисомы покрыты тонкой мембраной белковой природы. Некоторые спорообразующие бактерии (например, *Bacillus thuringiensis*) могут содержать **параспоральные тельца** белковой природы, токсичные для отдельных видов насекомых.

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 клеточного содержимого. Некоторые из включений свободно лежат в цитоплазме, другие окружены тонкой белковой оболочкой от 2 до 4 нм толщиной, иногда содержащей еще и липиды. Такими мембранами окружены гранулы поли- β -гидроксibuтирата, иногда гранулы гликогена и серы. Многие бактерии откладывают гранулы **волютина (полифосфатов)**, которые являются запасным резервуаром фосфата, важного предшественника в синтезе АТФ и ДНК. Гранулы волютина иногда называют также метахроматическими 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 **цианофитин**, расходуемый организмом в условиях голодания по азоту. Таким образом, основной функцией большинства запасных веществ можно считать обеспечение клеток энергией и необходимыми элементами в неблагоприятных условиях.

3.2.5. Цитоплазматическая мембрана

Любая живая клетка отделена от окружающей среды тонкой оболочкой особого строения — **цитоплазматической мембраной (ЦПМ)**. Эукариоты имеют многочисленные внутриклеточные мембраны, отделяющие пространство органелл от цитоплазмы, тогда как для большинства прокариот ЦПМ — это единственная мембрана клетки. У некоторых бактерий и архей она может внедряться внутрь цитоплазмы, образуя выросты и складки различной формы.

ЦПМ любых клеток построены по единому плану и состоят из **фосфолипидов** (рис. 3.5, а). У бактерий в их состав входят две жирные кислоты обычно с 16—18 атомами углерода в цепочке и с насыщенными или одной ненасыщенной связями, соединенные сложноэфирной связью с двумя гидроксильными группами глицерола. Состав жирных кислот бактерий может варьировать в ответ на изменения окружающей среды, в особенности, температуры. При понижении температуры в составе фосфолипидов

увеличивается количество ненасыщенных жирных кислот, что в значительной степени отражается на текучести мембраны. Некоторые жирные кислоты могут быть разветвленными или содержать циклопропановое кольцо. Третья ОН-группа глицерола связана с остатком фосфорной кислоты и через него — с головной группой. Головные группы фосфолипидов могут у разных прокариот иметь разную химическую природу (фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерол, кардиолипин, фосфатидилсерин, лецитин и др.), но они устроены проще, чем у эукариот. Например, у *E. coli*, они представлены на 75% фосфатидилэтаноламином, на 20% — фосфатидилглицеролом, остальные состоят из кардиолипина (дифосфатидилглицерола), фосфатидилсерина и следовых количеств других соединений. Прочие бактерии имеют более сложные типы мембранных липидов. Некоторые клетки образуют гликолипиды, такие как моногалактозилдиглицерид. Мембранные липиды архей отличаются от эукариотических и бактериальных. Вместо жирных кислот у них присутствуют высшие изопреноидные спирты, прикрепленные к глицеролу простой, а не сложной эфирной связью.

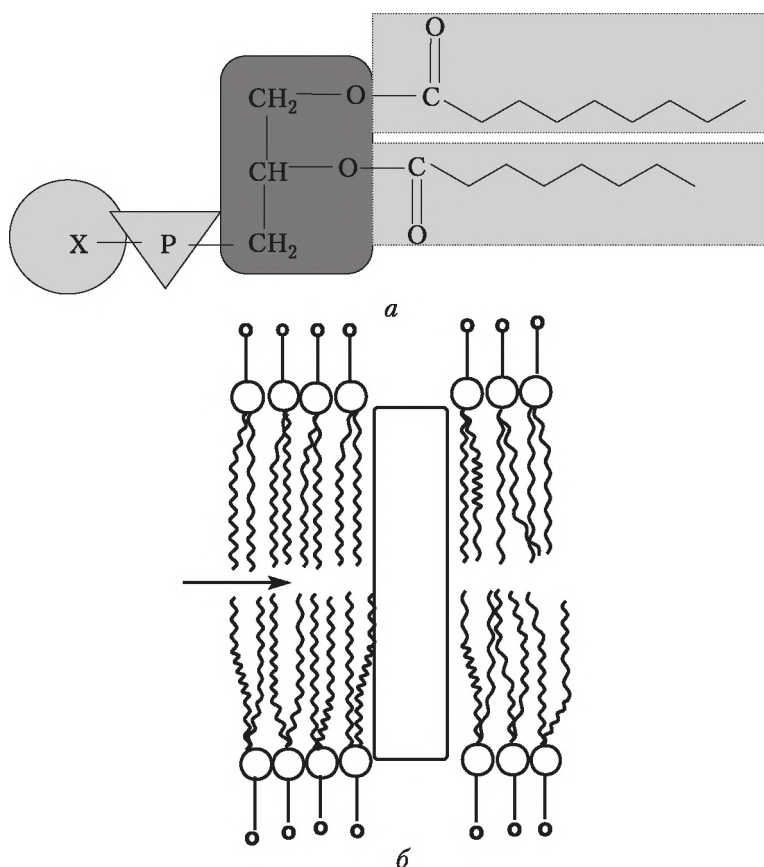


Рис. 3.5. Структура:

a — фосфолипида; *б* — бислойной мембраны

Такие молекулы составляют **мембранный бислой**, где гидрофобные части обращены вовнутрь, а гидрофильные — наружу, в окружающую среду и в цитоплазму (рис. 3.5, б). В бислой погружены или пересекают его многочисленные белки, которые могут диффундировать внутри мембраны, иногда образуя сложные комплексы. Мембранные белки имеют ряд важных функций, включая преобразование и запасание метаболической энергии, регуляцию поглощения и выброса всех питательных веществ и продуктов метаболизма. Кроме того, они узнают и передают многие сигналы, отражающие изменения в окружающей среде, и запускают соответствующий каскад реакций, приводящий к клеточному ответу. Такая организация мембран хорошо объясняется жидкокristаллической моделью с мозаичным вкраплением мембранных белков (рис. 3.6).

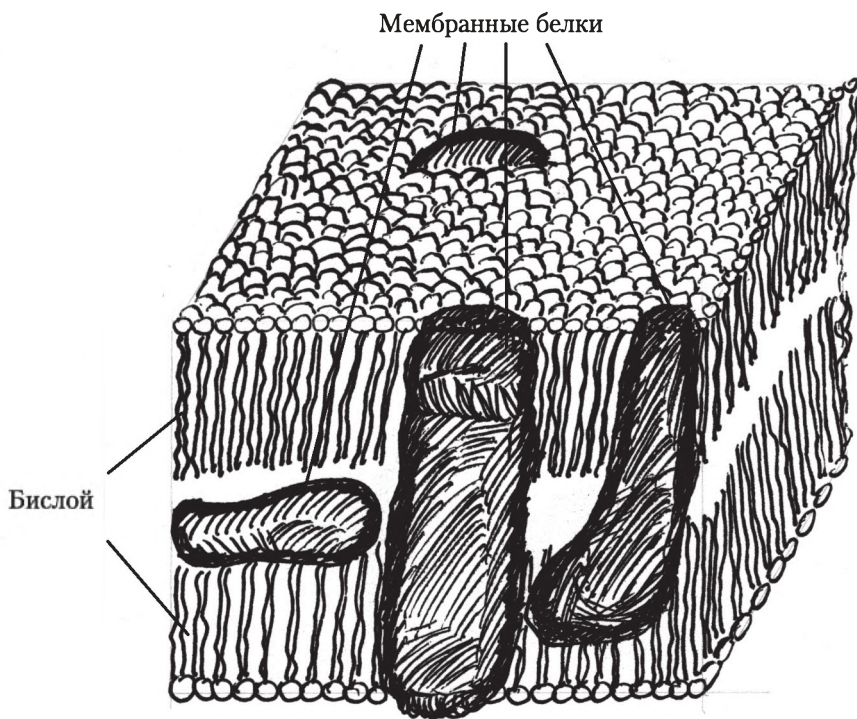


Рис. 3.6. Организация ЦПМ

Большинство биологических мембран имеют толщину от 4 до 7 нм. Клеточные мембраны хорошо различимы в просвечивающем электронном микроскопе при контрастировании тяжелыми металлами. На электронных микрофотографиях они имеют вид трехслойных образований: два внешних темных слоя показывают положение полярных групп липидов, а светлый средний слой — гидрофобное внутреннее пространство (рис. 3.7).

Другая техника 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, которые не простираются сквозь мембрану, а связаны специальными гидрофобными якорными областями с гидрофобной областью бислоя.

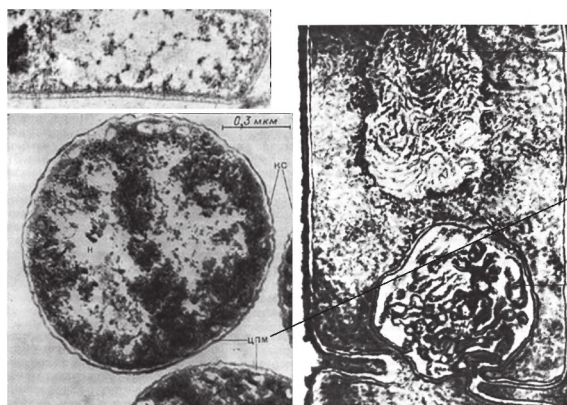


Рис. 3.7. ЦПМ на электронных микрофотографиях

ЦПМ обладает свойством избирательной проницаемости, препятствуя свободному продвижению большинства веществ внутрь и из клетки, а также играет значительную роль в росте и делении клеток, движении, экспорте поверхностных и внеклеточных белков и углеводов (экзополисахаридов). 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. Это 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 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. Обычно прокариоты имеют большое количество очень 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. ЦПМ играет значительную роль в движении, росте и делении клеток. В мембране прокариот сосредоточены многие метаболитические процессы. Мембранные белки выполняют важные функции: участвуют в преобразовании и запасании энергии, регулируют поглощение и выброс всех питательных веществ и продуктов метаболизма, узнают и передают сигналы об изменениях в окружающей среде.

3.2.6. Клеточная стенка

У большинства прокариот над ЦПМ располагается достаточно жесткая **клеточная стенка** — сложная многослойная структура, противостоящая высокому осмотическому давлению и определяющая форму клетки. У бактерий, которые подразделяются по строению этой структуры на грамположительные, грамотрицательные и не имеющие клеточной стенки, основным опорным элементом клеточной стенки является **пептидогликан (муреин)**, полностью покрывающий клетку снаружи. Муреин представляет собой сетчатый полимер, в котором полисахаридные цепи связаны поперечными пептидными мостиками. У архей клеточные стенки характеризуются своеобразным строением и химическим составом.

В основе химической структуры пептидогликана заложена периодическая последовательность двух аминосахаров — N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, сшитых между собой β -1,4-гликозидными связями. Поперечные связи представлены пептидными мостиками (рис. 3.8).

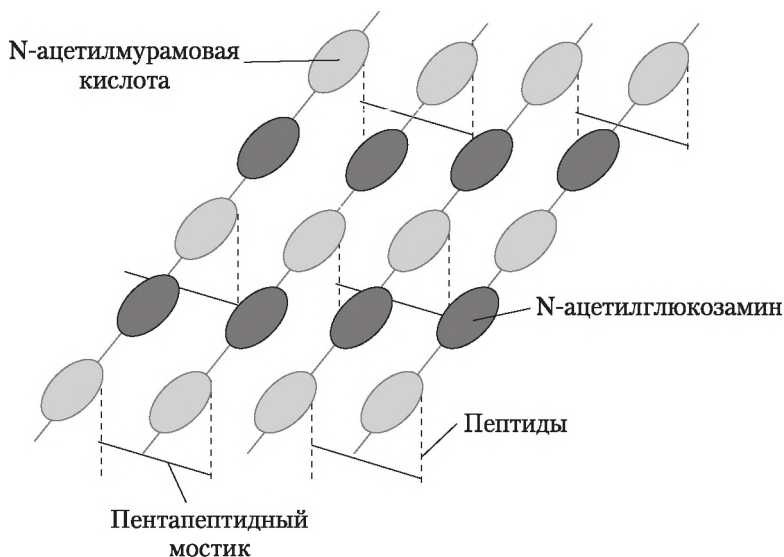


Рис. 3.8. Схема строения пептидогликана (муреина)

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 4 раз. Пептидогликановый 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 свободно проникать только молекулам

сравнительно невысокой молекулярной массы (50–60 кДа), причем размер проникающих молекул не зависит от толщины пептидогликанового слоя (разного у грамположительных и грамотрицательных бактерий). Макромолекулы с большими молекулярными массами не могут преодолеть барьер проницаемости муреина, поэтому для сборки внеклеточных структур (жгутики, пили) или для переноса ДНК при конъюгации необходимо действие специфических гидролаз муреина, которые локально расширяют отверстия для прохода больших молекул.

Пептидогликановый слой клетки прошит в поперечном направлении еще одним полимером — **тейхоевыми кислотами**, полиолфосфатами, образованными на основе глицерола или рибитола с большим количеством разнообразных заместителей (D-аланин, L-серин, глицин, глюкоза и N-ацетилглюкозамин). Через фосфорный диэфир тейхоевые кислоты связаны с C₆-атомом мурамовой кислоты в муреине. Тейхоевые кислоты придают муреиновому мешку определенную степень свободы при растяжении и сжатии и действуют наподобие пружин в матрасе. Тейхоевые кислоты благодаря своей анионной полиолфосфатной природе прочно связывают ионы Mg²⁺. Предполагают, 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, в особенности 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.

У грамположительных и грамотрицательных бактерий структура клеточных оболочек различается (рис. 3.9).

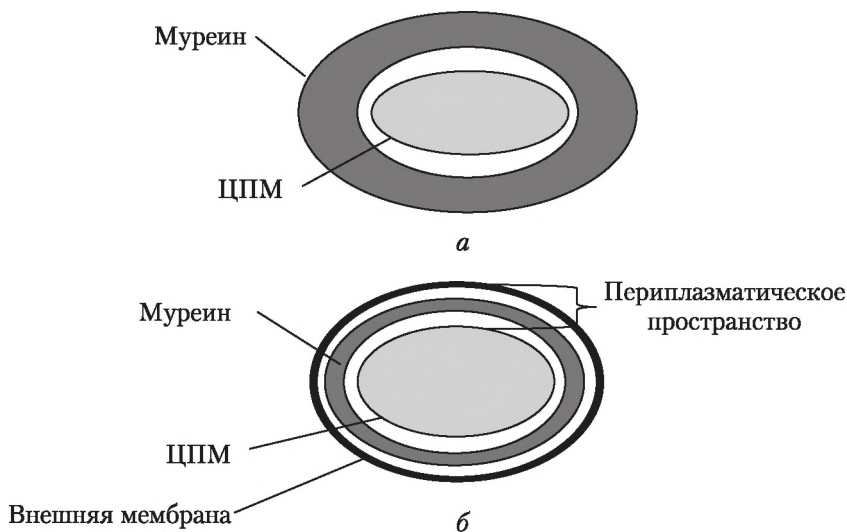


Рис. 3.9. Строение клеточных стенок:

а — грамположительных; *б* — грамотрицательных бактерий

Типичные **грамположительные микроорганизмы** имеют толстый, многослойный муреиновый мешок, содержащий до 40 слоев пептидогликана, прошитого поперек молекулами тейхоевых кислот (20–50 нм, рис. 3.10).

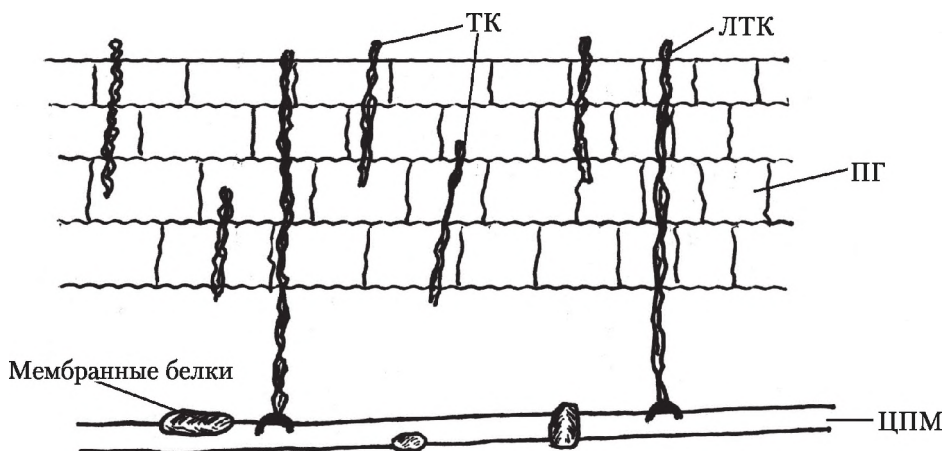


Рис. 3.10. Строение грамположительной клеточной стенки:

ТК — тейхоевые кислоты; ЛТК — липотейхоевые кислоты; ПГ — пептидогликан;
ЦПМ — цитоплазматическая мембрана

Грамотрицательные бактерии обладают более сложной клеточной оболочкой, имеющей **внешнюю (наружную) мембрану (ВМ, рис. 3.11)**. По сравнению с ЦПМ внешняя мембрана является сильно асимметричным липидным бислоем, в котором внутренний слой состоит из фосфолипидов, а внешний — из **липополисахаридов (ЛПС)**.

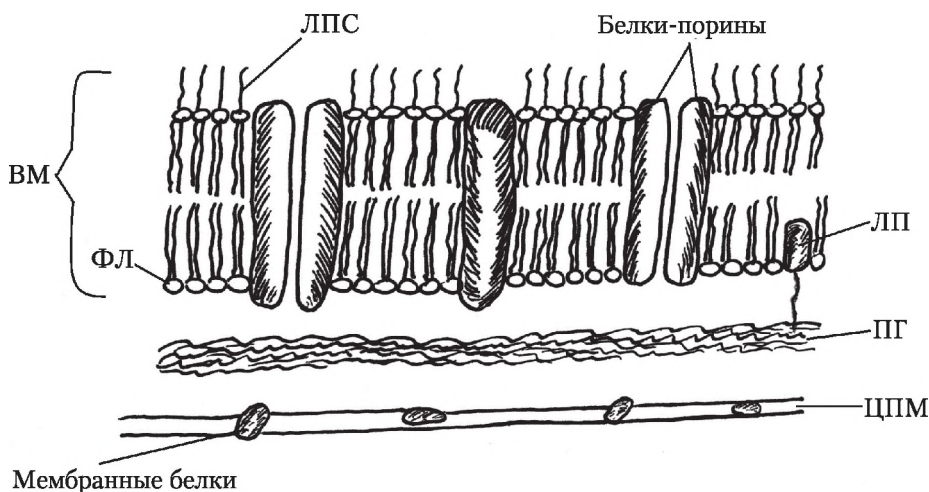


Рис. 3.11. Строение грамотрицательной клеточной стенки:

ЛП — липопротеид; ЛПС — липополисахарид; ПГ — пептидогликан;
ФЛ — фосфолипиды; ВМ — внешняя мембрана;
ЦПМ — цитоплазматическая мембрана

ЛПС имеют сложную химическую структуру, являются антигенами, обладают токсичностью и придают поверхности клетки отрицательный заряд. ЛПС внешней мембраны энтеробактерий, например, содержит три структурные части: 2-кето-3-дезоксигексозонат-липид А (Kdo-липид А) — уникальный гликолипид, закорячивающий молекулу ЛПС 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. 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 аминосахара. Состав, структура и иммуноспецифичность ЛПС широко варьирует внутри родов и между родами и составляет основу для серологического 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-ацетиламиноманнуроновой кислоты и N-ацетилфукозамина, 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 (ВМ) содержит обычные фосфолипиды, из которых почти 90% составляет фосфатидилэтаноламин.

Внешняя мембрана тоже обладает избирательной проницаемостью и участвует в контакте клеток между собой и с поверхностью неживых предметов, но по сравнению с ЦПМ она более инертна метаболически и содержит меньше белков, в том числе **белки-порины**, формирующие поры. Белки внешней мембраны обеспечивают поглощение и выброс различных веществ, участвуют в сборке поверхностных структур и конъюгации, способствуют выделению ферментов в окружающую среду. Внешняя мембрана осуществляет контакт клеток между собой, с поверхностью субстрата, а также с клетками организма-хозяина при патогенезе. Она удерживает ряд внешних структурных образований, например, пили.

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 (≈ 3 нм толщиной). Внешняя мембрана и муреиновый слой соединены **липопротеином (ЛП)**, который своим N-концом с замещенными жирными кислотами погружен во внешнюю мембрану, а его карбоксильный конец связан с муреином. Наличие допол-

нительного барьера проницаемости в виде внешней мембраны позволяет уменьшить толщину муреинового слоя и дает возможность эффективно использовать ценные продукты метаболизма муреина, которые накапливаются в периплазматическом пространстве клетки при ее росте. В то же время для достижения действующей внутриклеточной концентрации антибиотиков у грамотрицательных бактерий необходимо применять более высокие минимальные их дозы по сравнению с грамположительными бактериями. В периплазме также находятся **экзоферменты и связывающие белки**, переносящие вещества от внешней мембраны к цитоплазматической и обратно.

Из-за разницы в структуре клеточных стенок микроорганизмы по-разному выглядят на препаратах при способе окраски, предложенном датским микробиологом Хансом Грамом: грамположительные удерживают генцианвиолет при обработке спиртом, а грамотрицательные обесцвечиваются.

Под действием ряда агентов (антибиотиков, нарушающих синтез пептидогликана, автолизиннов, некоторых аминокислот, лизоцима, комплемента, иммуноглобулинов) может происходить **L-трансформация** бактериальных клеток (образование клеток без клеточной стенки) Грамположительные и грамотрицательные бактерии при этом формируют различные образования. Так, под действием пенициллина из грамположительных клеток образуется протопласт, не несущий клеточной стенки, а из грамотрицательных — сферопласт, имеющий остатки оболочки на поверхности клетки. Клетки, утратившие клеточную стенку в результате мутации или разрушающего ее воздействия, также называются **L-формами**. Они имеют округленную или филаментную форму с хорошо структурированной ЦПМ. L-формы очень требовательны к питательным средам и могут существовать только в изотонических растворах. Стабильные L-формы не способны к реверсии после удаления L-трансформирующего фактора, в то время как нестабильные L-формы могут после этого достраивать клеточную стенку. L-формы способны длительно персистировать в макроорганизмах в фазе хронического заболевания, так как в значительной степени лишены антигенных детерминант.

3.2.7. Пили

На поверхности прокариотической клетки часто присутствуют нитевидные образования белковой природы, которые называют **пилями** или **фимбриями** (от латинских слов «волосы», «нити»). Пили грамотрицательных бактерий изучены достаточно подробно, известно также о существовании пилей у грамположительных организмов.

Они отвечают за прикрепление клетки к неживому объекту и к другой клетке, помогают принимать и передавать ДНК при конъюгации, служат акцепторами бактериофагов. Основное же предназначение пилей — поддерживать специфические прикрепительные структуры клетки. Прикрепительные субъединицы (**адгезины**) часто в качестве минорных компонентов присутствуют на концах пилей, однако основная структура пилей также может выступать в роли адгезина. Адгезины выступают посредни-

ками при бактериальных контактах, при контактах с неживыми объектами, тканями и клетками в восприимчивых организмах. Колонизация тканей хозяина патогенными бактериями обычно зависит от стереохимического подобия между архитектурой адгезина и соответствующего рецептора клетки хозяина. Взаимоотношения, медируемые адгезивными пилиями, могут помогать формированию микробных биопленок и часто являются основным фактором успешной колонизации организма-хозяина патогенными и сапротрофными микроорганизмами. Так, уропатогенные *E. coli* для эффективного заселения эпителия мочевого пузыря должны иметь пили типа 1. 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 вызывающих пиелонефрит клеток *E. coli* из почек и мочевыводящих каналов. Кишечные патогенные микроорганизмы образуют многочисленные и разнообразные адгезивные пили, которые помогают бактериям колонизировать кишечник. К этой группе принадлежат пили K88, K99, 987P, длинные полярные фимбрии, плазмидные пили *Salmonella enterica* и агрегирующие фимбрии энтеропатогенных *E. coli*. ТСП-пили ответственны за прикрепление *V. cholerae* к эпителию тонкого кишечника. Эти же пили действуют как рецепторы для лизогенного фага, кодирующего две субъединицы холерного токсина. Этот фаг переносится в тонком кишечнике между клетками холерного вибриона с помощью ТСП-пилей. Другие пили также помогают в приобретении факторов вирулентности. Поглощение ДНК происходит при помощи пилей типа 4, а перенос ДНК — при посредстве конъюгативных пилей, которые помогают патогенным микроорганизмам приобретать гены, позволяющие синтезировать широкий спектр факторов вирулентности и придающие им устойчивость ко многим антибиотикам. Образование **биопленок**, требующее во многих случаях участия пилей типа 1, 4 или «кудряшек», также предохраняет патогенные бактерии от действия лекарственных препаратов и может способствовать колонизации тканей и медицинских имплантантов. Имеется ряд примеров, когда прикрепление пилей вызывало появление сигналов в клетках хозяина. Прикрепление клеток рода *Neisseria* с помощью пилей типа 4А к рецепторам эпителиальных клеток хозяина вызывает высвобождение запасенного внутриклеточного Ca^{2+} , известного как сигнал, регулирующий ответы эукариотических клеток. Присоединение Р-пилей 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. Было показано, что прикрепление Р-пилей к рецепторам клеток хозяина стимулирует активацию железо-мобилизирующих механизмов у уропатогенных *E. coli*. Это, вероятно, увеличивает возможности получения железа и выживания клеток возбудителя 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.

Архитектура пилей варьирует от тонких нитевидных до толстых прочных палочкообразных образований с осевыми отверстиями. Тонкие пили, диаметром не превышающие 2–3 нм, такие как K88 и K99, часто относят к фибриллам. Еще более тонкие пили (< 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 1, P и S у *E. coli* и *Haemophilus influenzae* представляют собой сложные структуры, состоящие из толстой палочки с прикрепленной к ней тонкой фибриллой. Расположение пилей может быть разным (по всей поверхности клетки или только на конце). Пили часто расположены перитрихально по поверхности клеток, однако пили типа 4 могут быть локализованы только на одном конце клетки. Одна клетка может иметь фимбрии разных типов. Длина пилей колеблется от 0,1 до 20 мкм, а диаметр — от 2 до 11 нм.

Пили состоят из одного или нескольких типов белковых субъединиц, называемых пилины (фимбрины), которые обычно располагаются по спирали. Для сборки пилей на поверхности клетки все пилины должны быть перенесены через внутреннюю мембрану, периплазму и внешнюю мембрану. 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 нефибрильные адгезины.

3.2.8. Капсулы

Поверх клеточных стенок многих прокариот можно обнаружить слизистые капсулы и чехлы разной толщины. Чаще всего их основой являются полисахариды, реже — гликопротеиды и полипептиды. Капсулы в отличие от чехлов имеют значительную толщину и состоят из более диффузного материала. Поверхность колоний клеток с капсулами выглядит гладкой, влажной и блестящей. Основная роль **капсул** для патогенных видов — предохранение клетки от узнавания и поглощения фагоцитами. Считается также, что капсулы играют защитную роль, затрудняя диффузию вредных веществ из окружающей среды и способствуя сохранению влаги при высушивании. Материал капсулы может быть долговременным запасом питательных веществ в условиях голодания.

Термины «капсула» и «чехол» часто применяют как синонимы, поскольку принципиальной разницы в их функциях нет. Обычно **чехлы** имеют четкие границы, могут состоять из отдельных, хорошо выраженных слоев и содержать в себе отложения нерастворимых соединений. Поверхности чехлов в ряде случаев обладают собственной архитектурой в виде чешуек, шипов и других образований.

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

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

3.2.9. S-слои

Некоторые прокариоты образуют на поверхности **S-слои** (от англ. *surface* — поверхность), т.е. кристаллические белковые образования правильной формы, плотно прилегающие друг к другу. У некоторых архей S-слой может быть единственным слоем поверх ЦПМ. S-слои имеют упаковку и расположение, подобные паркетным дощечкам, плотно покрывающим клетку и состоящим из белков или гликопротеинов. У грамотрицательных бактерий S-слои прилегают непосредственно к внешней мембране, у грамположительных — к муреиновому мешку. Капсулы и S-слои защищают клетку от резких изменений концентраций различных ионов, действия ферментов, фагоцитов или бактерий-хищников (например, из рода *Bdellovibrio*) и способствуют клеточной адгезии. S-слои помогают удерживать форму клетки, а капсулы препятствуют проникновению вредных соединений, удерживают влагу и сами являются долговременным запасом питательных веществ. Наличие S-слоя у патогенного микроорганизма повышает его вирулентность, так как помогает ему справиться с атакой комплемента и избежать фагоцитоза.

3.3. Морфология клеток микроорганизмов

3.3.1. Размеры микробных клеток

Размеры клеток большинства прокариот лежат в пределах 0,2—10,0 мкм. Однако среди них есть «гигантские» представители, сравнимые с некоторыми эукариотическими клетками. Например, длина ряда крупных спирохет и бесцветных серобактерий достигает 50—100 мкм, а диаметр клетки некоторых нитчатых цианобактерий сравним с диаметром эритроцитов крови человека (7 мкм). Среди мельчайших прокариот следует назвать нанобактерии и наноархеи, микоплазмы и трепонемы (0,05—0,1 мкм), размеры которых сравнимы с крупными вирусами. Самые большие на сегодняшний день прокариотические микроорганизмы — это *Epulopiscium fishelsoni* и *Thiomargarita namibiensis*. Первый организм имеет форму толстой палочки с заостренными концами и обитает в кишечнике глубоководной рыбы-хирурга. Его размеры достигают 600 мкм в длину и 100 мкм в диаметре. Клетки второго организма, обнаруженного в прибрежных водах Намибии и Чили, кокковидные, до 750 мкм в диаметре. В то же время одноклеточная морская водоросль *Nanochlorum eukaryotum*, обладающая настоящим ядром, хлоропластами и митохондриями, имеет диаметр клетки всего 1—2 мкм. Таким образом, размеры известных в настоящее время прокариотических микроорганизмов колеблются от 0,05 до 750 мкм (табл. 3.2).

Размеры отдельных представителей живого мира

Организм	Размеры, мкм
<i>Epulopiscium fishelsoni</i>	100,0 × 600,0
<i>Thiomargarita namibiensis</i>	$d \approx 750,0$
<i>Chlorella</i> sp.	$d \approx 2,0-10,0$
<i>Nanochlorum eukaryotum</i>	$d \approx 1,0-2,0$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$d \approx 6,0-10,0$
<i>Beggiatoa</i> sp.	2,0–10,0 × 10,0–50,0
<i>Oscillatoria</i> sp.	$d \approx 7,0$
Эритроцит человека	$d \approx 7,0$
<i>Spirochaeta</i> sp.	1,5 × 50,0
<i>Escherichia coli</i>	1,1–1,5 × 2,0–6,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	$d \approx 0,5-1,0$
<i>Rickettsia</i> sp.	0,3–0,6 × 0,8–2,0
Микоплазмы	0,1 × 0,3
Поксвирусы	$d \approx 0,3$
Нанобактерии	$d < 0,05$
Наноархеи	$d < 0,05$

3.3.2. Формы и устойчивые сочетания микробных клеток

подавляющее большинство микроорганизмов-прокариот — это маленькие, просто устроенные организмы, имеющие схожее строение. Форму клеток большинства прокариот можно отнести к одному из четырех типов: цилиндрические (**палочки**), сферические (**кокки**), изогнутые в виде запятой (**вибрионы**) и извитые в виде спирали (**спириллы**) (рис. 3.12). Клетки прокариот могут группироваться в устойчивые сочетания (пары, цепочки, гроздья, тетрады, пакеты, розетки, сети), некоторые из которых даже получили свои названия (пару кокков называют диплококками, цепочку кокков — стрептококками, пакеты из 8 и более кокковидных клеток — сарцинами, гроздья кокков — стафилококками, нити из клеток, тесно примыкающие и пересекающиеся друг с другом, прямые и ветвящиеся, — трихомами, розетками, плоскими табличками и сетями). В то же время некоторые микроорганизмы имеют своеобразный внешний вид и необычную форму (квадратные, прямоугольные, бобовидные, звездчатые, тарелкообразные), образуют различные выросты (бактерии родов *Hyphomicrobium*, *Caulobacter*, *Galionella*), гифы (актинобактерии) и даже развитый мицелий.

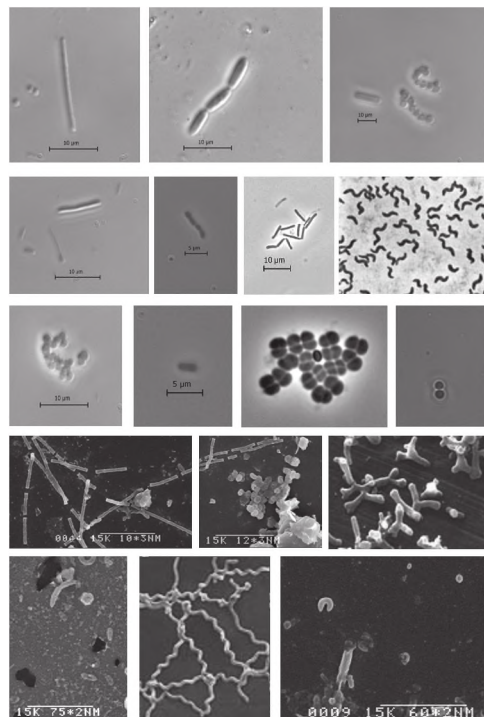
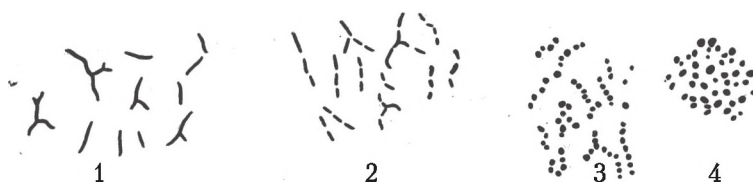
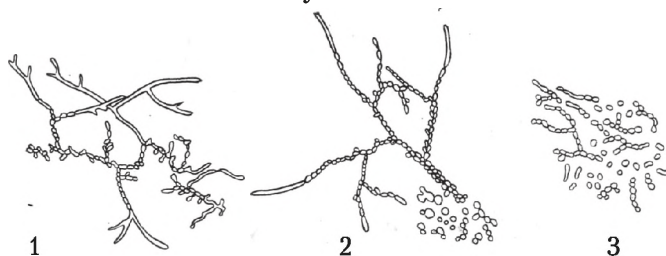


Рис. 3.12. Формы и сочетания клеток прокариот

Существуют бактерии, меняющие свою морфологию в зависимости от возраста (из родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*) (рис. 3.13). Такое явление носит название **плейоморфизм**.



Микобактерии: 1 — суточная культура; 2 — 2-суточная; 3 — 3–4-суточная; 4 — 10-суточная



Нокардии: 1 — 2-суточная культура; 2 — 4–5-суточная; 3 — 1–8-суточная

Рис. 3.13. Плейоморфные микроорганизмы

3.3.3. Дифференциация у микроорганизмов

Дифференциацией называется образование клеток (или их структур), осуществляющих специализированные функции и часто отличающихся строением от обычных вегетативных клеток (рис. 3.14). Среди прокариотических микроорганизмов она выражена у некоторых почкующихся форм (например, бактерии рода *Nyphomicrobium* образуют почку на специальном выросте клетки). У цианобактерий в составе нитей есть специализированные клетки. Это **гетероцисты** — имеющие толстую оболочку, не делящиеся клетки, осуществляющие азотфиксацию, и **акинеты** — покоящиеся клетки с плотной оболочкой. Актинобактерии образуют два вида мицелия: погруженный в среду субстратный и находящийся на поверхности воздушный мицелий. Субстратный мицелий отвечает за питание и прикрепление, а воздушный формирует сложные органы спороношения (конидии и спорангии).

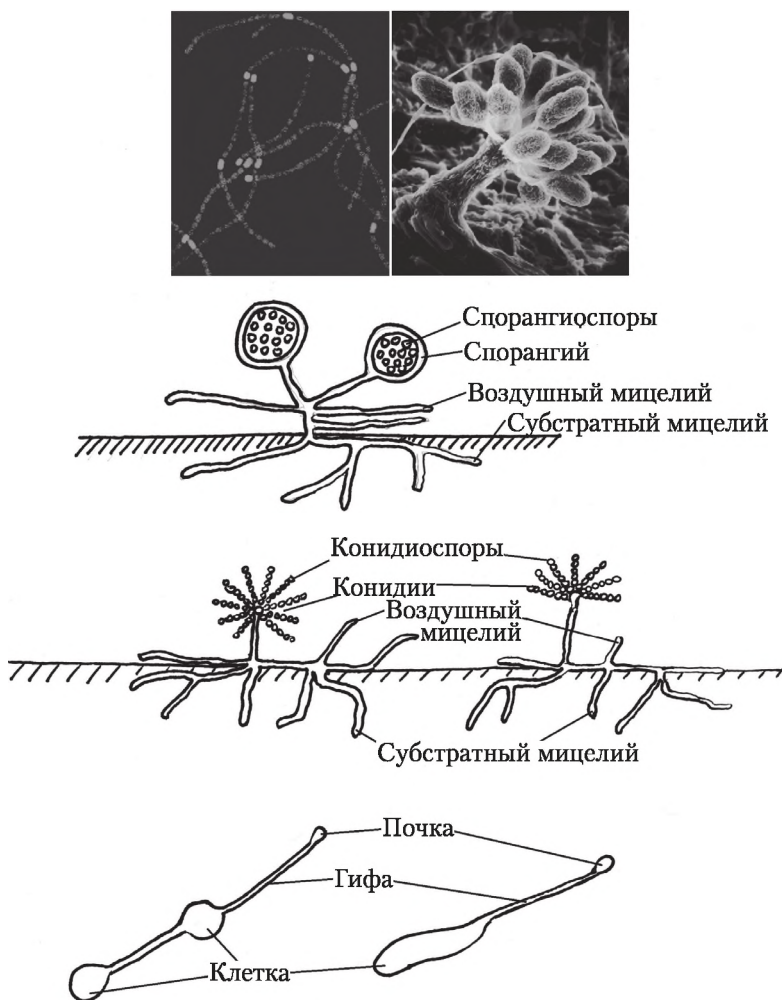


Рис. 3.14. Дифференциация у микроорганизмов

Дифференциация может заключаться в образовании из клеток подвижных или покоящихся стадий (цист, эндоспор), а также в формировании плодовых тел.

3.4. Способы движения микроорганизмов

3.4.1. Жгутиковое движение

Среди прокариот есть подвижные и неподвижные виды. У микроорганизмов, не обладающих способностью активно двигаться во взрослом состоянии, подвижная стадия может наблюдаться в молодом возрасте. Наличие такой подвижности у вновь образовавшихся клеток способствует распределению их в пространстве, что приводит к уменьшению конкуренции за питание, снижению плотности популяции и освоению новых мест обитания или поиску потенциальных жертв (рис. 3.15).

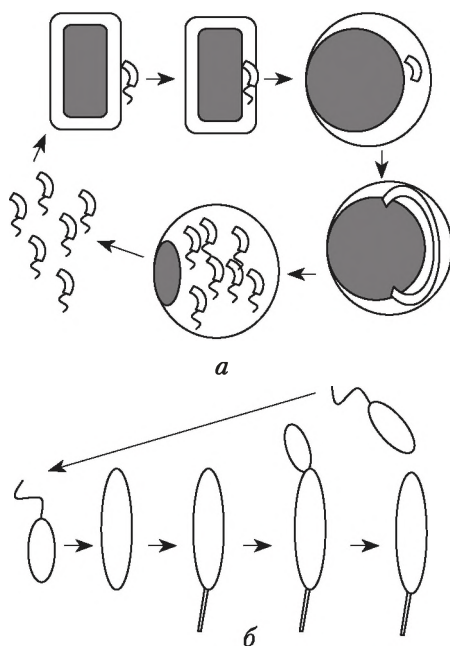


Рис. 3.15. Упрощенные схемы жизненных циклов бактерий:

а — рода *Bdellovibrio*; б — рода *Caulobacter*

Движение клеток может осуществляться разными способами, но чаще всего происходит за счет вращения **жгутиков**. Жгутики прокариот устроены иначе, чем типичные жгутики эукариот, имеющие формулу $9 + 2$.

У бактерий жгутики с формулой $8 + 1$ — правовращающие, у архей — левовращающие.

Прокариотические жгутики устроены значительно проще, чем эукариотические. Диаметр жгутика прокариот составляет $0,01\text{--}0,02\text{ мкм}$, что в 10 раз меньше диаметра жгутика эукариот. Прокариотический жгутик состоит из базального тела, крючка и филамента (рис. 3.16).

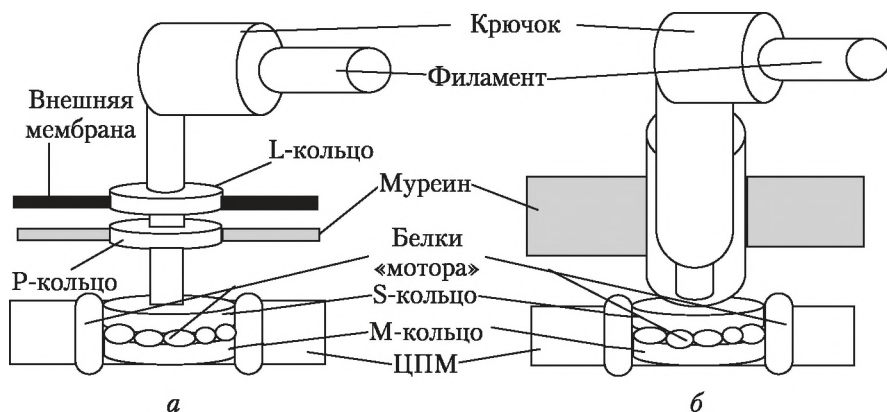


Рис. 3.16. Схематическое изображение жгутика:

а — грамотрицательной бактерии; *б* — грамположительной бактерии

Базальное тело включает четыре (у грамотрицательных) или два (у грамположительных бактерий) кольца, стержень и белки мотора. Два кольца М и S закреплены в ЦПМ и окружены моторными белками, «включающими и выключающими» вращение. У грамотрицательных бактерий в пептидогликановом слое находится также кольцо Р, а во внешней мембране — кольцо L. Оба эти кольца дополнительно удерживают механизм жгутика. Все кольца соединены жестким стержнем, переходящим на наружной стороне внешней мембраны в крючок и затем в филамент. Филамент представляет собой цилиндр, состоящий из простого белка флагеллина, уложенного по спирали. На конце филамента находится специальная структура в виде «шапочки». К вращению жгутика приводит поток протонов через оба кольца или между базальным телом и близлежащим участком цитоплазматической мембраны.

Жгутики различным образом располагаются на поверхности клетки (рис. 3.17).



Рис. 3.17. Варианты расположения жгутиков на микробных клетках

У прокариот характер жгутикования является диагностическим признаком.

Синтез жгутика начинается с появления MS-кольца в ЦПМ, затем синтезируются белки мотора, появляются Р- и L-кольца (у грамотрицательных бактерий), связующий стержень между ними, затем нарастает крю-

чок и на ранней стадии его образования на крючке появляется «шапочка», которая прикрывает полый цилиндр начавшего строиться филамента с верхнего конца. Эта структура не дает «теряться» в окружающей среде синтезируемым на рибосоме субъединицам белка-флагеллина, которые подаются к вершине филамента через полое внутреннее пространство базального тела. Они самопроизвольно укладываются по спирали, наращивая филамент. Таким образом, при синтезе и удлинении филамента белки «шапочки», действуя наподобие своеобразных шаперонов, помогают собираться флагеллину в равномерно растущую структуру. Для сборки одного филамента необходимо около 20 000 молекул флагеллина. Синтез жгутика кодируется более чем 30 генами, при этом неизвестно, каким образом определяется точное местоположение закладки жгутика.

Движение у монотрихов осуществляется путем вращения жгутика по или против часовой стрелки. При этом сама клетка медленно вращается в обратную сторону. При вращении жгутика по часовой стрелке клетка тянется за жгутиком (жгутик — впереди). При вращении жгутика против часовой стрелки клетка выталкивается жгутиком вперед (жгутик — сзади). 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.

Способ движения спирохет с помощью **аксиальной нити** (рис. 3.18) является модификацией жгутикового движения.

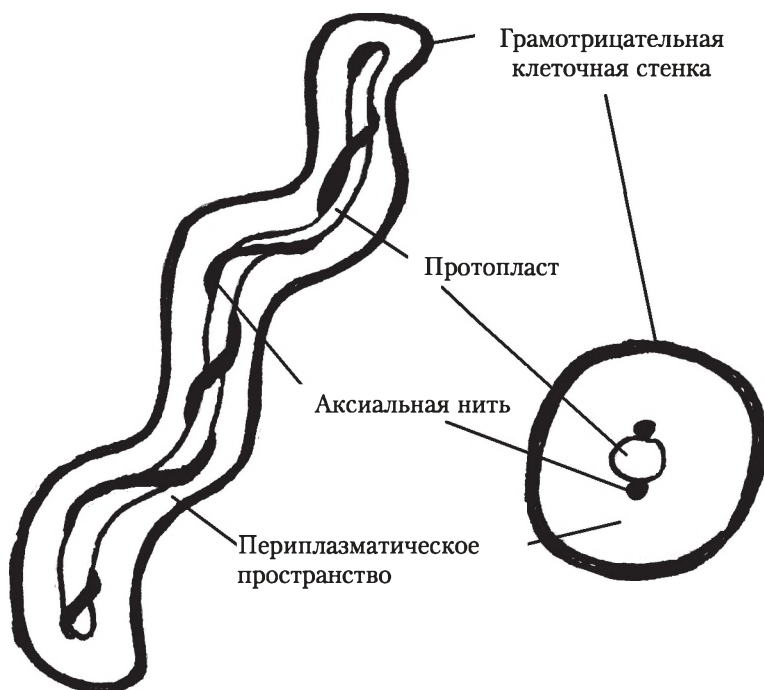


Рис. 3.18. Аксиальная нить спирохет

Аксиальная нить — это пучок жгутиков, лежащих в периплазме. Они тянутся от одного конца клетки до другого, по спирали, оборачиваясь вокруг нее. Вращение этих жгутиков заставляет клетку извиваться и за счет этого менять свое положение в пространстве.

3.4.2. Скольжение

Еще одним способом движения является **скольжение** клеток по поверхности твердой среды. Скользящие бактерии лишены жгутиков и оставляют при передвижении слизистый след. В молодом возрасте клетки более подвижны, их скорость может составлять от 2 до 60 мкм/мин. Механизм скольжения может быть разный. Бактерии, относящиеся к родам *Myxococcus* 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. Так, клетки *Flavobacterium johnsoniae* скользят при помощи белков внешней мембраны, на которые передается усилие с белков ЦПМ (рис. 3.19, а). Движение вперед по поверхности происходит за счет отталкивания. При скольжении клетки выделяется слизь, которая нужна для смачивания поверхности.

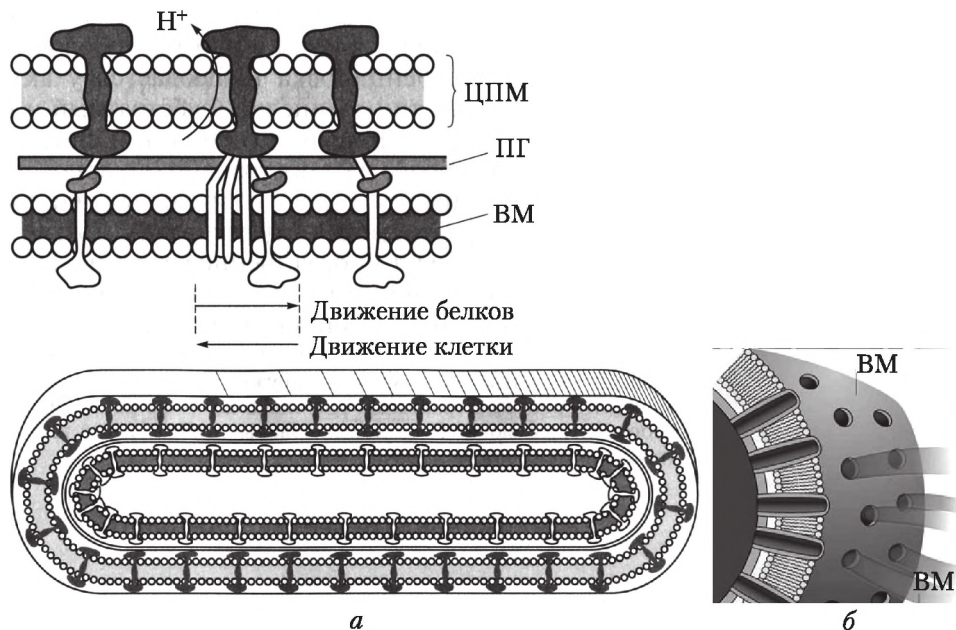


Рис. 3.19. Механизм скольжения:

а — у флавобактерий; б — миксобактерий

Многие миксобактерии (например, *Мухосoccus xanthus*) выделяют поверхностно-активные вещества с одного конца клетки (рис. 3.19, б). На разных концах клетки возникают различия в величине поверхностного натяжения, которые и толкают ее вперед. У клеток некоторых цианобактерий во внешней мембране расположены фибриллы или филаменты, при сокращении которых во внешней мембране возникают волны. За счет этих волн клетка движется. У некоторых клеток в оболочке присутствуют кольцеобразные белковые комплексы, которые могут вращаться и двигать клетку.

К скольжению способны представители различных групп микроорганизмов. Активнодвигающиеся клетки имеют преимущества перед неподвижными: они могут передвигаться по поверхности твердого субстрата, поэтому способны использовать такие сложные нерастворимые соединения, как хитин и целлюлоза; их способность к скользящему движению помогает двигаться в толще гетерогенных субстратов, таких как почва, донные осадки и небольшие каналы в гниющей древесине, помогает выбирать оптимальную позицию в отношении градиентов кислорода, света, сероводорода, температуры и других факторов.

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

3.4.3. Таксисы

Подвижные бактерии способны осуществлять реакции **таксиса** (направленного движения), которые помогают им ориентироваться в пространстве, узнавать друг друга при конъюгации или при поиске симбионта. **Фототаксис** (двигательные реакции на свет) особенно важен для фототрофных микроорганизмов, **аэротаксис** (движение по градиенту кислорода) — для микроаэрофильных и анаэробных бактерий. **Хемотаксисом** называют движение относительно разных химических соединений (движение к аттрактантам и от репеллентов). Бактерии могут «узнавать» эти вещества до концентраций 10^{-8} М с помощью хеморецепторов, локализованных в периплазме или в ЦПМ. Ранее движение бактерий, имеющих внутриклеточные цепочки магнетитовых частиц (**магнетосомы**), относительно линий магнитного поля Земли обозначали как **магнитотаксис**. В настоящее время это явление называют **магнитной ориентацией**, поскольку движение магнитобактерий (например, *Aquaspirillum magnetotacticum*) происходит пассивно, принудительно для клетки, только за счет магнитных свойств включений железа.

Резюме

Все живые клетки имеют цитоплазму, цитоплазматическую мембрану (ЦПМ) и наследственный материал. По принципу клеточной организации микроорганизмы бывают прокариотические и эукариотические. Для прокариот характерно более простое устройство клетки, однако они обладают значительно более широкими возможностями обмена веществ.

Вирусы состоят из белков, одного типа нуклеиновых кислот и не имеют клеточного строения. Они способны развиваться только внутри кле-

ток хозяина, осуществляя литический цикл и переключая их активность на синтез новых вирусных частиц или оставаясь в латентном состоянии.

Внутри клетки прокариот различают две области — цитоплазму и ядерную зону. В цитоплазме прокариот располагаются рибосомы. Многие прокариотические клетки содержат в цитоплазме включения и запасные вещества. Нуклеоид — это область внутри клетки, где лежит прокариотическая хромосома. У большинства прокариот ДНК обнаружена в форме кольца. Значительное количество микроорганизмов вдобавок к основной хромосоме содержат плазмиды. ЦПМ любых клеток построены по единому плану и состоят из фосфолипидов. Такие молекулы составляют мембранный бислой, где их гидрофобные части обращены вовнутрь, а гидрофильные — наружу. Большинство биологических мембран имеют толщину от 4 до 7 нм. ЦПМ обладает избирательной проницаемостью. У многих прокариот над ЦПМ располагается клеточная стенка. У бактерий основным опорным элементом клеточной стенки является пептидогликан (муреин). У архей клеточные стенки характеризуются своеобразным строением и химическим составом. На поверхности прокариотической клетки часто присутствуют пили, капсулы, S-слой.

Большинство прокариот имеют клетки одной из четырех форм: палочки, кокки, вибрионы или спириллы, которые могут группироваться в устойчивые сочетания. Для ряда микроорганизмов характерен плеоморфизм. Размеры клеток большинства прокариот лежат в пределах 0,2—10,0 мкм. Дифференциация прокариот может заключаться в образовании почек, специализированных клеток, сложных органов спороношения, подвижных или покоящихся стадий, а также в формировании плодовых тел. Движение чаще всего происходит за счет вращения жгутиков, а также путем скольжения. Прокариотические жгутики устроены значительно проще, чем эукариотические. Подвижные микробы способны осуществлять реакции таксиса.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. В чем единство организации клеточных систем на Земле?
2. Сравните организацию клеток прокариот и эукариот.
3. Сравните метаболические возможности прокариот и эукариот.
4. В чем особенность вирусов как биологических объектов?
5. Какие микроорганизмы можно рассмотреть невооруженным глазом?
6. Перечислите поверхностные структуры прокариотической клетки и назовите их функции.
7. Почему большинство прокариот нельзя различить по их «внешнему виду»?
8. Назовите «карликовых» и «гигантских» представителей мира микробов.
9. Перечислите способы дифференциации прокариот.
10. Сравните механизмы жгутикового и скользящего движения.

Глава 4

РАЗМНОЖЕНИЕ И РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ. ИХ НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности размножения различных микроорганизмов;

уметь

- различать особенности наследственной и ненаследственной изменчивости в микробных культурах;

владеть

- навыками изучения диссоциации микроорганизмов.

4.1. Способы размножения микроорганизмов

Среди прокариот наиболее распространено **бинарное деление** (на две равные части). При этом мембрана родительской клетки впячивается с двух сторон, обычно посередине клетки, сливается и разделяется, образуя две дочерние клетки без потери внутреннего содержимого. Различные мембранные белковые комплексы отвечают за процессы инициации репликации ДНК, разделения хромосом в делящихся клетках и нарастания клеточной поверхности при росте и делении. Реже встречаются другие способы размножения. Например, у некоторых цианобактерий (например, рода *Dermocarpa*) или клеток *Epulopiscium fishelsoni* отмечено **множественное деление**, когда из одной клетки образуется множество мелких подвижных клеточек (**байоцитов**), которые иногда обладают подвижностью и могут служить для расселения неподвижных взрослых форм (рис. 4.1, а).

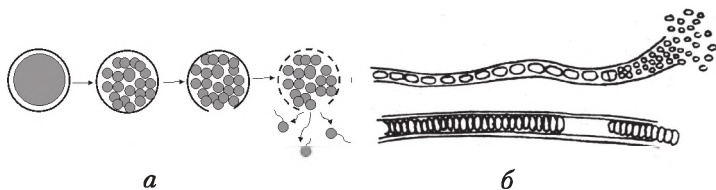


Рис. 4.1. Размножение цианобактерий:

а — байоцитами; б — гонидиями и гормогониями

Нитчатые цианобактерии способны размножаться также с помощью **гонидий**, аналогичных байоцитам, и **гормогоний**, коротких фрагментов нити, приобретающих скользящую подвижность (рис. 4.1, б).

При почковании происходит неравное деление на материнскую и дочернюю клетки, иногда для этого формируются дополнительные выросты (гифы). Некоторые метанотрофы способны к образованию экзоспор. Для мицелиальных актинобактерий отмечено несколько способов размножения (рис. 4.2): простая фрагментация мицелия, образование экзоспор на поверхности субстратного мицелия или конидио- и спорангиоспор на специальных гифах.

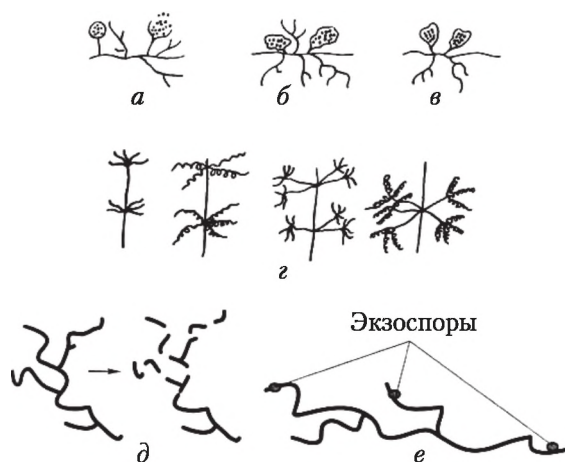


Рис. 4.2. Размножение мицелиальных актинобактерий:

a, б, в — спорангиоспорами; *г* — конидиоспорами; *д* — фрагментацией мицелия; *е* — экзоспорами

Для бактерий размножение, как правило, не связано с половым процессом. Однако у некоторых микроорганизмов наблюдается особый процесс передачи генетической информации от клетки к клетке с образованием мерозиготы — **конъюгация**. Рекомбинация генетического материала прокариот происходит также путем **трансформации** при поглощении растворенной ДНК из окружающей среды. При **трансдукции** функцию переносчиков генетического материала выполняют фаги, случайно захватывающие фрагмент хромосомы хозяина при образовании зрелых вирусных частиц.

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

4.2. Наследственная и ненаследственная изменчивость

В клетке в зависимости от условий может находиться одна или несколько копий хромосомы. ДНК содержится также во внехромосомных генетических элементах — плазмидах, 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 имеющие приспособ-

собительный характер изменения (**адаптации**). Адаптационная (ненаследственная) изменчивость не затрагивает генотип и осуществляется путем регуляции клеточного метаболизма. Скачкообразные наследуемые 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, ведущие к существенным нарушениям последовательности и количества генов, затрагивают большие участки ДНК и могут быть летальными.

Защитой генетического материала от повреждающего действия мутагенов, независимо от их природы, служат **репарационные системы** (прежде всего, фотореактивация и темновая репарация).

Для проявления мутации необходимо, чтобы изменение закрепилось в дочерней молекуле ДНК, т.е. должна произойти репликация. 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.

Наследственную изменчивость прокариотических микроорганизмов также вызывают рекомбинации генетического материала трех основных типов: конъюгация, трансформация и трансдукция.

4.3. Рекомбинация у прокариот

4.3.1. Трансформация

Трансформацией называется процесс изменения свойств одних микроорганизмов под влиянием выделенной из других микроорганизмов растворенной ДНК (рис. 4.3). Процесс трансформации был открыт в 1928 г. на культуре *Streptococcus pneumoniae*. Оказалось, что при контакте убитых вирулентных возбудителей (S-диссоциантов) с живыми авирулентными R-клетками стрептококков, последние приобретают способность вызывать заболевание. Для трансформации фрагменты ДНК должны быть двуцепочечными и обладать значительной молекулярной массой. Клетка-реципиент способна воспринять чужеродную ДНК, если находится в определенном физиологическом состоянии — **компетентности**. При этом присутствия живой клетки-донора не требуется. Большинство бактерий способно находиться в состоянии компетентности на стадии замедления роста. У компетентных клеток снижен уровень метаболизма, изменена клеточная поверхность, они становятся более чувствительными к осмотическому шоку. Компетентные клетки вырабатывают специальный низкомолекулярный белок, называемый фактором компетентности. Он взаимодействует с особыми рецепторами клеточной стенки и вызывает синтез автолизина, ДНК-связывающего белка и эндонуклеазы I. Клетка имеет ограниченное число ДНК-воспринимающих

рецепторов. Адсорбция ДНК происходит на всех прокариотических клетках, но только для компетентных клеток она имеет необратимый характер. ДНК-связывающий белок присоединяется к фрагментам донорной ДНК размером 22—45 тыс. п.о., после чего эндонуклеаза I делает на них одноцепочечные разрезы через 6 тыс. п.о. друг от друга.

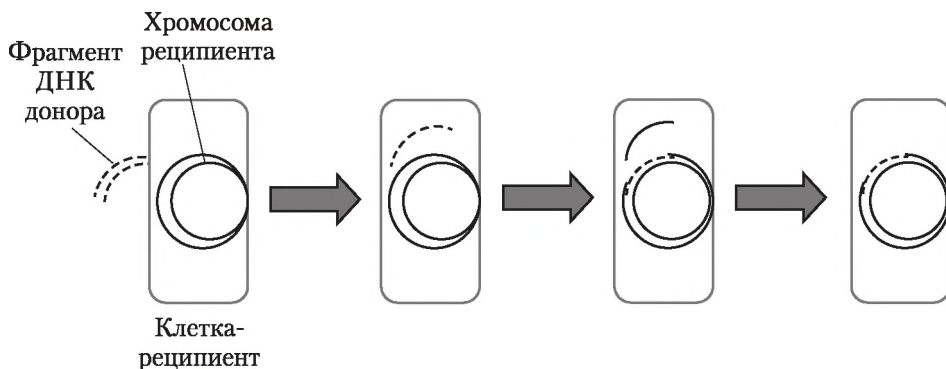


Рис. 4.3. Схема трансформации

Фрагменты входят в клетку одним концом, претерпевая еще одну «нарезку» на отрезки 2—4 тыс. п.о. и деградацию одной из цепей. Однонитевые фрагменты образуют комплекс с ДНК-связывающим белком, защищающим их от деградации. При контакте с хромосомой клетки однонитевой фрагмент ДНК донора вытесняет одну из ее цепочек, включаясь в ДНК реципиента. В хромосому может включиться ДНК с определенной степенью гомологии с ДНК реципиента. Вытесненный однонитевой участок подвергается элиминации. Состояние компетентности можно создать искусственно путем электропорации или использования протопластов. Трансформировать клетки может не только хромосомная, но и плазмидная и фаговая ДНК. Возможна также межвидовая трансформация.

4.3.2. Трансдукция

Гены могут переноситься из одной прокариотической клетки в другую и в процессе **трансдукции**. При этом функцию переносчиков генетического материала (векторов) выполняют фаги, случайно захватывающие фрагмент хромосомы хозяина при образовании зрелых фаговых частиц (рис. 4.4).

При заражении клетки-реципиента и интеграции своей ДНК в хромосому нового хозяина фаг включает одновременно в геном фрагмент ДНК первого хозяина путем обмена по гомологичным участкам. Чтобы новый признак мог проявиться в клетке-реципиенте, необходимо длительное пребывание фага в латентном состоянии. Трансдукция может быть специфической (т.е. встраивание происходит всегда в определенный участок хромосомы) и неспецифической. При неспецифической трансдукции привнесенный в клетку фрагмент ДНК может быть включен в хромосому, модифицировав ее генетическую информацию, а может долгое время сохраняться в автономном состоянии и фенотипически выражаться как плаزمид.

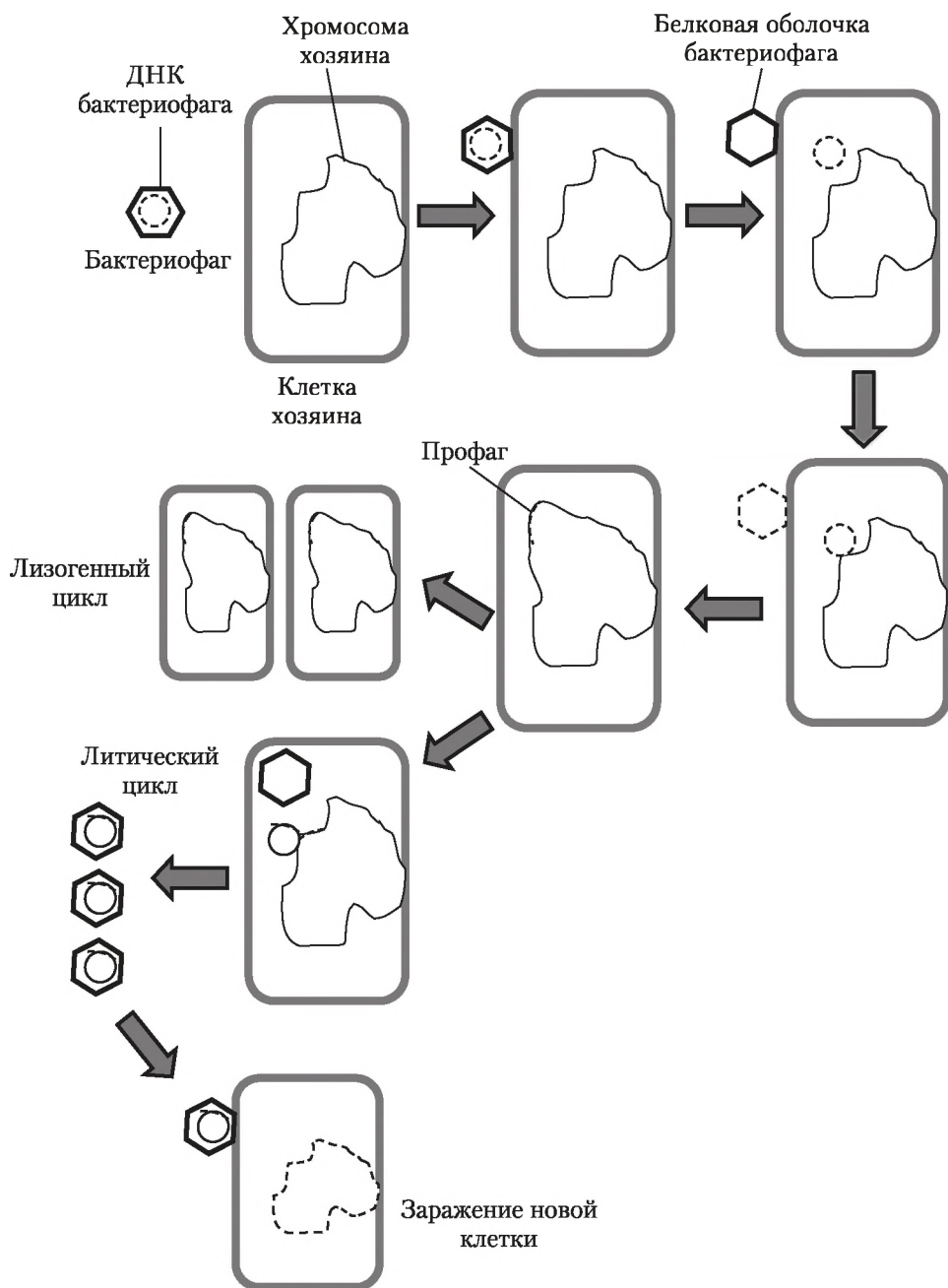


Рис. 4.4. Схема трансдукции

4.3.3. Конъюгация

При **конъюгации** клетка-донор и клетка-реципиент вступают в непосредственный контакт. Клетка-донор должна иметь половую плазмиду (F-фактор), которая может быть автономна или встроена в хромосому. F-фактор обуславливает способность донорной клетки формировать струк-

туры для передачи генетического материала. F-плазмида имеет протяженность 100 тыс. п.о. и несет более 20 генов. Образование половых пилей контролирует *tra*-область половой плазмиды. После возникновения контакта с клеткой-реципиентом половые пили сокращаются и подтягивают конъюгирующие клетки друг к другу вплотную. В их оболочках формируются поры. При автономной локализации F-фактора (рис. 4.5, *а*) эндонуклеаза, кодируемая *tra*-областью, делает односторонний разрыв ДНК плазмиды в *ori T*-последовательности. После этого начинается контролируемая генами *tra*-области репликация плазмидной ДНК способом «катящегося кольца». При этом разорванная нить как бы сползает со второй, кольцевой, нити плазмиды, а на освободившемся месте сразу же достраивается комплементарная цепь ДНК. Односторонняя цепь передается в клетку-реципиент, также достраивая комплементарную нить ДНК и замыкаясь в кольцо. Таким образом, клетка-донор как бы передает клетке-реципиенту копию F-фактора (или другой конъюгативной плазмиды, имеющей *tra*-область). При передаче половой плазмиды реципиентная клетка приобретает способность вступать в конъюгацию уже в качестве донора.

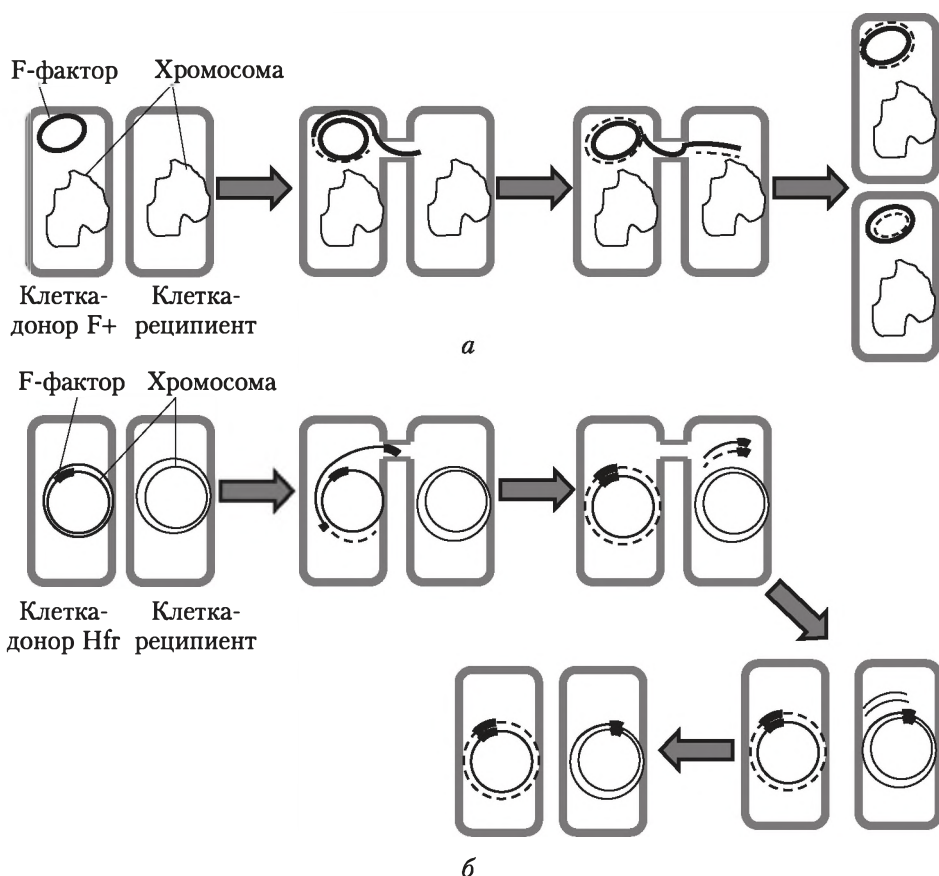


Рис. 4.5. Схема конъюгации в случае:

а — автономного; *б* — встроенного положения F-фактора в клетке-доноре

В случае интеграции F-фактора в хромосому донора (состояние Hfr) передача наследственного материала осуществляется с высокой частотой. Перенос генетического материала строго ориентирован: односторонний разрыв хромосомы происходит в локусе θ в пределах полового фактора и ДНК движется в клетку-реципиент всегда определенным концом вперед (рис. 4.5, б). Сначала передается фрагмент плазмиды от *ori T* до точки рекомбинации полового фактора с хромосомой, затем сама хромосома и последним — оставшийся фрагмент плазмиды. Скорость переноса в одинаковых условиях для определенного штамма является постоянной. Поскольку контакт клеток очень нестабилен и часто прерывается, то переход всей цепи хромосомы в клетку-реципиент — явление редкое (его длительность около 90 мин). Перешедший в клетку генетический материал может встраиваться в хромосому клетки-реципиента при наличии гомологичных участков, что приводит к приобретению новых признаков. Так как первым реципиенту передается всегда один и тот же, специфичный для каждого штамма, участок хромосомы, то частота передачи стоящих следом за ним генов позволяет расположить их по отношению к этому локусу и составить генетическую карту хромосомы.

Перенос генетического материала из клетки в клетку осуществляется также путем передачи плазмид. Особенностью конъюгации у стрептококков является участие в процессе **феромонов** клетки-реципиента (пептидов с молекулярной массой 100 Д). Каждый феромон строго специфичен к определенной плазмиде. Выделение реципиентом феромона приводит к образованию донором прикрепительных пилей. Предполагают также, что феромоны могут контролировать работу генов *tra*-области конъюгативных плазмид. У актиномицетов, имеющих плазмиды в линейной форме, при конъюгации с участием Hfr-доноров перенос генетического материала является двунаправленным или ненаправленным.

4.4. Гетерогенность популяции микроорганизмов, понятие о диссоциации

Механизм диссоциации еще не раскрыт полностью, однако в практике научных исследований с ним сталкивается практически каждый, кто работает с микроорганизмами.

Диссоциацией называют появление колоний разной морфологии при расसेве чистой культуры на твердую среду.

На самом деле, в этом случае микробная популяция гетерогенна не только морфологически, но и затрагивает также физиолого-биохимические и генетические признаки. Процесс диссоциации имеет постоянный характер и более высокую частоту ($\approx 10^{-4}$), чем спонтанные мутации. Наиболее часто образуются три морфотипа колоний: R — шероховатые, S — гладкие и M — слизистые. У ряда микроорганизмов были обнаружены колонии одного морфотипа, но имеющие незначительные модификации (например, гладкие, но существенно различающиеся по блеску или раз-

меру и тогда обозначаемые как S_1). Первоначально это явление, названное «вариацией фаз», было отмечено у патогенных микроорганизмов родов *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*. В разных фазах протекания болезни наблюдали преобладание определенного типа колоний (S — в эпидемической фазе, R — в постэпидемической).

Различия в виде колоний обычно выявляются не на любой плотной среде, а только на среде, богатой углеводами. Колонии разных морфотипов различаются по диаметру, но 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-то из диссоциантов, но отмечают наличие всех трех вариантов.

Плотная или рыхлая «упаковка» клеток в колонии зависит прежде всего от способа 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). Особенности расхождения клеток диссоциантов при делении обуславливаются различиями химического состава и электростатической заряженности вещества капсул (при отрицательных зарядах возникает отталкивание оболочек). Различия в клеточных оболочках (капсула + клеточная стенка) являются причиной всего спектра различий физиолого-биохимических признаков диссоциантов. У диссоциантов 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. Разное количество в мембранах диссоциантов липидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, влияет на их текучесть (например, R-вариант имеет меньше таких липидов, чем другие формы). Такие изменения в клеточных оболочках сказываются на функциональных параметрах: скорости роста и выделения продуктов, устойчивости к токсическим веществам и различным физико-химическим факторам, активности мембранных ферментов. Большая устойчивость одного из диссоциантов к какому-либо фактору может привести к полной смене состава популяции к концу инкубационного периода. Таблица 4.1 суммирует данные о селективных преимуществах диссоциантов у ряда микроорганизмов при воздействии различных факторов.

Таблица 4.1

Селективные преимущества диссоциантов ряда мезофильных микроорганизмов при воздействии различных факторов

Факторы	R	S	M
Температура 41°C	+	–	–
Температура 14°C	–	–	+
Облучение ультрафиолетом	+	–	–
Обработка антибиотиками	+	–	–

Факторы	R	S	M
Высушивание (снижение активности воды)	+	–	–
NaCl (7%)	–	–	+
pH 4,0	–	+	–
pH 9,0	–	–	+
Аэрация	+	–	–
KH ₂ PO ₄ (0,5%)	–	+	–

Таким образом, на изменение условий популяция «отвечает» изменением соотношения диссоциативных вариантов, что способствует сохранению вида. Поэтому диссоциацию можно назвать адаптацией к меняющимся условиям среды на уровне популяции. Гетерогенность популяции микроорганизмов является эволюционным преимуществом.

Учет гетерогенности популяции позволяет прогнозировать поведение ряда патогенных микроорганизмов при изменении условий. Так, вирулентность популяции фитопатогенных псевдомонад может меняться в зависимости от погоды. В сухую погоду способность к заражению растений понижена из-за преобладания в популяции авирулентного R-варианта, более устойчивого к понижению активности воды.

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. Условия хранения продуцента также оказывают существенное влияние на состав его популяции.

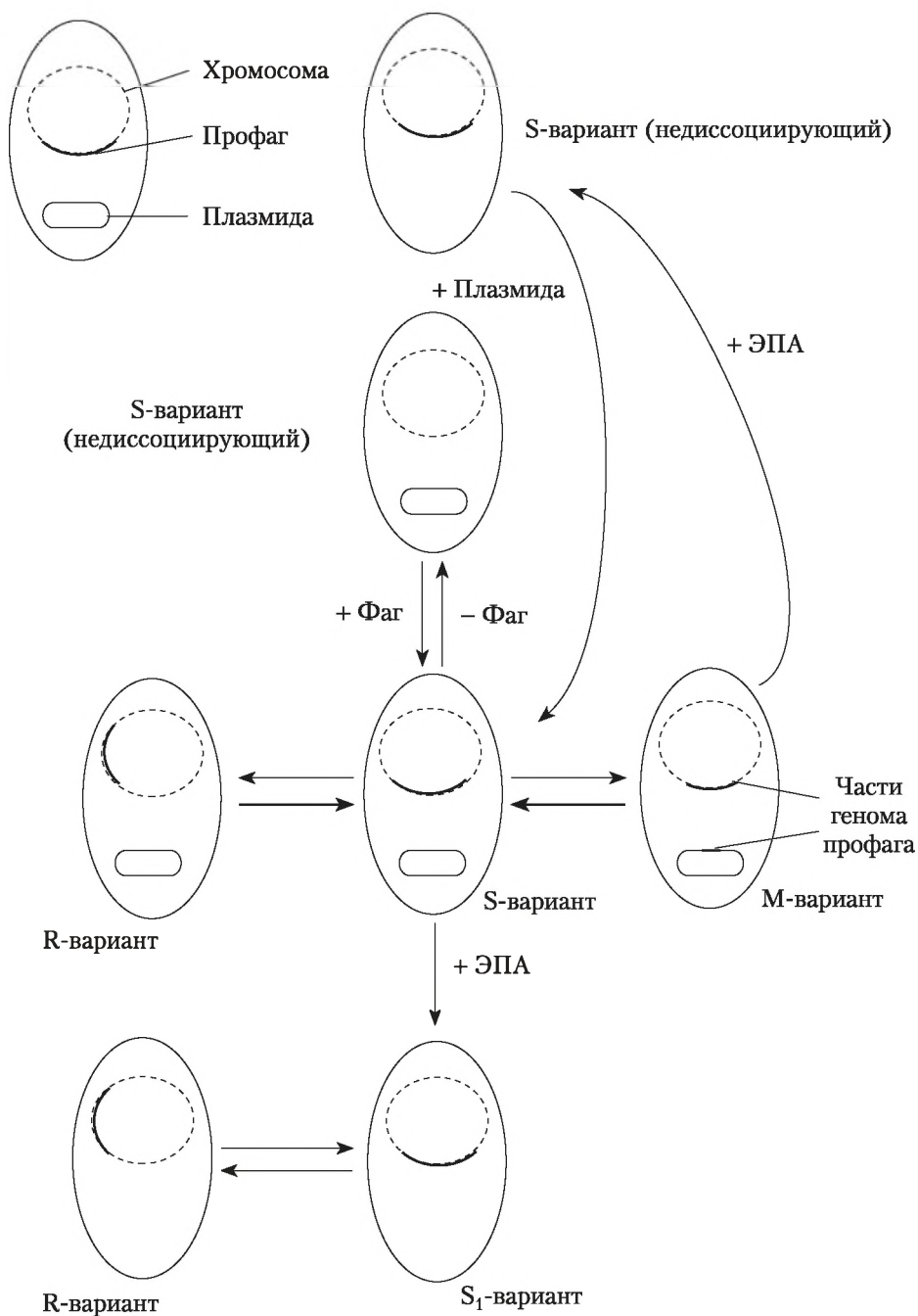
Для стабилизации синтеза биологически активных веществ в промышленности необходимо:

- 1) соблюдать оптимальные условия хранения продуцента;
- 2) создать оптимальные для высокопродуктивного диссоцианта условия роста;
- 3) постоянно вести стабилизирующий отбор;
- 4) получить недиссоциирующий клон.

Исследования процесса диссоциации имеют прогностическую ценность и дают возможность управлять течением процесса.

Диссоциация, безусловно, связана с изменениями в геноме. Показано, что в диссоциации изученных микроорганизмов могут быть задействованы все генетические процессы — трансформация, трансдукция, фаговая конверсия, мигрирующие генетические элементы (умеренные фаги, плазмиды, транспозоны).

Для *Rhodococcus rubropertinctus* предложена гипотетическая схема диссоциативных переходов (рис. 4.6).



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.

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».

4.5. Микроорганизмы со сложными жизненными циклами и «коллективным» поведением

Клеточным циклом называется промежуток времени от одного деления до другого. Большинство прокариот имеет простой клеточный цикл, при котором молодая клетка растет и увеличивается в размерах, а по достижении пороговой величины делится надвое. Более сложный цикл проходят микроорганизмы, обладающие **плейоморфизмом**, — их форма меняется в зависимости от возраста клетки. Клеточный цикл микроорганизмов, способных к **дифференциации**, также состоит из нескольких стадий (например, молодые подвижные клетки в дальнейшем могут переходить к «оседлому», прикрепленному существованию, а при ухудшении условий образовывать покоящиеся формы). Известны бактерии, образующие плодовые тела, часто причудливых конфигураций и расцветок. Наиболее яркие представители таких организмов — **миксобактерии**, хищники, питающиеся другими микроорганизмами, бактериями и дрожжами, которых они убивают выделяемыми антибиотиками. Они также способны использовать для питания множество веществ, в том числе нерастворимых в воде. Миксобактерии образуют целый ряд экзоферментов, с помощью которых лизируют клетки жертв или 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. При наличии пищевого субстрата миксобактерии координированно передвигаются («роемся») по его поверхности, одновременно питаясь и оставляя слизистый след. Движущиеся ритмично клеточные слои образуют на поверхности субстрата волны или рябь. При исчерпании питания миксобактерии агрегируют и образуют плодовое тело (рис. 4.7).

Этот сложный процесс 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.

Плодовые тела варьируют в размерах от 50 до 500 мкм, содержат от 10^4 до 10^6 микроспор и обычно ярко окрашены пигментами каротиноидной природы в красный, желтый и коричневый цвета. Каждый вид миксобактерий образует характерные для него плодовые тела, различающиеся по сложности строения (от простых глобул, окруженных стенками, образуемых видами рода *Mucosoccus*, до сложных разветвленных древовидных структур, несущих несколько спорангиев на стеблях или стволах, формируемых представителями рода *Stigmatella* и *Chondromyces*). Микроспоры, произошедшие из вегетативных клеток и находящиеся в спорангиях плодовых тел, устойчивы к высушиванию, высоким температу-

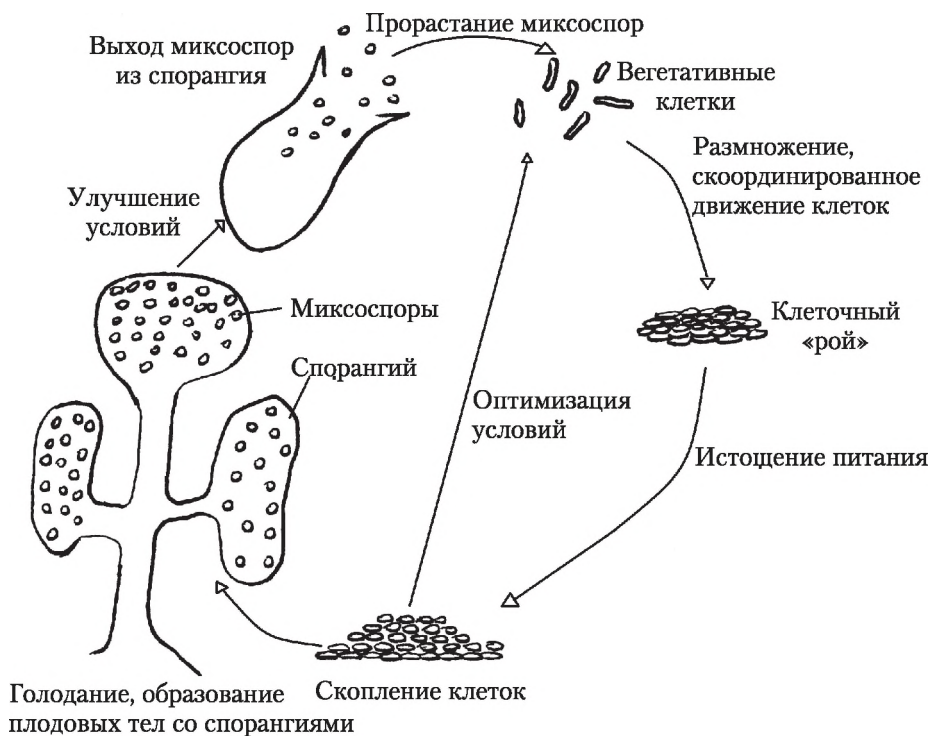


Рис. 4.7. Жизненный цикл миксобактерий

рам и УФ-радиации. Они могут оставаться жизнеспособными в условиях лаборатории до 10 лет. Образование плодовых тел с микроспорами, заключенными в спорангии, способствует еще большему выживанию популяции миксобактерий, так как микроспоры находятся компактно, группами, в плодовых телах и, высвобождаясь из спорангия и прорастая, дают сразу новую колонию миксобактерий. Такая «социальная» организация может иметь преимущества, так как значительная биомасса миксобактерий обеспечивает существенную концентрацию ферментов и эффективнее, чем одиночная клетка, растворяет клетки жертвы или субстрат.

4.6. Покоящиеся формы микроорганизмов

Некоторые прокариотические организмы в ответ на изменение внешних условий способны переходить в стадию покоя. Среди прокариот распространены такие покоящиеся формы, как эндоспоры и цисты.

Формирование **эндоспор** характерно для представителей нескольких родов грамположительных бактерий (*Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Thermoactinomyces*), которые имеют толстую клеточную стенку грамположительного типа, что, вероятно, необходимо для спорообразования. Эндоспоры чрезвычайно устойчивы к истощению питательных веществ, нагреванию, облучению, действию химических сое-

динений и высушиванию. В природе образование спор помогает клеткам избегать гибели при истощении субстрата или высушивании, воздействии радиации или химических веществ. Известны факты о сохранении жизнеспособности эндоспор *Bacillus anthracis* (бацилл сибирской язвы) в течение 500 лет и спор термоактиномицетов — до 7500 лет. Удалось прорастить даже эндоспоры *Bacillus cereus* из кишечника древней пчелы из куска янтаря, возраст которого 25–30 млн лет.

Борьба со спорами играет важную роль в пищевой, медицинской и промышленной микробиологии, поскольку многие спорообразующие бактерии являются возбудителями опасных заболеваний. Некоторые споры выдерживают кипячение в течение часа и более, поэтому для стерилизации растворов и инструмента применяют более жесткие и длительные способы воздействия антимикробных факторов (например, автоклавирование с температурой стерилизации 121°C и длительностью 1,5–3 ч). Спорообразование привлекает внимание исследователей и с фундаментальной точки зрения как простая одноклеточная модель клеточной дифференциации.

Обычно в клетке образуется одна эндоспора, однако, известны случаи формирования до 5 спор в одной бактериальной клетке. Эндоспоры хорошо просматриваются в клетках при помощи светового или электронного микроскопов. Непроницаемые для многих видов красителей, они наблюдаются как неокрашенные тельца на фоне прокрашенного остального содержимого клетки. Существуют и специальные методы дифференциальной окраски спор, позволяющие отчетливо различить в световой микроскоп окрашенную в синий цвет спору на фоне окрашенной в розовый цвет цитоплазмы. В материнских клетках (или спорангиях) споры различной формы (круглой или овальной) могут располагаться по-разному (центрально, терминально, субтерминально). Иногда образовавшаяся спора столь велика, что расширяет спорангий в середине или с одного конца. Различают три основных типа спорообразования: бациллярный, кластридальный и плектридиальный (рис. 4.8).

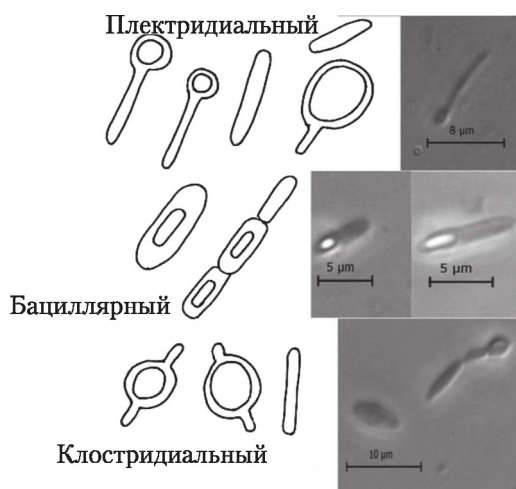


Рис. 4.8. Типы спорообразования у микроорганизмов

Этот признак часто используют при идентификации спорообразующих культур микроорганизмов. В активно спорующейся культуре почти все клетки образуют споры.

Споры имеют гладкую или шероховатую поверхность, бывают круглой или овальной формы. Электронно-микроскопические исследования показали, что структура эндоспор довольно сложна (рис. 4.9).

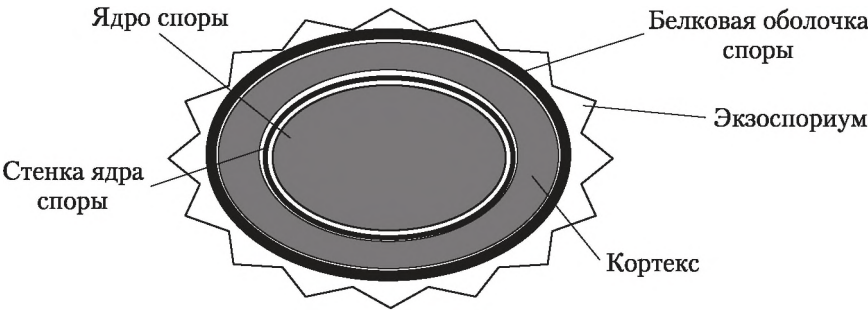


Рис. 4.9. Схема строения эндоспоры

Снаружи спора покрыта тонким **экзоспориумом**. За ним (по направлению к центру споры) лежит многослойная толстая **белковая оболочка споры**, практически не проницаемая для химических веществ. Из-за этого эндоспоры обладают существенной устойчивостью к дезинфектантам. Интересно, что энтеротоксин, образуемый *Clostridium perfringens* только при спорообразовании, серологически близок белкам оболочки споры. За белковой оболочкой располагается **кортекс**, состоящий из пептидогликана, более рыхлого, чем в вегетативной клетке. Он может занимать до половины объема споры. Под кортексом лежит **стенка ядра споры**, окружающая протопласт (**ядро споры**). Ядро споры содержит нуклеоид, рибосомы и необходимые для начала роста вещества, запасенные в стабильной форме. Нестойкие и легко восполняемые компоненты в ядре споры отсутствуют (табл. 4.2).

Таблица 4.2

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	Менее 10	680
Сумма нуклеотидов (Г + Ц + У)	530	860
Дезоксирибонуклеотиды	Менее 1,5	181
Фосфоглицериновая кислота	6800	—
Аминокислоты	150	1400

Так, ядро споры включает хромосому и небольшие количества каждого компонента белоксинтезирующего механизма: рибосомы, тРНК, ферменты и сопутствующие белки. Два нестабильных компонента клеток, иРНК и нуклеозидтрифосфаты, отсутствуют, однако, есть запас более стабильных предшественников АТФ — АДФ и АМФ. Аминокислоты и ферменты их биосинтеза при прорастании споры легко восполняются путем гидролиза небольших запасных белков, составляющих до 20% от общего белка споры. Эти же запасные белки имеют дополнительную функцию связывания споровой ДНК, поддерживая ее конформацию и повышая, таким образом, ее устойчивость к облучению. Энергия для восполнения отсутствующих компонентов может быть получена из стабильного 3-фосфоглицерата путем его конверсии в источник энергии и фосфата — фосфоенолпируват.

Высокую устойчивость эндоспор объясняют несколькими причинами. За счет снижения содержания воды в протопласте существенно замедляются все метаболические процессы. В дегидратации принимает участие кортекс, который осмотически вытягивает воду из протопласта. Этот процесс требует затрат значительного количества энергии. Показано, что действие пенициллина, нарушающее структуру кортекса, снижает степень обезвоживания протопласта споры. Считают, что в терморезистентности спор главную роль играет кальциевая соль дипикколиновой кислоты (рис. 4.10), содержание которой в спорах может достигать 15%.

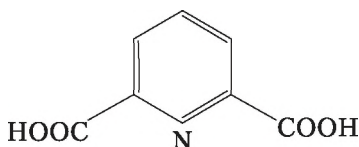


Рис. 4.10. Дипикколиновая кислота

Вегетативные клетки практически не содержат Ca^{2+} , и его активный транспорт начинается с началом спорообразования. Дипикколиновая кислота образуется в спорангии из диаминопикколиновой кислоты — предшественника пептидогликана. Са-дипикколинат локализован в ядре зрелой споры и может принимать участие в стабилизации споровых нуклеиновых кислот. Однако мутанты *B. megaterium*, споры которых не содержали дипикколиновой кислоты, также были термоустойчивы. В спорах обнаружены также небольшие кислоторастворимые белки, связывающие ДНК. Они окружают ДНК споры и защищают ее от повреждающих воздействий. Эти белки образуются из ферментов вегетативной клетки в результате ограниченного протеолиза, становясь при этом термостабильными. Другие специфические ферменты, синтез которых индуцируется при споруляции, также термоустойчивы. Таким образом, высокая устойчивость спор зависит, по-видимому, от нескольких факторов: стабилизации ДНК Са-дипикколинатом и кислоторастворимыми белками, дегидратации протопласта и др.

Споруляция (образование эндоспоры) происходит в несколько стадий (рис. 4.11).

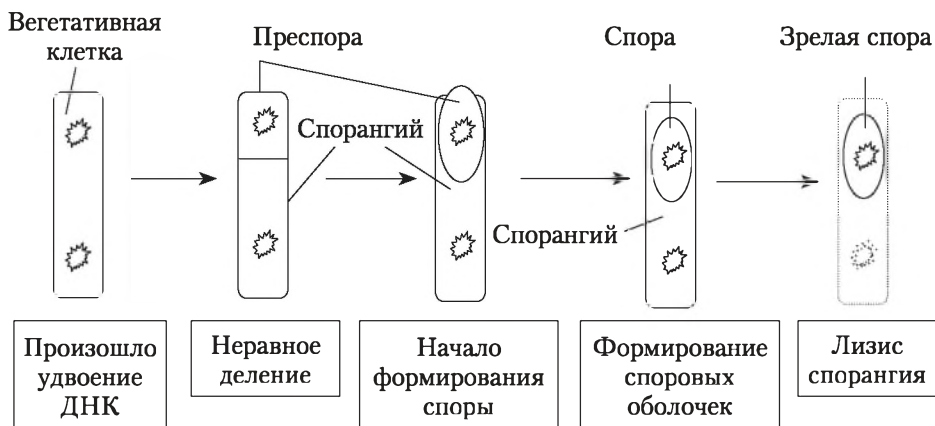


Рис. 4.11. Споруляция

После удвоения генетического материала в материнской клетке ее содержимое претерпевает неравное деление. Меньшая клетка (**преспора**) обволакивается со всех сторон большей клеткой (**спорангием**) и оказывается окруженной двойным мембранным слоем. Между этими мембранами формируются споровые оболочки. Сначала образуется кортекс и начинается накопление в споре Са-дипиколината. Затем вокруг кортекса закладываются белковые оболочки и экзоспориум. Когда синтез оболочек завершается, спора становится зрелой, увеличивается ее светопреломление и термоустойчивость. Цикл спорообразования завершается лизисом спорангия и выходом зрелой споры. Споруляция обычно начинается при истощении питательных веществ в среде и длится от 7 до 10 ч (у *B. subtilis* и *B. megaterium* соответственно).

Прорастание споры в активную вегетативную клетку — не менее сложный процесс, чем спорообразование. Часто эндоспоры не прорастают даже в богатой среде без активации, которая может заключаться в слабом нагреве или воздействии ультразвуком. Активация заканчивается созревaniem, т.е. нарушением состояния покоя споры. Процесс характеризуется набуханием споры, разрывом или поглощением экзоспориума, потерей устойчивости к нагреву и стрессам, утратой способности преломлять свет, увеличением метаболической активности. Многие обычные метаболиты, такие как аминокислоты и сахара, могут запускать процесс прорастания спор после их созревания. Протопласт споры образует новые компоненты, выходит из остатков споровых оболочек и формирует новую активную клетку бактерии.

Некоторые прокариоты, а среди эукариотических микроорганизмов простейшие, образуют другой вид покоящихся форм — цисту.

Циста — это потерявшая подвижность клетка с утолщенной, ослизненной оболочкой, устойчивая к высушиванию и перепадам температур.

Метаболическая активность цисты значительно снижена. Образование цист характерно для азотфиксирующих свободноживущих микроорганизмов из рода *Azotobacter*, некоторых метанотрофов и олиготрофов.

Цисты выполняют следующие основные функции: 1) защищают клетку от вредных воздействий окружающей среды, таких как истощение источника питания, высушивание, неблагоприятное значение рН или низкое парциальное давление кислорода; 2) способствуют сохранению ДНК; 3) служат способом передачи инфекционного начала от хозяина к хозяину (у патогенных микроорганизмов).

Обычно прорастание цист в вегетативные клетки побуждается благоприятными внешними условиями. Некоторые цисты паразитических простейших превращаются в активные трофозиготы, попадая в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) хозяина.

4.7. Генетически модифицированные микроорганизмы

Живые организмы, наследственный материал которых целенаправленно изменен с помощью генно-инженерных методов, называют **генетически модифицированными организмами (ГМО)**. Целью создания любого ГМО является улучшение полезных свойств исходного организма, а также дополнение их рядом необычных характеристик, часто присущих организмам других систематических групп. Для генетической модификации в настоящее время чаще всего применяют перенос фрагментов ДНК из других организмов в организм-продуцент (получение трансгенных организмов). Значительную часть ГМО составляют **генетически модифицированные микроорганизмы (ГЕМОМ)**. В качестве векторов прокариот используют плазмиды и фаги. Поскольку микробные клетки относительно просто устроены, быстро растут и легко подвергаются «конструированию», то ГЕМОМ широко используют в фундаментальных научных исследованиях и прикладных областях. Современная наука использует ГЕМОМ в качестве моделей для решения ряда проблем биологии и медицины (процессы старения и регенерации, закономерности развития некоторых заболеваний и т.д.). Для биотехнологических производств ГЕМОМ — это перспективные продуценты ценных веществ. При помощи генетически модифицированных микроорганизмов получают пищевые добавки, аминокислоты, витамины, ароматизаторы, ферменты, фармацевтические препараты, вакцины, а также некоторые дорогостоящие соединения, ранее производимые путем традиционного химического синтеза. Методами генной инженерии удастся не только увеличить продуктивность процесса и удешевить его, но и получить микробиологическим путем необычные для микробного метаболизма продукты при физиологических условиях. Замена химического синтеза на биологический привлекательна с точки зрения экологической безопасности и использования возобновляемых природных источников. Международные стандарты качества производства (GMP) требуют, чтобы после завершающей стадии очистки конечный продукт не содержал микробной ДНК.

В последнее время растет число ГЕМОМ, предлагаемых для разрушения различных загрязнений как в природных местообитаниях, так и в искусственных очистных установках. Новое направление генно-инженер-

ных разработок — это создание микроорганизмов-пробиотиков с заданными свойствами на основе молочнокислых бактерий. Получены штаммы с повышенной активностью использования лактозы и гидролиза белков молока, обладающие устойчивостью к бактериофагам. Перенос генов из неродственных штаммов позволяет «добавить» молочнокислым микроорганизмам ряд дополнительных возможностей (например, способность к образованию α -кетоглутарата из глутамата).

Потенциальные проблемы, возникающие при неконтролируемом внесении ГЕМОМ в окружающую среду, вызвали широкие дебаты в научном сообществе, вовлекшие поборников защиты окружающей среды и правительственные органы. Основной вопрос заключался в том, 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. Предполагали, что чужеродная ДНК, внесенная в ГЕМОМ, снижает конкурентоспособность живых клеток по сравнению с «дикими» штаммами из-за 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 говорит о том, что они не отмирали полностью. Результаты этих и последующих экспериментов показали, что модифицированные псевдомонады могут жить в почве в течение длительного времени. Другие наблюдения показали существование ГЕМОМ в почвенных и водных экосистемах в виде некультивируемых форм бактерий. Специальные исследования также показали, что ДНК разрушенных ГЕМОМ-клеток, адсорбированная на частицах почвенной глины, устойчива к действию ДНК-аз 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. Так, через год после введения в водную экосистему специфического штамма *Pseudomonas* sp. B13 в ней были обнаружены виды, расщепляющие 3-хлорбензол (3-ХБ), которые ранее из этой экосистемы не выделяли. Более того, в геноме нового изолята были обнаружены последовательности, принадлежащие штамму B13. Предполагают, что новый штамм возник в результате обмена частью генома между аборигенной бактерией и внесенным штаммом B13, не способным утилизировать 3-ХБ. Таким образом, перенос генетического 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.

Еще одна проблема — это использование при получении ГМО маркерных микробных генов устойчивости к антибиотикам, которые могут

перейти к микробиоте кишечника, что приведет к невозможности лечения многих заболеваний с помощью антибиотиков. В связи с этим с декабря 2004 г. в странах ЕС запрещена продажа ГМО и их продуктов с микробными генами устойчивости к антибиотикам.

Любая интродукция ГЕМОМ в природные экосистемы опасна из-за возможности горизонтального переноса рекомбинантных генов от ГЕМОМ к другим представителям микробного сообщества. Ситуация осложняется отсутствием адекватных методов выявления и контроля над распространением ГЕМОМ в окружающей среде. Одним из путей может быть внедрение в переносимый наследственный материал генов «программируемой клеточной смерти», которые будут экспрессироваться после того, как функция ГЕМОМ в данном местообитании будет выполнена. Если эти гены будут нести рекомбинантная плазмида, то ее передача другому микроорганизму будет вызывать его гибель. Тем самым будет решена проблема распространения этих плазмид в окружающей среде.

Резюме

Среди прокариот наиболее распространено бинарное деление. У эукариот размножение часто связано с половым процессом. При изменении внешних условий большинство клеток в популяции претерпевает имеющие приспособительный характер изменения (адаптации). Адаптационная (ненаследственная) изменчивость не затрагивает генотип и осуществляется путем регуляции клеточного метаболизма. Скачкообразные наследуемые изменения генотипа носят название мутаций. У некоторых микроорганизмов неполная передача и рекомбинация генетической информации может осуществляться путем конъюгации, трансдукции или трансформации. Процесс диссоциации у микроорганизмов выражается в появлении на твердой среде колоний разных морфотипов (обычно R — шероховатых, S — гладких и M — слизистых) при расसेве чистой культуры. Диссоциация заключается не только в морфологической гетерогенности культуры, но и в различиях физиолого-биохимических и генетических признаков, что является следствием различий в клеточных оболочках. Она происходит постоянно и имеет более высокую частоту ($\approx 10^{-4}$), чем спонтанный мутагенез. Имея гетерогенный состав, микробная популяция лучше адаптируется к изменению условий окружающей среды, что дает ей эволюционное преимущество перед недиссоциирующими культурами.

Некоторые прокариоты обладают «коллективным поведением» и сложным циклом развития, могут менять морфологию клеток, образовывать различные покоящиеся формы и даже плодовые тела. Среди прокариот распространены такие покоящиеся формы, как эндоспоры и цисты.

Живые микроорганизмы, наследственный материал которых целенаправленно изменен с помощью генно-инженерных методов, называют генетически модифицированными микроорганизмами (ГЕМОМ). ГЕМОМ используют в качестве моделей для решения ряда проблем биологии и медицины (старения и регенерации, закономерностей развития некото-

рых заболеваний и т.д.), как перспективные продуценты ценных веществ, в качестве основных агентов деструкции веществ-загрязнителей в окружающей среде и в очистных сооружениях. Перспективно также создание с помощью генной инженерии новых пробиотиков на основе бактерий молочнокислой группы, которые будут обладать заданными полезными свойствами. Потенциальные проблемы ГЕМОМ — это длительное их персистирование в природных эконизах и передача модифицированных генов аборигенной микробиоте, что может отразиться на биоразнообразии и стабильности микробных сообществ.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Приведите примеры ненаследственной и наследственной изменчивости микроорганизмов.
2. Проанализируйте значение процессов рекомбинации генетического материала прокариот.
3. Как процесс диссоциации влияет на выживание и устойчивость микробной популяции?
4. Чем эндоспора отличается от вегетативной клетки? Что устойчивее в окружающей среде — эндоспора или циста?
5. Какие преимущества получают микроорганизмы, обладающие «коллективным поведением»?
6. Проанализируйте достоинства и недостатки применения ГЕМОМ в человеческой практике.

Лабораторная работа 1

Процесс диссоциации у *Pseudomonas aeruginosa* К-2 и влияние на него условий культивирования

Цель работы: научить студентов выявлять диссоциирующие культуры, анализировать влияние ряда факторов на диссоциацию бактериальной культуры, ознакомить с диссоциативными вариантами псевдомонад.

Бактерии рода *Pseudomonas* являются настоящими космополитами и встречаются на Земле повсеместно, так как обладают способностью к существованию в самых разнообразных условиях. Высокая скорость роста на простых средах, широкие возможности метаболизма и особенности организации генетического аппарата делают псевдомонад привлекательными и перспективными для биотехнологии объектами. Представители рода *Pseudomonas* используются для получения ряда индивидуальных химических веществ, в производстве препаратов для сельского хозяйства, полимеров, в биогидрометаллургии, в нефтедобыче для повышения отдачи пластов, а также при переработке и удалении отходов и веществ, загрязняющих окружающую среду, в том числе и углеводов.

При рассеве псевдомонад на плотные среды, как правило, обнаруживаются R-, S- и M-диссоцианты, различающиеся, помимо морфологии колоний, ультратонким строением клеток, рядом физиолого-биохимических признаков, скоростью роста, устойчивостью к действию ряда химических и физических факторов.

В частности, диссоцианты *P. aeruginosa* К-2 имеют различия:

1) в размерах и строении колоний — самые большие и прозрачные колонии образует М-диссоциант, клетки которого обладают мощной капсулой, а R-диссоциант растет в виде небольших плотных колоний, так как его клетки имеют тонкую капсулу;

2) потребностях в основных биогенных элементах (углероде, азоте и фосфоре) — R-клетки лучше растут на богатых средах, а М-клетки имеют селективные преимущества на средах с недостатком азота или фосфора;

3) путях использования глюкозы — у R-диссоцианта преобладает окислительный путь, а М-клетки наиболее активно осуществляют превращение сахара с образованием муравьиной кислоты, что приводит к резкому подкислению среды. S-диссоциант способен переключаться с одного из вышеуказанных способов использования глюкозы на другой.

Целью данной работы является изучение влияния состава питательных сред и условий культивирования на расщепление популяции *P. aeruginosa* К-2 на диссоцианты.

Необходимые материалы: качалки на 30°С и 37°С, на 200 и 300 об/мин, рН-метр, спектрофотометр, стандарт мутности (10^9 клеток/мл), счетчик колоний, микробиологическая петля; посуда (шт. в расчете на 1 студента) — чашки Петри — 55, пробирки узкие с ватными пробками — 40, пробирки широкие с ватными пробками — 10, стеклянные шпатели — 10, пипетки на 1 мл — 45, на 5 мл — 5, на 10 мл — 1, круглодонные колбы на 250 мл — 3; среды и растворы (в расчете на 1 студента) — БСА — 1 л, жидкая полноценная минеральная среда — в 3 широких пробирках по 10 мл и в 3 круглодонных колбах по 50 мл (удобно приготовить 0,2 л), жидкая «голодная по фосфору» минеральная среда — в 3 широких пробирках по 10 мл (удобно приготовить 50 мл), 40%-й раствор глюкозы — 50 мл, физиологический раствор — 0,3 л, скошенный БСА в пробирках — 2 шт. (готовится заранее лаборантом); микроорганизм — S-диссоциант непатогенного штамма *P. aeruginosa* К-2, выделенного из пластовых вод сибирского нефтяного месторождения Ван-Еган.

Занятие 1

Для работы готовят и стерилизуют необходимые среды и растворы. В качестве богатой среды применяют бульон-сусло-агар (БСА), pH = 7,0. Для приготовления среды к МПБ добавляют неохмеленное сусло (6°Б) и 1,5% агара. Среду стерилизуют при 0,5 ати. Минеральную среду готовят в двух модификациях. Полноценная среда имеет следующий состав (г/л): KCl — 0,6; KNO₃ — 5,0; NaH₂PO₄ · 2H₂O — 0,5; MgSO₄ · 7H₂O — 0,2; pH = 7,0; «голодная по фосфору» отличается только содержанием NaH₂PO₄ × 2H₂O — 0,05. Среды готовят на водопроводной воде и стерилизуют при 1,0 ати. После стерилизации перед посевом в среды вносят 2,0% глюкозы в виде 40%-го раствора, простерилизованного при 0,5 ати. Для приготовления суспензий клеток и десятичных разведений готовят стерильный физиологический раствор (0,85% NaCl в дистиллированной воде) и стерилизуют его при 1,0 ати.

Общая схема эксперимента приведена на рис. 4.12.

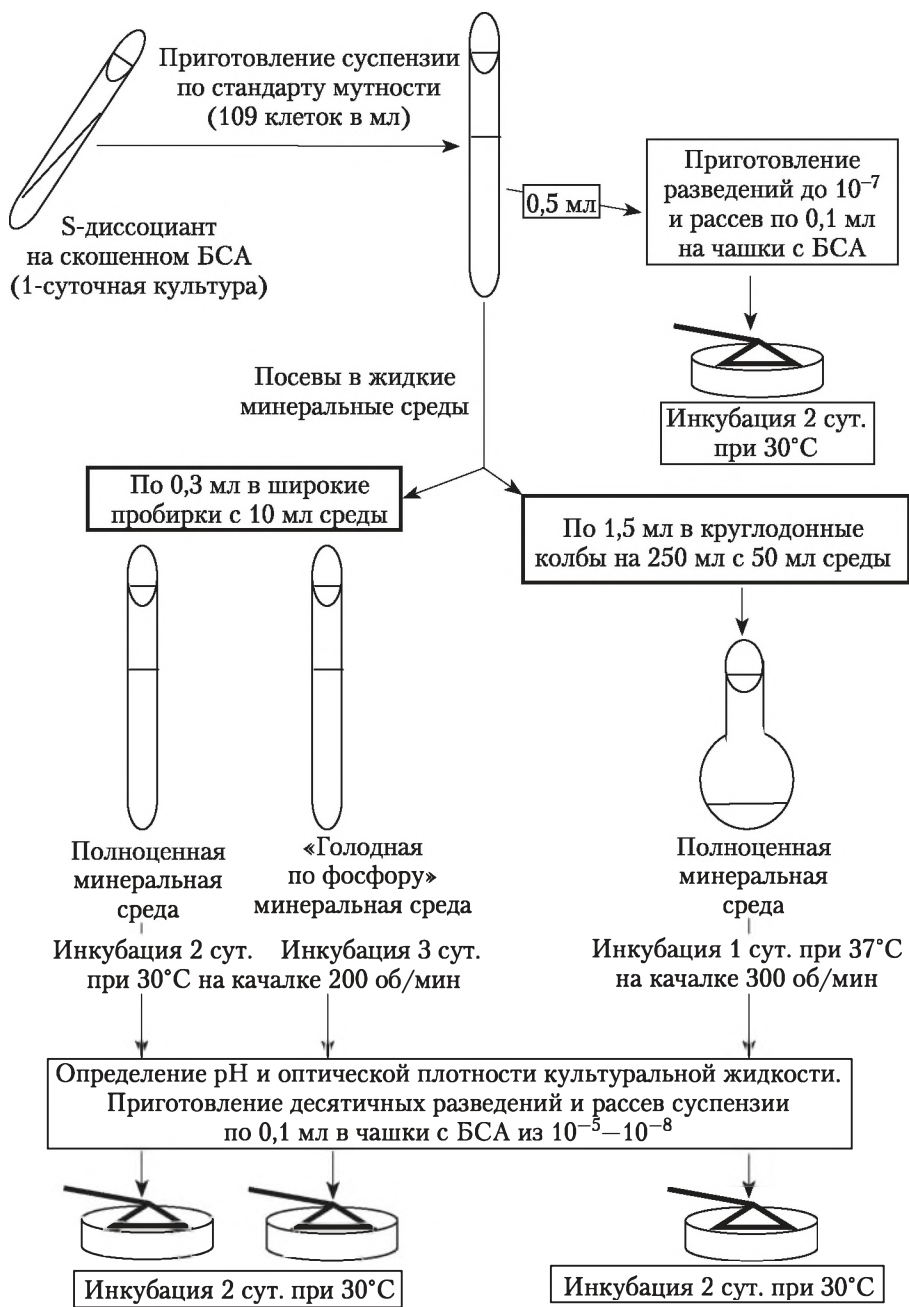


Рис. 4.12. Схема эксперимента по диссоциации S-варианта *P. aeruginosa*

Для получения исходной 1-суточной культуры осуществляют посев петлей из выданных преподавателем пробирок с S-диссоциантом *P. aeruginosa* К-2 на свежий скошенный БСА (выдаются лаборантом) и инкубируют засеянные пробирки при 30°C в течение 24 ч.

Занятие 2

Через сутки готовят суспензию выросших клеток с концентрацией 10^9 клеток в мл по стандарту мутности. Для этого в стерильную узкую пробирку наливают пипеткой стерильный физраствор (≈ 3 мл), куда осторожно переносят петлей выросшие бактерии, не захватывая БСА, энергично перемешивают и доводят плотность суспензии стерильным физраствором до нужной концентрации, сравнивая ее с соответствующим стандартом мутности. Общее количество получившейся суспензии должно быть не менее 7 мл.

Из части суспензии (0,5 мл) готовят десятичные разведения в стерильном физрастворе до 10^{-7} , вносят по 0,1 мл в чашку с БСА из разведений 10^{-5} – 10^{-7} (в трех повторностях) и тщательно растирают стеклянными шпателями. Инкубируют засеянные чашки 2 сут. при 30°C , после чего до подсчета колоний хранят в холодильнике до 5 сут.

Из оставшейся суспензии производят посев в жидкие минеральные среды в широких пробирках (по 10 мл) и круглодонных колбах (по 50 мл), внося по 3% (по объему) посевного материала. Каждый вариант опыта ставят не менее чем в трех повторностях. Культуру инкубируют в колбах при 37°C на качалке при 300 об/мин в течение 1 сут., а в пробирках при 30°C на качалке при 200 об/мин на полноценной среде 2 сут., на «голодной по фосфору» — 3 сут.

Занятие 3

По завершении инкубации в культуральной жидкости всех вариантов в усредненной пробе определяют оптическую плотность и pH. Результаты вносят в табл. 4.3. Готовят десятичные разведения усредненных проб в стерильном физрастворе до 10^{-8} и вносят по 0,1 мл из трех последних разведений в чашки с БСА (в трех повторностях). Суспензию тщательно растирают по агару стеклянным шпателем. Засеянные чашки инкубируют при 30°C в течение 48 ч. Культуры в жидких средах до посева и чашки с выросшей культурой до подсчета колоний можно хранить в холодильнике до 5 сут.

Таблица 4.3

Состав популяции *P. aeruginosa* K-2 при разных условиях культивирования

Среда, условия, °C, об/мин	pH	Оптическая плотность, усл. ед.	Число клеток, мл (% от общего количества)		
			S	R	M
БСА (исходная культура)					
Полноценная минеральная среда, 30, 200					
«Голодная по фосфору» среда, 30, 200					
Полноценная минеральная среда, 37, 300					

Занятие 4

Через 2 сут. на чашках подсчитывают общее число колоний и число колоний каждого морфотипа. Описывают имеющиеся типы колоний. Определяют долю диссоциантов в разных вариантах опыта. Результаты вносят в табл. 4.3. Делают выводы о влиянии состава среды, температуры и аэрации на гетерогенность популяции исходной культуры. Соотносят наблюдаемый сдвиг рН с увеличением доли определенного диссоцианта.

Чашки с колониями М-диссоцианта оставляют на хранение при комнатной температуре на 1 мес.

Занятие 5

Через месяц колонию с одной из чашек снимают петлей с агара, суспендируют в стерильном физрастворе, делают десятичные разведения до 10^{-8} и засевают обычным способом на чашки с БСА из четырех последних разведений (в двух повторностях). Инкубируют 2 сут. при 30°C.

Занятие 6

По завершении инкубации подсчитывают общее число колоний и долю диссоциантов в популяции. Делают вывод о влиянии активности воды на расщепление культуры на диссоцианты.

Глава 5

РОСТ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности роста микроорганизмов в периодических и непрерывных культурах;

уметь

- рассчитывать скорость роста микробных культур;

владеть

- навыками выращивания сапротрофных микроорганизмов на соответствующих средах, контроля их роста и количественного учета.

5.1. Основные параметры роста культур

У одноклеточных форм понятия «рост» и «развитие» почти равнозначны. Из-за малых размеров микроорганизмов оценка роста происходит не для индивидуального организма, а для популяции. Графическое отражение процесса называется **кривой роста**. Простейшими параметрами для оценки роста культуры служат время генерации, константы скорости роста и скорости деления. Для их подсчета пользуются таким легко измеряемым показателем, как количество клеток в единице объема. Методы определения числа клеток бывают прямые и косвенные. Прямыми методами можно подсчитать под микроскопом достаточно крупные клетки, не образующие скопления. При таком подсчете без специальных приемов не удастся различить живые и мертвые клетки. Для этого готовят различные препараты с определенной площадью мазка или применяют специальные счетные камеры, обеспечивающие заданный объем клеточной суспензии (рис. 5.1).

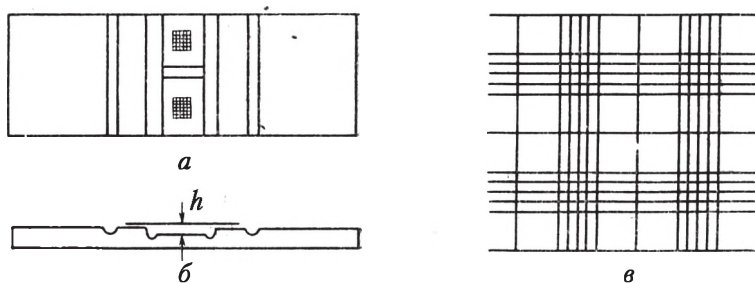


Рис. 5.1. Камера Горяева — Тома для подсчета клеток:

а — вид сверху; *б* — вид сбоку; *в* — разметка (сеточка) средней части (увеличено)

Косвенные методы основаны на измерении показателей, зависящих от количества клеток (число колониеобразующих единиц, значение мутности суспензии, содержание белка, поглощение кислорода, количество образованной биомассы и др.). Обычно исследователь параллельно использует два-три метода определения численности клеток, так как любой способ подсчета имеет свои ограничения. Так, не все клетки способны дать колонии на твердой среде, и не существует питательной среды, подходящей для всех без исключения микроорганизмов.

Из косвенных методов наиболее часто применяют получение отдельных колоний на плотных средах по Коху. Поскольку колония — это потомство одной клетки, то, подсчитав выросшие на агаризованной среде колонии, можно узнать число клеток (**колониеобразующих единиц, КОЕ**) в единице объема исходной суспензии. Для получения изолированных колоний готовят десятикратные разведения. Посев можно осуществить по поверхности застывшей агаризованной среды в чашках Петри (рис. 5.2) или глубинно (рис. 5.3), внося заданный объем суспензии в порцию расплавленной и остуженной до 45°С агаризованной среды и выливая смесь в чашку Петри для застывания. Чашки с посевами помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода не мешала образованию отдельных колоний. Когда колонии станут хорошо различимыми, проводят их подсчет, учитывая объем внесенной пробы и разведение.

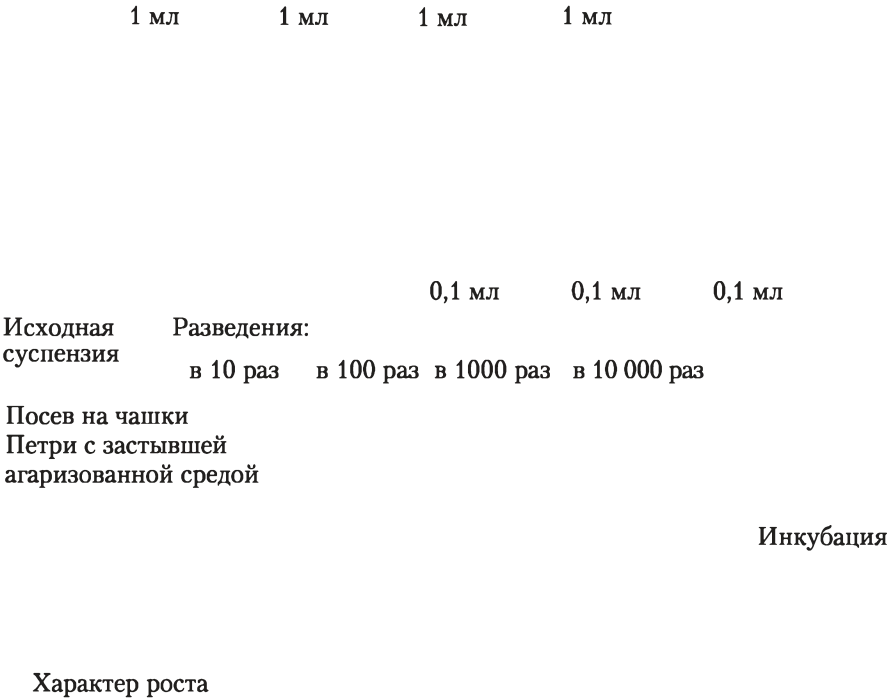


Рис. 5.2. Схема поверхностного посева по Коху для получения отдельных колоний

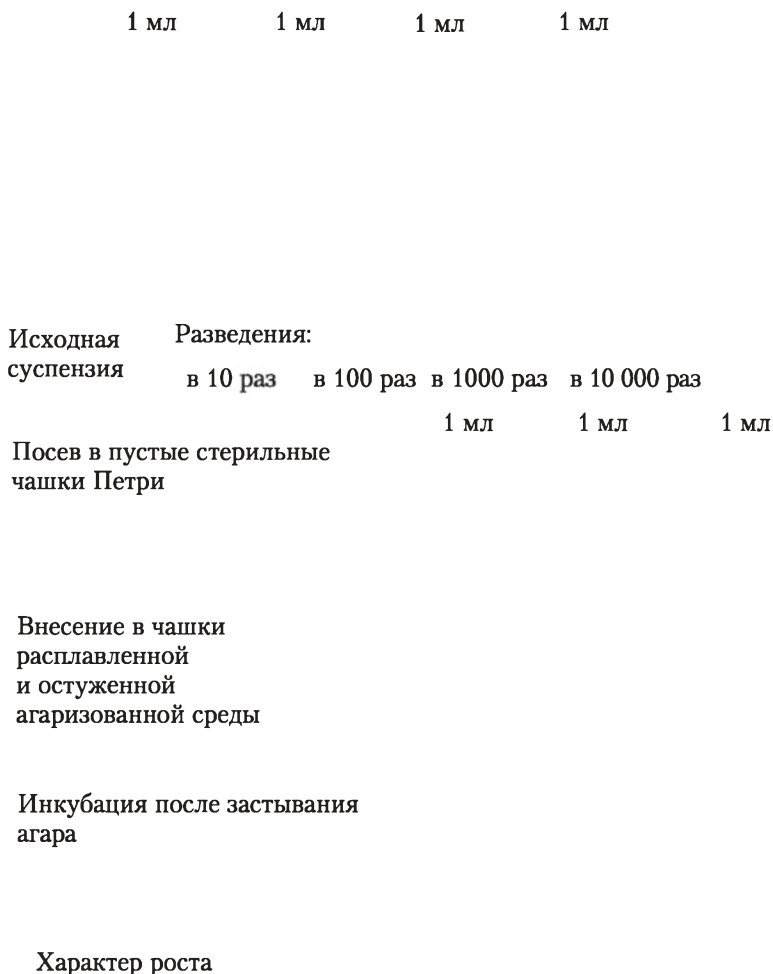


Рис. 5.3. Схема глубинного посева по Коху для получения отдельных колоний

При **периодическом культивировании** в экспоненциальной фазе роста увеличение числа клеток, размножающихся бинарным делением, происходит в геометрической прогрессии: $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$. Если обозначить начальное число клеток как N_0 , количество делений как n , то число клеток через промежуток времени $(t - t_0)$ будет равно $N_t = N_0 \cdot 2^n$. Тогда число делений можно выразить через количество клеток: $n = (\lg N_t - \lg N_0) / \lg 2$.

Константа скорости деления (число удвоений в единицу времени) обозначается v и вычисляется следующим образом: $v = n / (t - t_0) = (\lg N_t - \lg N_0) / [\lg 2 \cdot (t - t_0)]$. Обратной величиной является **время генерации** (промежуток времени, за который число клеток удваивается): $g = (t - t_0) / n = 1 / v$. Важной характеристикой культуры является **константа скорости роста** (удельная скорость роста) μ . При стандартных условиях независимо

от места выращивания конкретная культура имеет совершенно определенную одну и ту же константу скорости роста. Ее вычисляют по формуле $\mu = (\lg N_t - \lg N_0) / [0,4343(t - t_0)]$. Для проведения расчетов принимают некоторые допущения. Микробную культуру рассматривают как саморазмножающуюся систему, а не как набор индивидуальных особей. Считают, что в экспоненциальной фазе роста все клетки физиологически активны и способны к делению. Рост биомассы в этом случае прямо пропорционален увеличению числа клеток.

Для характеристики эффективности процесса используют ряд дополнительных параметров (урожай, экономический и энергетический коэффициенты). Под **урожаем** (или выходом) биомассы понимают разность между максимальной и исходной массой бактерий: $X = X_{\max} - X_0$ (г сухого вещества). Огромное значение имеет **экономический коэффициент**, т.е. отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата: $Y = X/S$ (в г). Применяют также **энергетический коэффициент**: $Y_{\text{АТР}} = X \text{ (г)}/\text{АТР (моль)}$. Для его расчета нужно знать катаболические пути использования данного субстрата.

Если бы рост микроорганизмов не ограничивался доступностью питательных веществ, то через 48 ч микробные клетки образовали бы биомассу, в 150 раз превышающую массу нашей планеты. Быстрее всего из известных микроорганизмов растут фотобактерии, удваивающиеся каждые 8–10 мин. *E. coli* в оптимальных условиях делится через 20 мин. Продуктивность одноклеточных микроорганизмов в 10–100 тыс. раз превышает продуктивность сельскохозяйственных растений и животных (рис. 5.4). Так, корова массой 500 кг за 1 сут. дает привес в 0,5 кг (массу морской свинки), такая же масса сои — 5 кг (массу кошки), в то время как 500 кг дрожжей нарабатывают 50 000 кг (массу 10 слонов).



Рис. 5.4. Продуктивность различных организмов за сутки

5.2. Периодическое и непрерывное культивирование микроорганизмов

5.2.1. Особенности периодического культивирования

Различают два основных способа культивирования микроорганизмов — периодическое и непрерывное. При **периодическом культивировании** клетки помещают в закрытый сосуд определенного объема, содержащий питательную среду, и задают начальные условия. Развитие культуры приводит к постепенной смене условий существования микроорганизмов: увеличивается плотность популяции, снижается концентрация питательных веществ и накапливаются продукты обмена. Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему, которая проходит разные фазы своей жизни (рис. 5.5, *a*).

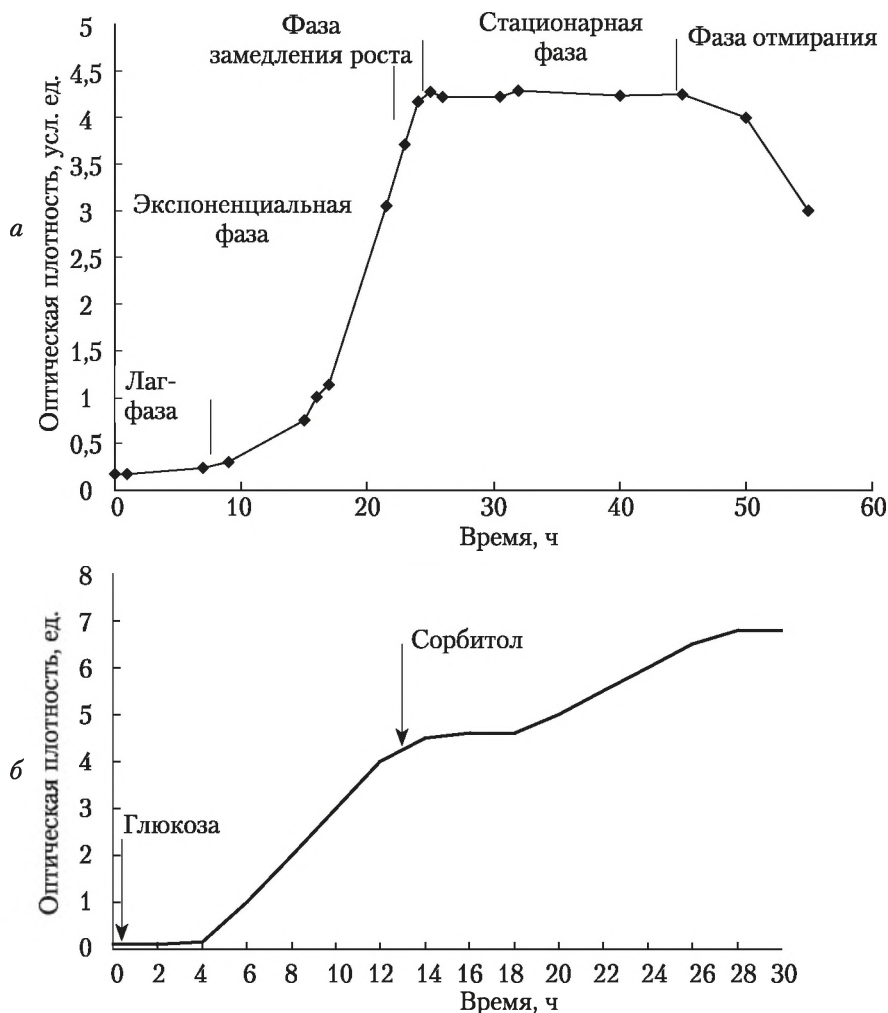


Рис. 5.5. Типичные кривые роста:

a — при периодическом культивировании; *б* — диауксия на среде, содержащей два доступных питательных субстрата

Каждая фаза характеризуется определенными физиологическими параметрами. **Лаг-фаза** — это фаза «привыкания» клеток к среде, при этом происходят увеличение количества ДНК и РНК и индукция синтеза соответствующих ферментов. Лаг-фаза удлиняется, если брать старый посевной материал и переносить клетки в совершенно новую по составу среду. Лаг-фаза сокращается (или может совсем отсутствовать), если активные молодые клетки перенести в свежую среду того же состава и той же температуры. На средах, содержащих смесь субстратов, наблюдается **диауксия**, при которой после исчерпания одного субстрата культура переходит во вторую лаг-фазу для подготовки к потреблению другого субстрата (рис. 5.5, б). 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 исчерпания субстратов и накопления продуктов обмена скорость роста снижается (наступает **фаза замедления роста**) и культура переходит в **стационарную фазу**, в течение которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии, когда процессы деления и отмирания клеток в популяции уравновешены. Для бактерий эта фаза достигается при концентрации в среднем 10^9 клеток/мл, для водорослей и простейших — 10^6 клеток/мл. Когда исчерпание питательных веществ и накопление продуктов метаболизма достигают неких пороговых концентраций, начинается **фаза отмирания** и число клеток в популяции постепенно снижается. Фаза отмирания обычно тоже имеет логарифмический характер.

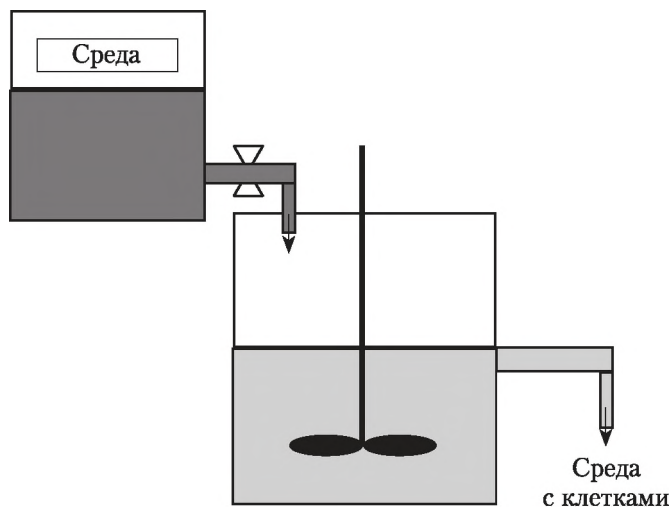
Для проведения расчетов μ принимались некоторые допущения, при которых скорость изменения плотности клеток в саморазмножающейся системе пропорциональна самой плотности, т.е. изменение в экспоненциальной фазе роста следует кинетике реакций первого порядка. Тогда

$$\mu = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt} \text{ и } N = N_0 \cdot e^{\mu t}.$$

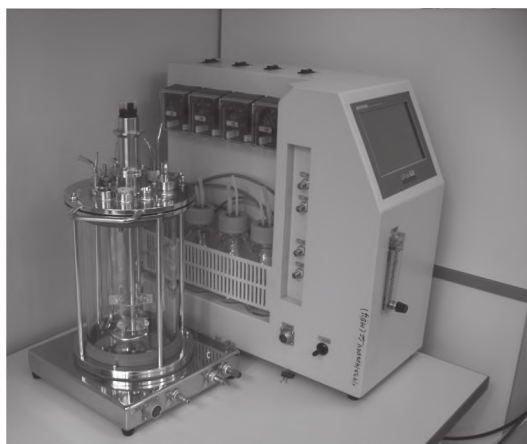
5.2.2. Непрерывное культивирование и его виды

Непрерывное (проточное) культивирование позволяет зафиксировать культуру в какой-то определенной фазе (обычно экспоненциальной). При этом состав среды и условия роста остаются постоянными. Этого добиваются постоянным прибавлением новой питательной среды в сосуд для выращивания и одновременным удалением такого же количества среды с клетками. Простейшая схема проточного ферментера представлена на рис. 5.6, а.

Существуют два принципиально разных типа непрерывных культур — хемостат и турбидостат. При непрерывном культивировании в режиме **хемостата** на постоянном лимитирующем уровне поддерживают какой-нибудь химический параметр процесса (концентрацию субстрата, кислорода и т.д.). Значение этого фактора сдерживает рост микроорганизма и не позволяет ему достичь максимальной скорости роста. Чтобы концентрация клеток в культивационном сосуде оставалась постоянной, отток части популяции должен восполняться приростом культуры. Если объем сосуда



a



б

Рис. 5.6. Проточный ферментер:

a — схема; *б* — лабораторный ферментер

обозначить как V , а скорость подачи свежей среды f , то скорость разбавления это $D = f/V$. Если бы микроорганизмы не росли, то скорость вымывания была бы равна $D_N = -\frac{dN}{dt}$. Плотность бактериальной суспензии снижалась бы экспоненциально: $N_t = N_0 \cdot e^{-Dt}$. Но бактерии одновременно и растут экспоненциально: $N_t = N_0 \cdot e^{\mu t}$, при этом скорость прироста составляет $\mu_N = \frac{dN}{dt}$. Таким образом, скорость изменения плотности суспензии: $\frac{dN}{dt} = \mu_N - D_N$. Для поддержания состояния динамического равновесия в системе скорость прироста должна быть равна скорости вымывания, т.е.

$\mu_N = D_N$. Так как истинная константа μ из-за лимитирования роста недостатком питательного вещества меньше максимальной возможной $\mu_{\max}$, то скорость разбавления можно менять без уменьшения плотности популяции. На увеличение скорости разбавления культура будет «отвечать» усилением роста до тех пор, пока D не превысит $\mu_{\max}$. Зависимость константы скорости роста μ от концентрации субстрата C_s описывается кривой насыщения:

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

где K_s — концентрация субстрата, при которой $\mu = \mu_{\max}/2$. Если истинная константа μ вследствие лимитации по субстрату оказывается меньше $\mu_{\max}$, то скорость разбавления можно менять в широких пределах без того, чтобы это привело к снижению плотности суспензии, однако D не должно превышать $\mu_{\max}$. Уже при небольших концентрациях питательного вещества бактерии растут с достаточно высокой скоростью, а если эта концентрация велика, то $\mu \rightarrow \mu_{\max}$.

При переходе от периодического культивирования к непрерывному в режиме хемостата в зависимости от установленной скорости разбавления плотность клеток и концентрация субстрата будут меняться по-разному (рис. 5.7).

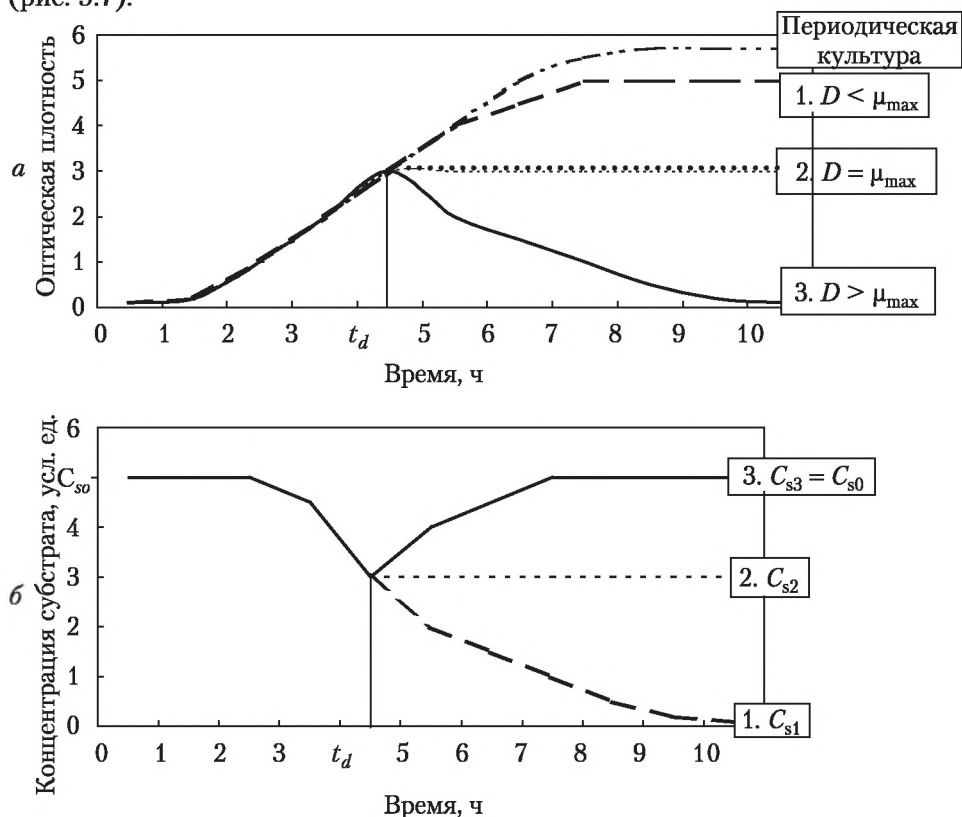


Рис. 5.7. Влияние скорости разбавления (D) при переходе через время t_d от периодического к непрерывному культивированию:

a — на плотность суспензии; b — концентрацию субстрата (C_s)

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.

5.2.3. Сбалансированный и несбалансированный рост, синхронные культуры

При **сбалансированном** росте увеличение всех веществ и структур клеток происходит пропорционально. Рост становится **несбалансированным**, и некоторые продукты метаболизма могут преобладать, если в среде есть нехватка или избыток какого-либо биогенного элемента. В биотехнологии этот прием используют для направленного сверхсинтеза необходимых соединений (например, микробных полисахаридов при резком увеличении соотношения C : N в среде культивирования).

Иногда необходимо, чтобы все клетки в популяции делились одновременно (**синхронно**). Для этого прибегают к различным приемам для получения **синхронных культур**:

- 1) получают клетки одного размера путем фильтрации или дифференциального центрифугирования;
- 2) резко изменяют температуру инкубации;
- 3) воздействуют светом и т.д.

При этом кривая роста выглядит ступенчатой (рис. 5.8).

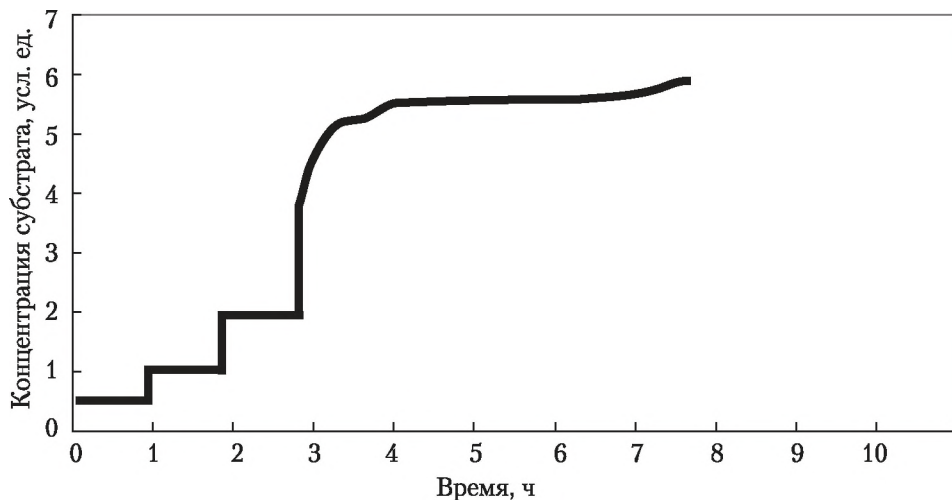


Рис. 5.8. Кривая роста синхронной культуры

Обычно удается синхронизировать не более трех делений, а потом культура снова переходит к асинхронному делению.

5.2.4. Некультивируемое состояние микроорганизмов

Некультивируемое состояние — это особое физиологическое состояние, при котором живые клетки не дают колоний на пригодных для них лабораторных средах. Многие микроорганизмы в природных местообитаниях, наблюдаемые под микроскопом как живые, находятся в некультивируемой форме. Например, возбудители сальмонеллеза и холеры постоянно образуют некультивируемые формы, находясь вне организма человека. Предполагают, что переход в некультивируемое состояние происходит в результате «голодного стресса». Недостаток питательных веществ в природных экосистемах приводит к замедлению метаболических процессов. Механизм перехода в некультивируемую форму и обратно не изучен, но есть данные о том, что этот процесс запрограммирован в геноме микроорганизмов. Некультивируемые формы микроорганизмов в природных образцах изучают путем прямого наблюдения и с помощью методов молекулярного анализа состава нуклеиновых кислот образца.

5.3. Возможности контроля роста микроорганизмов

5.3.1. Классификация антимикробных веществ

Рост микроорганизмов необходимо сдерживать, если их развитие приводит к нежелательным последствиям. Так, микробная активность может вызывать инфекционные заболевания, а также порчу продуктов и материалов. В таких случаях используют **антимикробные агенты**. Как правило, воздействие этих веществ дозозависимое, т.е. чем выше доза, тем сильнее влияние.

Агенты, приводящие к остановке роста микроорганизма или к его уничтожению, называют **бактериостатическими** или **бактерицидными** соответственно.

Один и тот же антимикробный агент может при низкой концентрации оказывать бактериостатическое действие, а при высокой — убивать микроорганизмы. Бактериостатическое действие обратимо: при снижении концентрации или удалении такого антимикробного агента микроорганизм возобновляет свой рост. Для стерилизации следует применять бактерицидные антимикробные агенты с широким спектром действия. Следует помнить, что для некоторых микроорганизмов эти вещества, наоборот, могут быть источниками углерода и энергии.

Все антимикробные агенты для удобства разделяют на несколько групп в соответствии с механизмом их действия.

В первую группу включают вещества, повреждающие поверхностные структуры клетки. Например, бактерицидное действие 70%-го этанола связано с коагуляцией белков. Поверхностно-активные вещества нарушают избирательную проницаемость цитоплазматической мембраны. Некоторые полипептидные антибиотики (полимиксин, бацитрацин, субтилин, низин) образуют в ЦПМ поры, что приводит к «утечке» из клетки полезных метаболитов.

Вторая группа веществ действует как ферментные яды, нарушая пространственную структуру белков и функционирование ферментов. К этой группе относятся тяжелые металлы (медь, ртуть, свинец), связывающиеся с SH-группами белков. Цианид и СО функционируют как дыхательные яды, блокируя цитохромоксидазы. 2,4-динитрофенол является разобщителем процессов окисления и фосфорилирования. Арсенат ингибирует субстратное фосфорилирование. Антимисин А нарушает процесс переноса электронов по дыхательной цепи, ингибируя цитохром *c*-редуктазу. Фторацетат блокирует работу цикла трикарбоновых кислот.

Третья группа — это аналоги нормальных метаболитов, которые конкурируют с ними за каталитический центр фермента. Из-за схожести структуры аналоги могут взаимодействовать с каталитическим центром фермента и занимать место нормального метаболита. Например, сульфаниламид является структурным аналогом пара-аминобензойной кислоты (ПАБК, рис. 5.9).

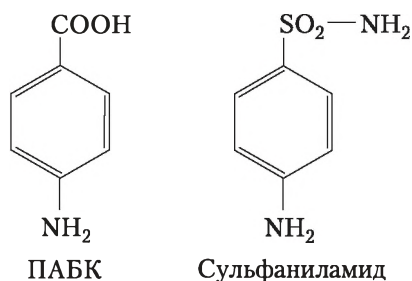


Рис. 5.9. Структурные аналоги

У прокариот ПАБК — это предшественник тетрагидрофолата, переносчика одноуглеродных фрагментов. При включении сульфаниламида вместо ПАБК образуется нефункционирующий фермент, и рост бактерий останавливается. На этом основано лекарственное действие сульфаниламидных препаратов, которые не ингибируют развитие животных клеток, поскольку фолиевая кислота в них *de novo* не синтезируется.

Четвертая группа — это вещества, нарушающие нормальные процессы синтеза биополимеров. Например, многие антибиотики оказывают влияние на разные этапы белкового синтеза. Так, стрептомицин и неомицин подавляют связывание аминокислот между собой, эритромицин нарушает функции 50S-субъединицы рибосом, тетрациклин препятствует связыванию аминоацил-тРНК с рибосомами, а хлорамфеникол подавляет функцию пептидилтрансферазы. Митомицин С, актиномицин Д, рифампицин ингибируют синтез нуклеиновых кислот. Пенициллин и цефалоспорины нарушают процесс образования пептидогликана.

Вещества, оказывающие опосредованное, обычно бактериостатическое действие, относят к пятой группе. Это, например, NaCl и сахароза, в высоких концентрациях замедляющие развитие микроорганизмов из-за снижения активности воды. Такие вещества часто используют при консервировании продуктов.

5.3.2. Антибиотики как особый класс антимикробных агентов

Среди антимикробных агентов важное место занимают антибиотики.

Антибиотики — это особые низкомолекулярные продукты жизнедеятельности клеток, обладающие высокой физиологической активностью.

Их действие направлено против определенной группы микроорганизмов или злокачественных опухолей, т.е. они характеризуются избирательной токсичностью. Каждый антибиотик подавляет или уничтожает определенный набор (спектр) чувствительных к нему организмов. Антибиотики воздействуют на конкретную мишень в клетке и поэтому являются специфическими антимикробными агентами. Действие антибиотиков проявляется уже при очень низких концентрациях (до 10^{-6} г/мл).

К настоящему времени известно более 3000 антибиотиков и только около ста из них нашли применение в медицине. Введение антибиотических препаратов в медицинскую практику в колоссальной мере снизило смертность от инфекционных болезней.

5.3.3. Проблема устойчивости к антимикробным веществам

Наряду с усиленным применением антибиотиков стало появляться все больше болезнетворных микроорганизмов, резистентных к этим соединениям. Распространение устойчивости среди бактерий связывают с «горизонтальным переносом» плазмид резистентности. Эти плазмиды могут нести гены, кодирующие способность к ферментативному расщеплению антибиотиков или к эффективному выбросу их из клетки с помощью мощных транспортных систем. Обмен плазмидами происходит в микробных сообществах постоянно, однако неправильное применение антибиотиков не только по прямому назначению как антимикробных агентов, но и для профилактики, в качестве стимуляторов роста, консервантов и их неконтролируемый «выброс» в окружающую среду существенно повышает его скорость. Неграмотное самолечение, безрецептурная розничная продажа антибиотических препаратов, а также использование медицинских антибиотиков в ветеринарии и защите растений также способствуют нарастанию количества резистентных форм микроорганизмов. В странах с развитой медициной для исключительных случаев имеется целый ряд **антибиотиков «стратегического запаса»**, которые применяют в случае тяжелых заболеваний. При лечении требуется соблюдение строгих мер изоляции больного, сбора и утилизации любых его выделений для того, чтобы антибиотик не попал в окружающую среду и не вызвал появление резистентных к нему форм микроорганизмов.

Как правило, передаваемые плазмиды резистентности несут в себе гены, определяющие устойчивость не к одному, а к целому ряду лекарственных препаратов, т.е. характеризующиеся **множественной лекарственной устойчивостью**. Для ее преодоления проводится постоянный поиск новых антибиотиков, химическая модификация известных молекул и выяснение путей подавления транспортных систем экскреции лекарственных веществ, а также упорядочение использования антибиотических препаратов.

Резюме

Для большинства одноклеточных микроорганизмов понятия «рост» и «развитие» равнозначны и означают увеличение численности популяции. Из-за малых размеров микроорганизмов оценку роста производят не для одной клетки, а для популяции. При этом используют такой показатель, как количество клеток в единице объема. Методы определения числа клеток делятся на прямые и косвенные. Любой метод имеет свои ограничения. При периодическом культивировании в экспоненциальной фазе роста увеличение числа клеток, размножающихся бинарным делением, происходит в геометрической прогрессии. Простейшие параметры для оценки роста культуры — это время генерации, константы скорости роста и скорости деления. Считают, что в экспоненциальной фазе роста все клетки физиологически активны и способны к делению. Рост биомассы в этом случае прямо пропорционален увеличению числа клеток.

Периодическое культивирование предполагает развитие культуры в закрытом сосуде, где заданы начальные условия роста. В процессе роста микроорганизмы последовательно проходят фазы развития, различающиеся физико-химическими и физиолого-биохимическими параметрами. Непрерывное (проточное) культивирование предполагает поддержание условий роста постоянными, что способствует пребыванию культуры в одной фазе роста. Установление динамического равновесия происходит путем уравнивания скоростей удаления части суспензии и роста микробной культуры. Режим хемостата основан на поддержании на постоянном уровне концентрации лимитирующего рост фактора. При культивировании в режиме турбидостата постоянство плотности суспензии микроорганизмов контролирует фотоэлемент. Скорость роста клеток приближена к максимальной, поскольку все питательные вещества подаются в избытке. Скорость протока при этом изменяется автоматически. При сбалансированном росте увеличение всех веществ и структур происходит пропорционально. Рост становится несбалансированным и некоторые продукты метаболизма могут преобладать, если в среде есть нехватка или избыток какого-либо биогенного элемента. Если все клетки в популяции делятся одновременно, то культура называется синхронной.

Многие микроорганизмы в природных местообитаниях находятся в некультивируемой форме и не дают колоний на пригодных для них лабораторных средах. Некультивируемые формы микроорганизмов в образцах изучают путем прямого наблюдения и с помощью методов молекулярного анализа состава нуклеиновых кислот образца.

Для сдерживания роста микроорганизмов используют антимикробные агенты, воздействие которых зависит от дозы. Бактериостатическое действие обратимо. Для стерилизации следует применять бактерицидные антимикробные агенты с широким спектром действия. Первая группа антимикробных агентов включает вещества, повреждающие поверхностные структуры клетки. Вторая группа объединяет ферментные яды. К третьей группе относятся аналоги нормальных метаболитов. Представители четвертой группы нарушают процессы образования биополимеров. Вещества,

оказывающие опосредованное, обычно бактериостатическое действие, относят к пятой группе. Антибиотики являются специфическими антимикробными агентами, имеющими высокую физиологическую активность и избирательную токсичность. Это низкомолекулярные метаболиты клеток, способные в очень низких концентрациях подавлять или убивать определенные группы чувствительных к ним микроорганизмов. За устойчивость к антибиотикам у микроорганизмов ответственны плазмиды резистентности, способные передаваться путем «горизонтального переноса». Неправильное применение антибиотиков приводит к значительному повышению скорости обмена плазмидами и увеличению количества устойчивых к различным лекарственным препаратам микробных форм. Борьба с множественной лекарственной устойчивостью заключается в открытии новых антибиотиков, химической модификации известных препаратов, подавлении систем, выбрасывающих антибиотики из клетки, и целенаправленном использовании антибиотических препаратов в медицине.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Сравните состояние микробной популяции при периодическом и проточном культивировании.
2. Чем опасно пребывание возбудителя заболевания в некультивируемом состоянии?
3. Проанализируйте достоинства и недостатки различных методов определения числа клеток микроорганизмов.
4. Какие допущения мы принимаем для математического описания роста при периодическом культивировании?
5. Сравните удобство и экономичность культивирования в режиме хемостата и турбидостата.
6. Назовите природные антимикробные агенты.
7. Почему для стерилизации нужно применять бактерицидные антимикробные агенты с широким спектром действия?
8. Оцените пользу и вред от применения антибиотиков.

Лабораторная работа 1

Методы количественного учета микроорганизмов

Цель работы: освоить технику подсчета микробных клеток и проанализировать достоинства и недостатки трех наиболее распространенных методов количественного учета микроорганизмов. Метод подсчета клеток в камере Горяева — Тома является прямым методом, а нефелометрический метод и метод высева по Коху относятся к косвенным методам.

Необходимые материалы: горелки или спиртовки, термостат на 30°C, фотоэлектроколориметр (ФЭК), стеклянная кювета с длиной оптического пути 0,5 см, счетные камеры Горяева — Тома, микроскопы с объективами 8X, культура *Saccharomyces cerevisiae* в виде суспензии; среды и растворы (в расчете на 1 студента) — ранее приготовленные 3 широкие пробирки с 20 мл стерильной среды БСА, 100 мл стерильной водопроводной воды в колбе; посуда (в расчете на 1 студента) — 3 стерильные пустые чашки

Петри, 7 стерильных пипеток на 1–2 мл, 1 стерильная пипетка на 10 мл, 3 стерильные пустые узкие пробирки с пробками, 3 стерильных стеклянных шпателя Дригальского.

Занятие 1

Расплавляют в кипящей водяной бане ранее приготовленный БСА в широких пробирках и разливают его в три стерильные чашки Петри около пламени горелки. Оставляют чашки со средой в прохладном месте до полного застывания агара. У пламени горелки с помощью пипетки на 10 мл разливают стерильно водопроводную воду из колбы по 9 мл в 3 узкие пробирки. Готовят разведения исходной культуры *Saccharomyces cerevisiae*, полученной от преподавателя, в 10 и 100 раз в стерильной водопроводной воде. Для этого стерильной пипеткой 1 мл исходной культуры вносят в пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Суспензию этого разведения (в 10 раз) тщательно перемешивают с помощью новой стерильной пипетки, вбирая в пипетку и выпуская из нее полученную взвесь. Эту процедуру повторяют 3–5 раз, что обеспечивает перемешивание суспензии и уменьшает адсорбцию клеток на стенках пипетки. Затем новой стерильной пипеткой берут 1 мл суспензии полученного разведения и переносят во вторую пробирку, получая второе разведение (в 100 раз). После того, как среда в чашках застынет, производят посев исходной культуры и полученных разведений, нанося каждый раз новой стерильной пипеткой по 0,1 мл тщательно размешанных суспензий на поверхность агаровых пластинок в чашках Петри. По поверхности агаризованной среды посевной материал распределяют стерильным шпателем Дригальского, беря каждый раз новый стерильный шпатель. Чашки Петри, засеянные микроорганизмами, помещают в термостат (30°C) и инкубируют крышками вниз в течение 3–5 сут.

Параллельно в тех же суспензиях нефелометрически на ФЭК определяют плотность клеток *S. cerevisiae*, используя кювету с длиной оптического пути 0,5 см и зеленый светофильтр ($\lambda = 540$ нм). Контролем служит водопроводная вода. Для получения достоверных результатов плотность клеток должна быть в пределах 0,1–0,6, так как при оптической плотности выше 0,6 происходит вторичное рассеяние света, что приводит к получению заниженных результатов. Поэтому суспензии больших плотностей перед измерением мутности следует разводить водой в 2, 4, 6, 8 и 10 раз. Результаты измерений оптической плотности каждой суспензии записывают в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Измерение плотности суспензии дрожжей *S. cerevisiae* с помощью разных методов

№ суспензии	Разведение, раз	Показания ФЭК, усл. ед.	Камера Горяева – Тома, кл/мл	Метод посева по Коху, кл/мл
1	Без разведения			
2	10			
3	100			

Подсчитывают количество клеток в 1 мл тех же суспензий, пользуясь счетной камерой Горяева — Тома. Притирают покровное стекло камеры к прямоугольным площадкам, окружающим площадку с нанесенными сеточками, до появления колец Ньютона. Затем пипеткой с тонким носиком вносят изучаемую суспензию в щель между покровным и предметным стеклами камеры. Жидкость должна распределиться равномерно, заполнив все пространство под покровным стеклом без пузырьков воздуха. Камеру кладут на предметный столик микроскопа и фокусируют сеточку при увеличении 8X. Подсчитывают клетки дрожжей в больших квадратах сетки (не менее 20 разных квадратов, общее число подсчитанных клеток должно быть 600 и более). Количество клеток в 1 мл соответствующей суспензии рассчитывают по формуле

$$M = 1000 \cdot a \cdot n / (h \cdot S),$$

где M — число клеток в 1 мл суспензии; a — среднее число клеток в большом квадрате сетки; n — разведение суспензии; h — глубина камеры (1/10 мм); S — площадь большого квадрата сетки (1/25 мм²); 1000 мм³ — 1 мл.

Полученные результаты, выраженные в млн клеток в 1 мл, записывают в табл. 5.1.

Занятие 2

По завершении инкубации подсчитывают число колоний *S. cerevisiae* в чашках Петри и делают пересчет для определения общего числа живых клеток (колониеобразующих единиц, КОЕ) в 1 мл суспензии по формуле

$$M = a \cdot n / V,$$

где M — число клеток в 1 мл суспензии; a — среднее число колоний на чашке при высеве данного разведения; n — разведение суспензии; V — объем суспензии, взятой для посева.

Результаты записывают в табл. 5.1. Данные табл. 5.1 используют для построения калибровочной кривой, откладывая по оси абсцисс количество клеток дрожжей, определенное подсчетом в камере Горяева — Тома, а по оси ординат — показания оптической плотности соответствующей суспензии. Калибровочная кривая применяется для быстрого определения количества клеток определенной культуры по показаниям ФЭК. Сравнивают количество клеток дрожжей в 1 мл, определенное подсчетом в камере Горяева — Тома и методом Коха. Делают вывод о соотношении живых и мертвых клеток дрожжей в исходной суспензии.

Раздел II

МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ



Глава 6

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ И ОСОБЕННОСТИ МИКРОБНОГО ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности питания различных микроорганизмов;

уметь

- объяснить различия в обмене веществ представителей разных групп микроорганизмов;

владеть

- навыками постановки накопительных культур для выделения микроорганизмов различных физиологических групп.
-

6.1. Деление микроорганизмов по отношению к количеству и качеству питательных веществ. Типы питания

6.1.1. Основные термины

Способы питания микроорганизмов отличаются большим разнообразием. Обмен веществ микроорганизма (**метаболизм**) — это совокупность химических реакций, обеспечивающих поддержание, развитие и увеличение количества клеток. Реакции, приводящие к расщеплению и окислению веществ с получением энергии, называют **катаболизмом (энергетическим обменом)**. Пути, обеспечивающие синтез основных сложных веществ, относят к **анаболизму (конструктивному или пластическому обмену)**. Промежуточные реакции, перестройки одних веществ в другие, называют **амфиболизмом**.

6.1.2. Олиготрофы и копиотрофы

Микроорганизмы предъявляют разные требования к количеству питательного субстрата в среде обитания. **Олиготрофы** растут только при низких концентрациях углеродсодержащих питательных веществ (от долей до 100 мг в л), а обычные концентрации лимитируют их рост (от 1 до 100 г в л). Данные концентрации характерны для микроорганизмов-**копиотрофов**. Истинно олиготрофными считаются организмы, эволюционно приспособленные к эксплуатации экониш с постоянно низкими потоками углерода и энергии. Такой рост обеспечивается высокоэффективными транспортными системами и экономным расходом полученного вещества и энергии. Характерными особенностями метаболизма олиготрофов считают их малые размеры, высокое соотношение поверхности клетки к ее

объему, образование различных выростов, отсутствие покоящихся стадий, низкие скорости эндогенного метаболизма, аэробность, высокое сродство ферментов к субстрату, широкую субстратную специфичность их транспортных систем, способных к одновременному поглощению всех доступных субстратов, высокую гибкость катаболизма, способность к накоплению резервных веществ, низкие скорости роста в оптимальных условиях и регуляцию анаболизма скоростью поглощения веществ.

6.1.3. Гидролитики и диссипотрофы

По способности использовать биологические полимеры, часто нерастворимые в воде, микроорганизмы подразделяют на функциональные группы гидролитиков и диссипотрофов. **Гидролитики** обладают мощными гидролазами, разрушающими высокомолекулярные соединения. Они обеспечивают доступными субстратами себя и микроорганизмы, не имеющие гидролаз, а также способствуют возвращению биогенных элементов в глобальные циклы. **Диссипотрофы** (микрофлора рассеяния) не имеют экзогидролаз и потребляют те вещества, которые по тем или иным причинам остались неиспользованными гидролитиками («рассеялись» в окружающей среде) и имеются в незначительных количествах.

6.1.4. Типы питания

По способности выполнять определенные функции микроорганизмы делятся на **физиологические (функциональные) группы**. Функциональные возможности конкретного микроорганизма зависят от наличия у него набора катаболических и анаболических реакций. Способы питания микроорганизмов чрезвычайно разнообразны. Чтобы сравнивать функциональные возможности микробных культур, в качестве основных признаков при определении типа питания (трофии) в микробиологии принято характеризовать источники энергии и углерода для синтезов и донор электронов (окисляемое вещество). Источниками энергии для микроорганизмов могут быть свет или восстановленные химические соединения. Микроорганизмы, живущие за счет энергии света и преобразовывающие ее в макроэргические связи молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), называются **фототрофами**. Этот процесс носит название фотосинтеза. **Хемотрофы** используют для синтеза АТФ энергию химических связей. Такой процесс называют хемосинтезом. Термины «фотосинтез» и «хемосинтез» обозначают только процессы образования энергоемких соединений (АТФ, восстановительных эквивалентов), хотя часто их применяют в более широком смысле, подразумевая еще и последующее использование АТФ для построения органических соединений из CO_2 . **Органотрофы** в качестве донора электронов используют органическое вещество, а **литотрофы** — неорганическое. Микроорганизмы, использующие в качестве источника углерода в конструктивном обмене углерод углекислого газа, носят название **автотрофов**, а использующие готовые органические вещества — **гетеротрофов**. Углекислый газ они могут использовать как дополнительный источник углерода при гетеротрофной фиксации CO_2 , однако осуществлять биосинтезы только за счет этого процесса гетеротрофы не способны. Обычно гете-

ротрофная фиксация CO₂ поставляет до 10% от всего ассимилированного углерода. Для более полного обозначения типа обмена веществ применяют составной термин, первая часть которого обозначает природу источника энергии (фото- или хемо-), вторая указывает на донор электронов (лито- или органо-), а третья говорит об источнике углерода для конструктивного обмена (авто- или гетеро-). Комбинация этих признаков дает восемь вариантов типов питания (табл. 6.1).

Таблица 6.1

Типы питания микроорганизмов

Источ- ник энергии	Донор электронов	Источник углерода	
		Органические вещества	CO ₂
Свет	Органические вещества	Фотоорганогетеротрофия	Фотоорганоавтотрофия
	Неорганические вещества	Фотолитогетеротрофия	Фотолитоавтотрофия
Энергия хими- ческих связей	Органические вещества	Хемоорганогетеротрофия	Хемоорганоавтотрофия
	Неорганические вещества	Хемолитогетеротрофия	Хемолитоавтотрофия

Из них наиболее распространены **хемоорганогетеротрофия** и **фотолитоавтотрофия**. В первом случае готовые органические вещества окисляются для получения энергии и используются как источник углерода в конструктивном метаболизме. Этим типом трофии обладают все животные и микроорганизмы-деструкторы, ответственные за разрушение сложных органических веществ в природе. Фотолитоавтотрофы образуют органические вещества из углекислого газа за счет использования световой энергии и неорганических соединений как доноров электронов. Такой тип питания осуществляют высшие растения, водоросли и цианобактерии, у которых донором электронов при фотосинтезе служит вода. Пурпурные и зеленые серные бактерии, относящиеся к группе фотолитоавтотрофов, в качестве донора электронов могут использовать восстановленные неорганические соединения серы и железа. **Фотолитогетеротрофия** характерна для некоторых зеленых бактерий и гелиобактерий, которые нуждаются в органических веществах для конструктивного обмена, а энергию для роста получают в процессе фотосинтеза с неорганическими донорами электронов (соединениями серы). **Хемолитогетеротрофы** получают энергию и электроны при окислении неорганических веществ (например, молекулярного водорода), а для построения структур клетки требуют присутствия готовых органических соединений. В эту группу входят многие сульфатредукторы. Несерные пурпурные бактерии, осуществляющие фотосинтез с органическими веществами в качестве доноров электронов и использующие готовые органические соединения для биосинтезов, являются **фотоорганогетеротрофами**. Уникальным образом жизни, свойственным только прокариотам,

является открытая С. Н. Виноградским **хемолитоавтотрофия**, при которой энергию и электроны микроорганизмы получают при окислении неорганических соединений, далее они идут на синтез органических веществ из углекислого газа. Способностью к хемолитоавтотрофии обладают тионовые, нитрифицирующие бактерии и некоторые водородные и железобактерии. Наиболее редкими типами питания считаются **хемоорганавтотрофия** и **фотоорганавтотрофия**. В этих случаях при хемо- или фотосинтезе окисляются органические вещества, которые не могут быть использованы в конструктивном метаболизме. Обычно это чуждые природе соединения (**ксенобиотики**) или неусваиваемые вещества. По этой причине микроорганизму приходится осуществлять энергозатратные реакции восстановления углерода CO_2 до уровня органического вещества и использовать в анаболизме это вновь синтезированное вещество.

Таким образом, высшие животные и растения способны только к хемоорганогетеротрофии и фотолитоавтотрофии соответственно, тогда как у микроорганизмов представлены все типы метаболизма, к тому же многие из них способны к переключению на другой тип питания в зависимости от условий существования.

Приведенная общепринятая классификация не исчерпывает всего многообразия способов метаболизма микроорганизмов. Во-первых, она учитывает только источник одного из биогенных элементов — углерода. Однако жизнь невозможна без остальных биогенных элементов. Во-вторых, перечисленные типы питания могут осуществляться как в аэробных, так и в анаэробных условиях. В-третьих, прокариоты способны использовать также разнообразные акцепторы электронов. Это могут быть помимо молекулярного кислорода окисленные формы неорганических и органических соединений, в том числе ионы трехвалентного железа, углекислый газ, элементарная сера, нитрат, сульфат, фумарат.

6.1.5. Миксотрофия

Установлено, что некоторые микроорганизмы проявляют способность к **миксотрофии**, т.е. смешанному типу питания. Под этим термином понимают как одновременное использование автотрофного и гетеротрофного путей ассимиляции углерода, так и параллельное окисление неорганических и органических соединений для получения энергии. Например, у некоторых сульфобацилл, способных осуществлять отдельно автотрофный или гетеротрофный обмен, максимальный уровень АТФ в клетках обеспечивается миксотрофным ростом, при котором донорами электронов в аэробных условиях служат Fe(II) , S^0 и органические вещества, а источниками углерода являются как готовые органические соединения, так и углекислый газ, фиксируемый в цикле Кальвина. Есть данные о способности к миксотрофии у некоторых цианобактерий. Наличие миксотрофного обмена объясняют «напряженностью» энергетического метаболизма в случае окисления только неорганических веществ (литотрофного роста), когда микроорганизм вынужден «добирать» энергию, используя еще и органические соединения. С другой стороны, одной из причин невозможности длительного гетеротрофного существования считают малую эффектив-

ность работы транспортных систем, переносящих в клетку органические соединения, что приводит к необходимости использовать дополнительно неорганические доноры электронов и автотрофно фиксировать CO_2 .

6.2. Проникновение веществ в клетки микроорганизмов

Использование того или иного вещества в метаболизме предполагает его проникновение внутрь клетки. У микроорганизмов-прокариот, грибов и водорослей вещества проникают в клетку только в растворенном в воде состоянии. Некоторые простейшие способны поглощать из окружающей среды нерастворенные вещества в виде твердых кусочков или капель жидкостей, не смешивающихся с водой. При **эндоцитозе** (рис. 6.1) участок ЦПМ втягивается внутрь и замыкается вокруг частицы пищи, образуя вакуоль. Внутри клетки вакуоль сливается с лизосомой, содержащей набор гидролитических ферментов. В образовавшейся пищеварительной вакуоли происходит лизис частицы пищи.

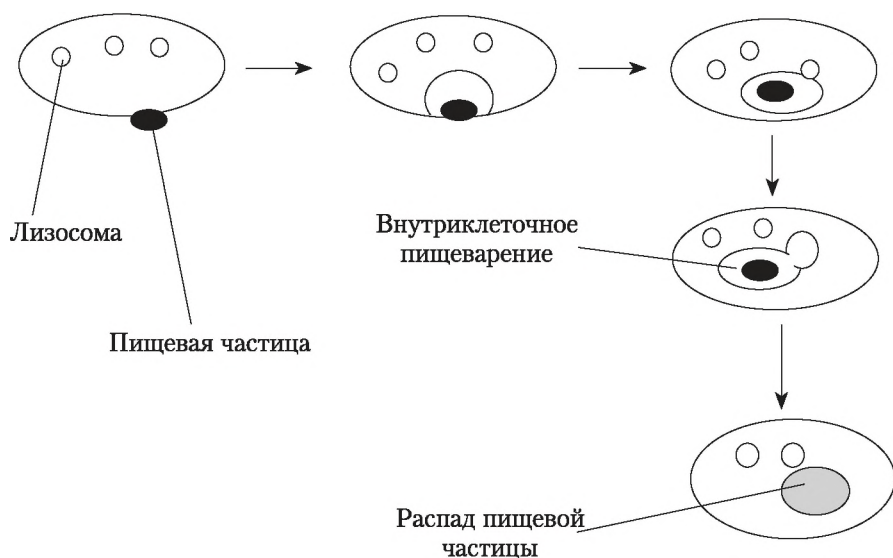


Рис. 6.1. Схема эндоцитоза

Растворимые продукты гидролиза диффундируют в цитоплазму, а неразрушенные остатки могут выбрасываться наружу путем обратного эндоцитозу. У высших животных эндоцитоз осуществляется при поглощении чужеродных клеток фагоцитами, а обратный эндоцитозу процесс — при выделении 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 **экзогидролазами**. Они выделяются во внешнюю среду или располагаются на наружной стороне ЦПМ. У грамотрицательных бактерий эти ферменты могут быть локализованы в периплазматическом пространстве. Высоко-

молекулярные вещества в этом случае проникают в их периплазму через поры, образованные белками-поринами, находящимися в наружной мембране.

У микроорганизмов имеется несколько разных способов поступления веществ в клетку. Все незаряженные молекулы (H_2O , газы) могут поступать в клетку путем **пассивной диффузии**, которая идет с невысокой скоростью и не требует энергетических затрат. Вещество поступает в клетку до тех пор, пока не сравняются его концентрации вне и внутри клетки. Скорость значительно увеличивается при участии специфических белков-переносчиков (пермеаз), и тогда процесс носит название **облегченной диффузии**. Облегченная диффузия также протекает без затрат энергии и продолжается до выравнивания концентраций.

Пермеазы — это белковые комплексы, расположенные либо поперек мембраны, либо способные передвигаться через мембрану как в свободном, так и в связанном с транспортируемым веществом состоянии.

Многие вещества проникают в клетку при участии пермеаз, например, имеются неспецифические пермеазы для всех катионов. Эукариотические клетки путем облегченной диффузии транспортируют различные сахара и аминокислоты, бактерии кишечной группы — глицерол. Экскреция продуктов метаболизма у микроорганизмов тоже, как правило, происходит путем облегченной диффузии.

Для транспорта катионов железа аэробные микроорганизмы имеют особые переносчики — **сидерофоры**. Наиболее распространенной группой сидерофоров являются гидроксаматы (рис. 6.2). Для снабжения двухвалентным железом, которое неустойчиво в присутствии кислорода, сидерофоры вне клетки ковалентно привязывают к себе Fe^{3+} и, продвигаясь через мембрану, восстанавливают его до Fe^{2+} .

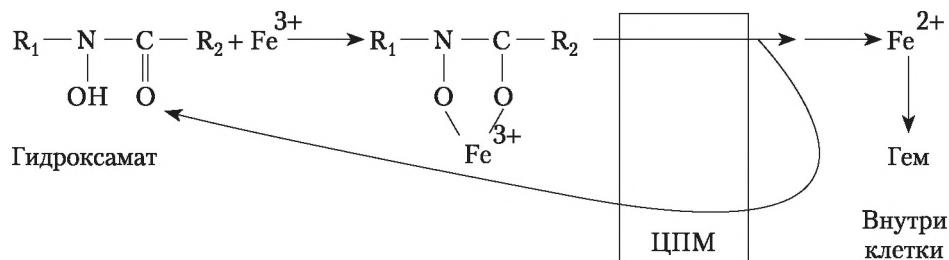


Рис. 6.2. Транспорт ионов железа гидроксаматом

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 сразу поступает на синтез гемов или железосерных белков. Если в среде много Fe^{3+} , то сидерофоры находятся на поверхности или внутри мембраны, а если мало, то они выделяются во внешнюю среду и концентрируют катионы Fe^{3+} на себя. Среди анаэробных микроорганизмов сидерофоры находят нечасто, так как в бескислородных условиях нет дефицита Fe^{2+} . У высших организмов в слюне, крови и слезной жидкости обнаружены сидерофоры,

Микроорганизмы, которые часто живут в бедных средах, вынуждены добывать питательные вещества из разбавленных растворов. Продвижение веществ из среды с меньшей концентрацией в среду с большей концентрацией происходит благодаря механизмам **активного транспорта**. При работе многих ферментов, встроенных в ЦПМ, происходит выброс протонов во внешнюю среду и образуется разница концентрации протонов вне и внутри клетки (**трансмембранный градиент протонов**). Этот процесс носит название **первичного транспорта**. За счет него работают все виды **вторичного транспорта**, требующие затраты метаболической энергии. У микроорганизмов известно несколько видов вторичного транспорта (рис. 6.3).



При **симпорте** в одном направлении переносятся одновременно два вещества, при **унипорте** — одно, а **антипорт** предполагает движение двух веществ в противоположных направлениях. При переносе заряженных веществ через мембрану в зависимости от компенсации заряда может происходить электронейтральный или электрогенный процесс. Прокариоты с помощью электронейтрального симпорта переносят 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 активного транспорта отличается от всех прочих тем, что вещество проникает внутрь клетки в модифицированном (химически измененном) виде. Так транспортируются многие сахара, пурины и пиримидины у про- и эукариот. Перенос фосфатной группы осуществляется от некоторых макроэргических соединений (фосфоенолпирувата, фосфорибозилпирофосфата). Системы транслокации групп имеют в своем составе как неспецифичные (E1 и HPr), так и особые, индуцибельные для каждого переносимого вещества компоненты (E2 и E3).

Грамотрицательные микроорганизмы из-за наличия наружной мембраны имеют дополнительные компоненты транспортных систем для переноса вещества через периплазматическое пространство (**связывающие белки**). Они образуют комплекс с веществом и переносят его через периплазматическое пространство на пермеазы, которые с затратой энергии осуществляют транспорт внутрь клетки (рис. 6.4). Обычно используется энергия в форме АТФ, но могут участвовать и другие соединения с макроэргическими связями.

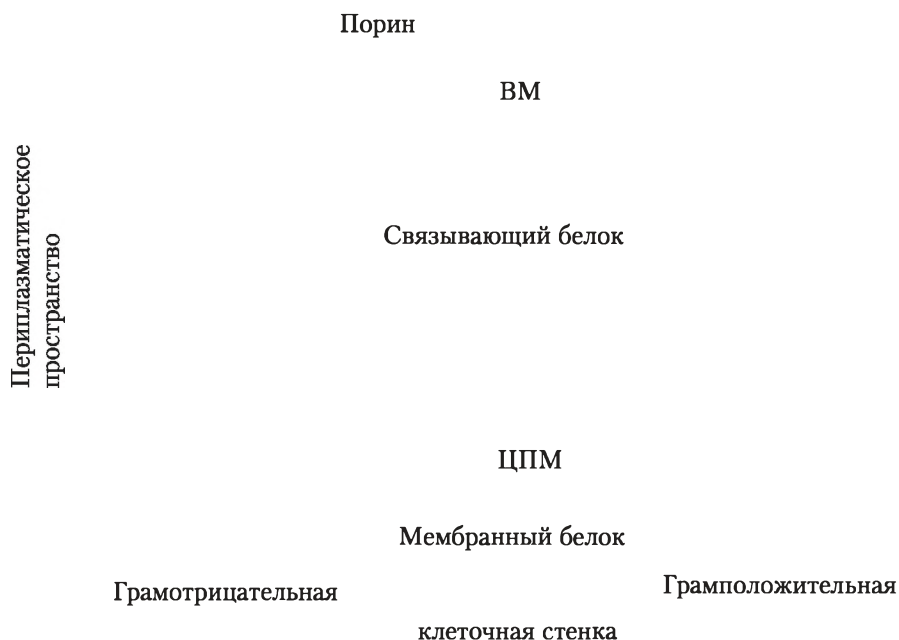


Рис. 6.4. Транспортные системы с участием связывающих белков

Транспортные системы с участием связывающих белков встречаются и у грамположительных микроорганизмов, но тогда связывающие белки «заякорены» N-концевой частью в ЦПМ.

Наличие у микроорганизмов высокоактивных систем экскреции является одной из причин их устойчивости к различным ксенобиотикам и лекарственным препаратам. Быстрый выброс этих веществ из клетки не позволяет создать в цитоплазме их высокую действующую концентрацию. Из-за способности микроорганизмов к латеральной передаче генов такой тип устойчивости быстро распространяется.

6.3. Единство метаболизма и его особенности у микроорганизмов

6.3.1. Принцип биохимического единства

Энергодающие и пластические биохимические пути в клетке тесно связаны и зависят друг от друга. Вещества, проникшие внутрь клетки, могут быть использованы для получения энергии или преобразованы в строительные блоки для синтеза собственных сложных соединений. Возможности добывания энергии и построения структур клетки у микроорганизмов значительно превосходят возможности высших организмов. В то же время на уровне клетки метаболизм всех живых существ на Земле подчиняется **принципу биохимического единства**, сформулированному голландским ученым А. Клейвером. В соответствии с ним все земные организмы обладают единообразными «строительными блоками», единой «энергетической валютой» (АТФ), универсальным генетическим кодом и в основе своей идентичными главными метаболическими путями. Таким образом, для всего живого на Земле биохимические механизмы и инструменты универсальны. Это позволяет изучать фундаментальные законы функционирования всех, в том числе высокоорганизованных, существ, используя в качестве моделей более простые по строению прокариотические клетки.

Основой энергодающих процессов является свободная энергия, высвобождаемая в ходе окислительно-восстановительных реакций. В ходе **окислительно-восстановительных реакций** электроны отрываются от одного соединения (окисляемого вещества, восстановителя, **донора электронов**) и присоединяются к другому (восстанавливаемому веществу, окислителю, **акцептору электронов**). Связь стандартной свободной энергии реакции ($\Delta G^{\circ'}$) и разности стандартных окислительно-восстановительных потенциалов ($\Delta E'_0$) донора и акцептора электронов показывает уравнение

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

где n — число перенесенных электронов; F — постоянная Фарадея.

Стандартными считают физиологические условия (рН 7,0, давление 1 атм). Изменение стандартной свободной энергии можно также определить как разность свободных энергий исходных веществ и продуктов реакции. Направление течения реакции показывает знак $\Delta G^{\circ'}$. Если этот параметр имеет отрицательное значение, то реакция идет в сторону продуктов. Сдвигу реакции в эту сторону способствует удаление продуктов в виде газов и нерастворимых веществ, а также с помощью других микроорганизмов.

6.3.2. АТФ — универсальная энергетическая валюта

Для осуществления реакций, требующих затрат энергии, в клетке синтезируются молекулы АТФ, обладающие двумя макроэргическими связями (рис. 6.5).

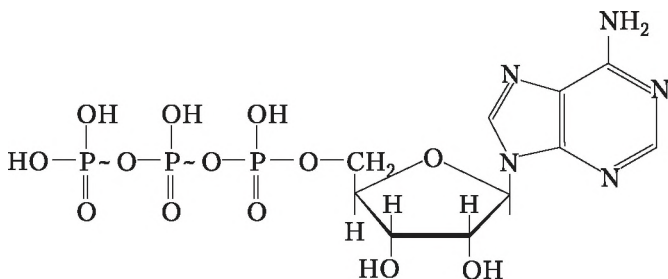


Рис. 6.5. Структура АТФ

Эти богатые энергией связи образуются за счет свободной энергии окислительно-восстановительных реакций. Молекулы АТФ крайне реакционноспособны, так как при отщеплении одной макроэргической связи получается около 32 кДж свободной энергии. АТФ служит универсальным переносчиком энергии, способным переводить множество химических соединений в активированную форму. Существуют и другие молекулы с макроэргическими связями — это пирогосфат ($\Phi\Phi_n$), фосфоенолпируват ($\Phi\text{ЕП}$), креатинфосфат, ацетил-КоА, другие нуклеотиди- и трифосфаты ($\Gamma\text{ТФ}$, ЦТФ и т.д.). Энергия может также запасаться в виде энергизованного состояния мембраны или трансмембранного потенциала ($\Delta\mu\text{H}^+$). Непосредственно за счет **трансмембранного потенциала** возможен транспорт веществ в клетку, движение жгутиков и образование АТФ, однако для сложных органических синтезов энергия требуется именно в виде молекул АТФ. Существуют два принципиально разных пути синтеза АТФ в клетке. При **субстратном фосфорилировании** макроэргическая связь с промежуточного соединения катаболизма переносится на АДФ в соответствии с реакцией $\text{S}-\Phi + \text{АДФ} = \text{S} + \text{АТФ}$. Образование такого фосфорилированного промежуточного соединения происходит путем его активирования под действием ферментных систем клетки. Наиболее часто встречаются следующие реакции субстратного фосфорилирования:

- а) 1,3-дифосфоглицериновая кислота ($\Phi\text{ГК}$) + АДФ $\rightarrow$ 3- $\Phi\text{ГК}$ + АТФ;
 - б) $\Phi\text{ЕП}$ + АДФ $\rightarrow$ пируват + АТФ;
 - в) Ацил- Φ (ацетил- Φ) + АДФ $\rightarrow$ органическая кислота (ацетат) + АТФ.
- Субстратное фосфорилирование осуществляется в цитоплазме.

При **мембранном фосфорилировании** синтез АТФ происходит на мембране за счет энергии трансмембранного потенциала и связан с переносом электронов по **электронтранспортной цепи (ЭТЦ)**. Такой способ получения АТФ характерен для процессов дыхания (**окислительное фосфорилирование**) и фотосинтеза (**фотофосфорилирование**).

При биологическом окислении только часть метаболической энергии может запасаться в виде макроэргических связей. Другая часть ее рассеивается в окружающей среде в виде тепла или света. При этом в ряде слу-

чаев происходит саморазогрев органического материала или наблюдается биолюминесценция.

6.3.3. ЭТЦ и ее компоненты

Постепенное окисление субстрата достигается путем движения электронов от донора к акцептору через ряд последовательно работающих переносчиков. Переносчики должны располагаться в мембране ассиметрично и последовательно, в соответствии со своими окислительно-восстановительными потенциалами (табл. 6.2).

Таблица 6.2

Окислительно-восстановительные потенциалы наиболее важных пар

Переносчик	Окислительно-восстановительный потенциал, мВ
CO ₂ /формат	-432
2H ⁺ /H ₂	-420
Ферредоксин _{окисл./восстан.}	-390
НАД(Ф) ⁺ /НАД(Ф)Н	-320
ФАД/ФАДН ₂	-220
ФМН _{окисл./ФМНвосстан.}	-220
Пируват/лактат	-190
Менахинон _{окисл./восстановл.}	-74
Убихинон _{окисл./восстановл.}	+100
Цитохромы <i>b, c, a</i> (окисл. формы)/цитохромы <i>b, c, a</i> (восстан. формы)	От +70 до +290
O ₂ /H ₂ O	+810

Окислительно-восстановительным потенциалом (ОВП, Rh) называют напряжение в милливольтх (вольтах), необходимое для отрыва электрона от данного соединения. Его измеряют относительно стандартного потенциала водородного электрода, равного при физиологических условиях (рН 7,0 и 25°С) -420 мВ (-0,42 В). Переносчики имеют свойство к обратимому окислению-восстановлению. Каждый организм обладает индивидуальным набором переносчиков. В соответствии со своими ОВП переносчики расположатся в ЭТЦ так:



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 — это тоже небольшие молекулы, но они не отделяются от белка во время присоединения и переноса субстрата. Многие такие соединения являются производными витаминов (табл. 6.3), поэтому если микроорганизм не способен сам синтезировать некоторые из них, то это вещество или его предшественник необходимо добавлять в питательную среду.

Таблица 6.3

Коферменты или простетические группы 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, парааминобензойная кислота (ПАБК)
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

Как правило, при окислении вещества происходит дегидрогенирование, когда два электрона удаляются вместе с двумя протонами. Восстановление вещества — это присоединение двух атомов водорода или гидрогенирование. Посредниками в таких реакциях (**восстановительными эквивалентами**) чаще всего являются пиридиннуклеотиды. Реакции восстановления необходимы, например, тогда, когда углерод входит в реакции анаболизма в более окисленной форме, чем сахара (в виде органических кислот, СО₂). Восстановительными эквивалентами в таких реакциях чаще всего служат пиридиннуклеотиды (рис. 6.6).

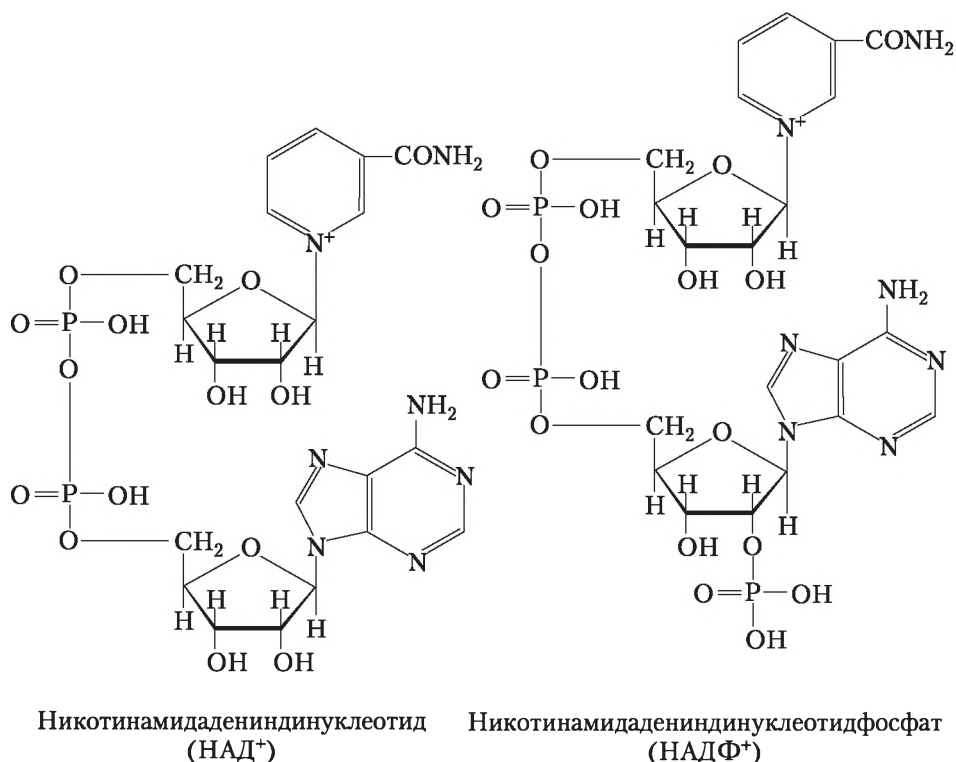


Рис. 6.6. Структура пиридиннуклеотидов

Никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и его фосфорилированная форма (НАДФН) могут также быть переносчиками электронов и протонов, участвующими в работе ЭТЦ.

Другими компонентами ЭТЦ являются **флавопротеиды (ФП)** и **цитохромы (цит)**. Флавопротеиды имеют в своем составе желтые простетические группы — **флавиномононуклеотид (ФМН)** и **флавинадениндинуклеотид (ФАД)** (рис. 6.7).

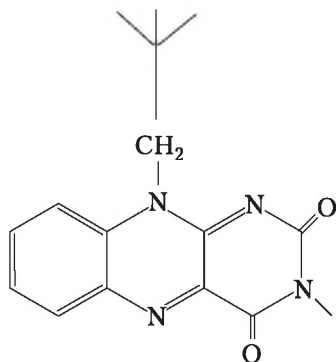


Рис. 6.7. Структура флавина

Цитохромы содержат простетическую группу в виде циклического тетрапиррола с атомом железа (рис. 6.8) и относятся к гемопротеидам.

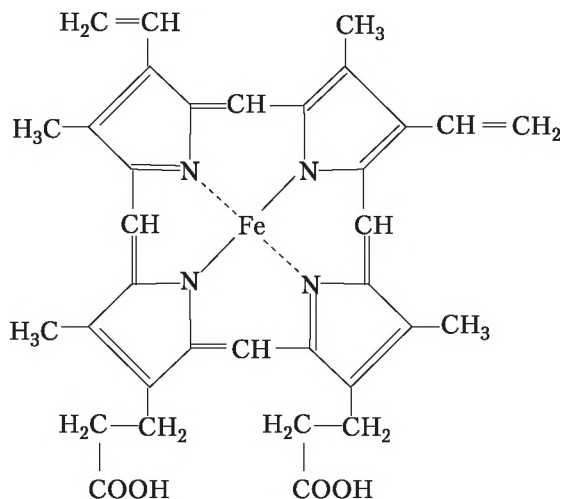


Рис. 6.8. Структура гема

Промежуточными переносчиками между флавопротеинами и цитохромами служат **хиноны**, небольшие небелковые молекулы (рис. 6.9).

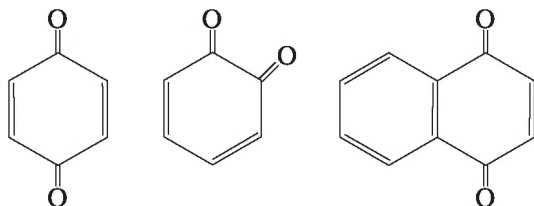


Рис. 6.9. Структура хинонов

ЭТЦ прокариот располагается в ЦПМ или ее выростах, а эукариот — в мембранах митохондрий и хлоропластов. Переносчики лежат ассиметрично, по разные стороны мембраны (рис. 6.10). При переносе электрона одновременно происходит и транслокация протона, который высвобождается на внешней стороне мембраны. При дыхании донором электронов является молекула окисляемого питательного вещества, а при фотофосфорилировании — возбужденная светом молекула фотосинтетического пигмента.

Поскольку мембрана мало проницаема для протонов, то во внешней среде их становится больше и образуется **трансмембранный градиент протонов** (наводится **трансмембранный потенциал**). Из-за заряженности протонов трансмембранный потенциал включает наряду с концентрационной и электрическую составляющую: $\Delta\mu\text{H}^+ = \Delta\psi + \Delta p\text{H}$ (может быть $\Delta p\text{Na}$). В мембране в определенных местах (**пунктах сопряжения**), где перепад составляет 150–300 мВ, рядом с переносчиками располагается АТФ-азная

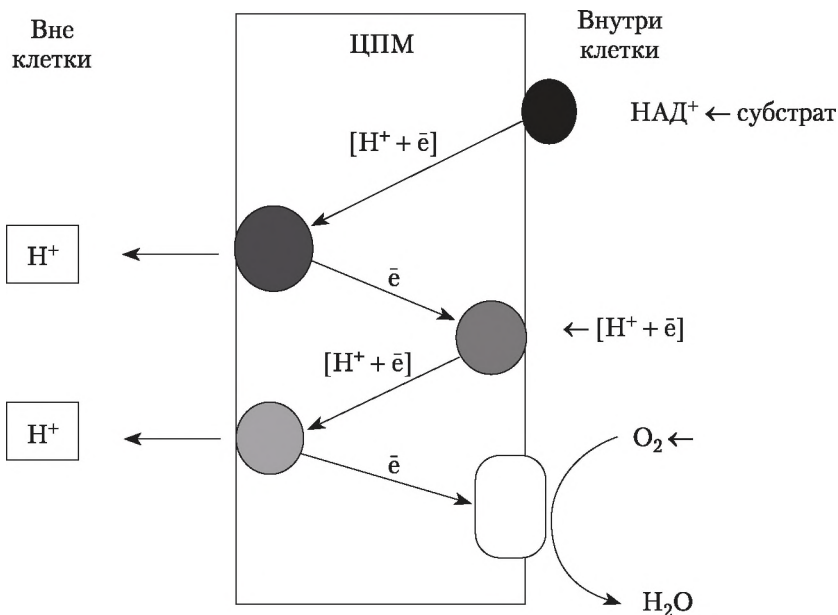


Рис. 6.10. Схема расположения компонентов ЭТЦ в мембране

система («протонная помпа»), образующая АТФ за счет «закачивания» протонов внутрь клетки. Часть трансмембранного потенциала расходуется непосредственно на транспорт веществ в клетку и движение жгутиков. При необходимости АТФ-азная система может с затратой энергии генерировать трансмембранный потенциал.

ЭТЦ может работать в обратном направлении с использованием энергии АТФ. В этом случае обратный перенос электронов приводит к восстановлению пиридиннуклеотидов. Это необходимо в том случае, когда ОВП окисляемого питательного субстрата больше, чем у пиридиннуклеотидов, которые требуются в качестве восстановительных эквивалентов.

В общем виде схема ЭТЦ представлена на рис. 6.11.

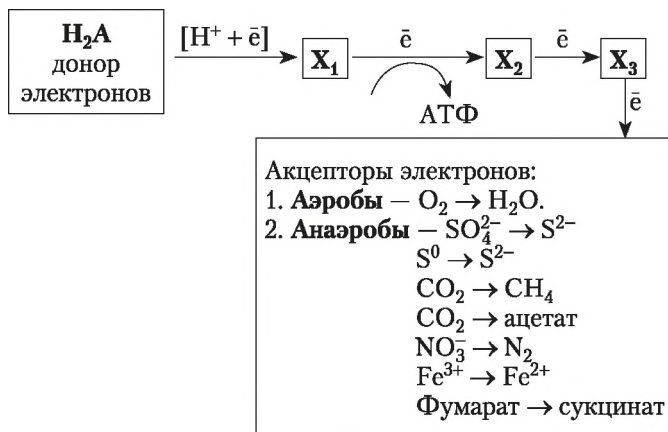


Рис. 6.11. Обобщенная схема ЭТЦ

Разность потенциалов между донором и акцептором электронов при аэробном дыхании (от -320 мВ для пары $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ до $+810$ мВ для $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$) дает значительный перепад энергии в ЭТЦ, что позволяет в трех пунктах сопряжения образовать АТФ. Микроорганизмы в качестве конечного акцептора помимо молекулярного кислорода могут использовать и кислород в связанной форме, а также другие окисленные неорганические или органические соединения. Такой процесс носит название **анаэробного дыхания**. Как правило, такие акцепторы электронов имеют меньшие ОВП, поэтому ЭТЦ анаэробного дыхания «короче снизу» и в ней меньше мест сопряжения для синтеза АТФ. Также цепь «укорачивается сверху» при использовании донора электронов, ОВП которого более положителен, чем у пиридиннуклеотидов (например, при окислении метанола электроны передаются на цитохромы, а при росте на сукцинате — на ФП). В этом случае для синтеза восстановительных эквивалентов (восстановленных пиридиннуклеотидов) необходим обратный перенос электронов с затратой энергии АТФ.

6.3.4. Ферменты и их классификация

Катализаторами химических реакций в клетках являются белки-**ферменты**, которые в миллионы раз ускоряют реакции, идущие при физиологических значениях температуры. Преобразование веществ происходит в активном (каталитическом) центре фермента. Ферменты способны «узнавать» определенные вещества, т.е. обладают **специфичностью**. Для выполнения своих функций активный центр фермента должен иметь правильную конформацию. Изменение физико-химических условий может приводить к **денатурации**, т.е. к нарушению структуры фермента вплоть до полного разрушения.

Согласно классификации **IUB (International Union of Biochemistry)** все известные ферменты группируются в шесть классов (табл. 6.4).

Таблица 6.4

Классификация ферментов

№	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 $\text{C}-\text{C}$, $\text{C}-\text{S}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$ -связей)

Каждый класс делится на подклассы, а подкласс — на подподклассы. Они имеют определенные номера. Фермент внутри своего подподкласса имеет порядковый номер, поэтому его можно охарактеризовать соответствующими четырьмя цифрами (например, сукцинатдегидрогеназа будет обозначена 1.3.99.1). Большинство ферментов имеют названия в соответствии с систематической номенклатурой (правилами 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. Так, среди оксидоредуктаз выделяют **дегидрогеназы**, осуществляющие отщепление и присоединение атомов водорода, **оксигеназы**, внедряющие атомы кислорода в молекулу окисляемого вещества, **оксидазы**, переносящие электроны непосредственно на кислород, и т.д.

Резюме

Деление микроорганизмов на физиологические группы базируется на их способности осуществлять определенные функции, что в свою очередь определяется имеющимся у них набором ферментов.

Основными критериями для определения типа питания микроорганизма служат используемые им доноры электронов, источники энергии и углерода для биосинтезов.

В мире микробов представлены все типы метаболизма. В зависимости от условий микроорганизмы способны переключаться на другой тип питания. Катаболизм и анаболизм в клетке находятся в тесной связи и зависимости друг от друга. Обменные реакции микро- и макроорганизмов на уровне клетки во многом похожи.

У всех прокариот, грибов и водорослей вещества проникают в клетку только в растворенном в воде состоянии. Некоторые простейшие способны поглощать из окружающей среды нерастворенные вещества путем эндоцитоза. Клеточная стенка и ЦПМ являются барьером для проникновения высокомолекулярных веществ внутрь клетки, поэтому перед поглощением они гидролизуются до более легких фрагментов экзоферментами. Вещества могут поступать в клетку путем пассивной или облегченной диффузии, которая протекает без затрат энергии и продолжается до выравнивания концентраций вне и внутри клетки. Поглощение веществ против градиента концентраций осуществляется путем активного транспорта с затратой метаболической энергии.

Катаболизм основан на прохождении окислительно-восстановительных реакций, дающих свободную энергию. Универсальным переносчиком энергии служит АТФ. Энергия может также запасаться в виде трансмембранного потенциала. Существуют два принципиально разных пути синтеза АТФ в клетке — субстратное и мембранное фосфорилирование. Часть энергии всегда рассеивается в окружающей среде в виде тепла или света. При окислительно-восстановительных реакциях электроны переносятся от окисляемого вещества (донора) к восстанавливаемому (акцептору) через

ряд последовательно работающих переносчиков (электронтранспортную цепь). Набор переносчиков индивидуален для каждого микроорганизма. Окисление питательного субстрата при дыхании происходит постепенно, а переносчики расположены ассиметрично, по разные стороны мембраны. При переносе электрона одновременно происходит и перенос протона, который высвобождается на ее внешней стороне. Наведенный трансмембранный потенциал может расходоваться непосредственно на транспорт веществ в клетку, движение жгутиков или на синтез АТФ с помощью мембранных АТФаз. ЭТЦ может работать в обратном направлении с использованием энергии АТФ для восстановления пиридиннуклеотидов.

Микроорганизмы в качестве конечного акцептора в ЭТЦ могут использовать не только молекулярный кислород, но и кислород в связанной форме, а также и другие окисленные соединения. Донорами электронов могут выступать вещества, ОВП которых более положителен, чем у пиридиннуклеотидов. В этих случаях ЭТЦ «укорачивается» и энергии запасается меньше. Катализаторами химических реакций при физиологических значениях температуры являются белки-ферменты.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. В чем особенность использования сложных веществ микроорганизмами-прокариотами?
2. Проанализируйте отличия активного транспорта от диффузии.
3. Как сидерофоры помогают микроорганизмам «добывать» ионы железа?
4. Почему для прокариот так важен активный транспорт веществ?
5. В чем заключается биохимическое единство всех земных живых существ?
6. Назовите способы запасания энергии у микроорганизмов.
7. Приведите свойства основных компонентов ЭТЦ.
8. Почему у некоторых микроорганизмов в ЭТЦ меньше пунктов сопряжения?
9. Приведите основные свойства белков-ферментов. На чем построена их классификация?

Глава 7

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности энергетического метаболизма различных микроорганизмов;

уметь

- объяснить особенности запасаания энергии микроорганизмами;

владеть

- навыками постановки накопительных культур для выделения микроорганизмов с различными способами запасаания энергии.
-

7.1. Основные стадии катаболизма и его связь с анаболизмом

7.1.1. Пути использования сахаров

Возможности получения энергии у микроорганизмов значительно шире, чем у высших организмов, подавляющее большинство которых обладает аэробным дыханием. При этом органические вещества полностью окисляются в присутствии кислорода до углекислого газа и воды. Микроорганизмы, помимо такого способа, могут окислять неорганические вещества. Кроме молекулярного кислорода в качестве окислителя они могут использовать его связанные формы. Микроорганизмы способны извлекать энергию путем брожения без участия кислорода в любой форме. Использование энергии света у микроорганизмов также происходит многообразней, чем у высших растений.

При гетеротрофном микробном обмене веществ связь реакций катаболизма и анаболизма наиболее явная. Разложение сахаров имеет важнейшее значение в микробном энергетическом обмене. Обычно центральным амфиболитом считают глюкозу, так как она первая из органических веществ образуется при автотрофной ассимиляции CO_2 для биосинтезов и она же может вступать в катаболизм как энергетический субстрат. У микроорганизмов выявлены три пути окисления глюкозы. **Гликолиз**, или путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, широко распространен как у прокариот, так и у эукариот. В нем из молекулы глюкозы образуются две молекулы пирувата, синтезируется 2 НАДН и 2 АТФ (рис. 7.1).

Пентозофосфатный путь, называемый также путем Варбурга — Дикенса — Хорекера, широко распространен у растений, а у большинства микроорганизмов играет вспомогательную роль. В результате его реакций образуются пируват, три молекулы восстановленных пиридиннуклеотидов и 2 АТФ, а также важные интермедиаты для последующих синтезов (рис. 7.2).

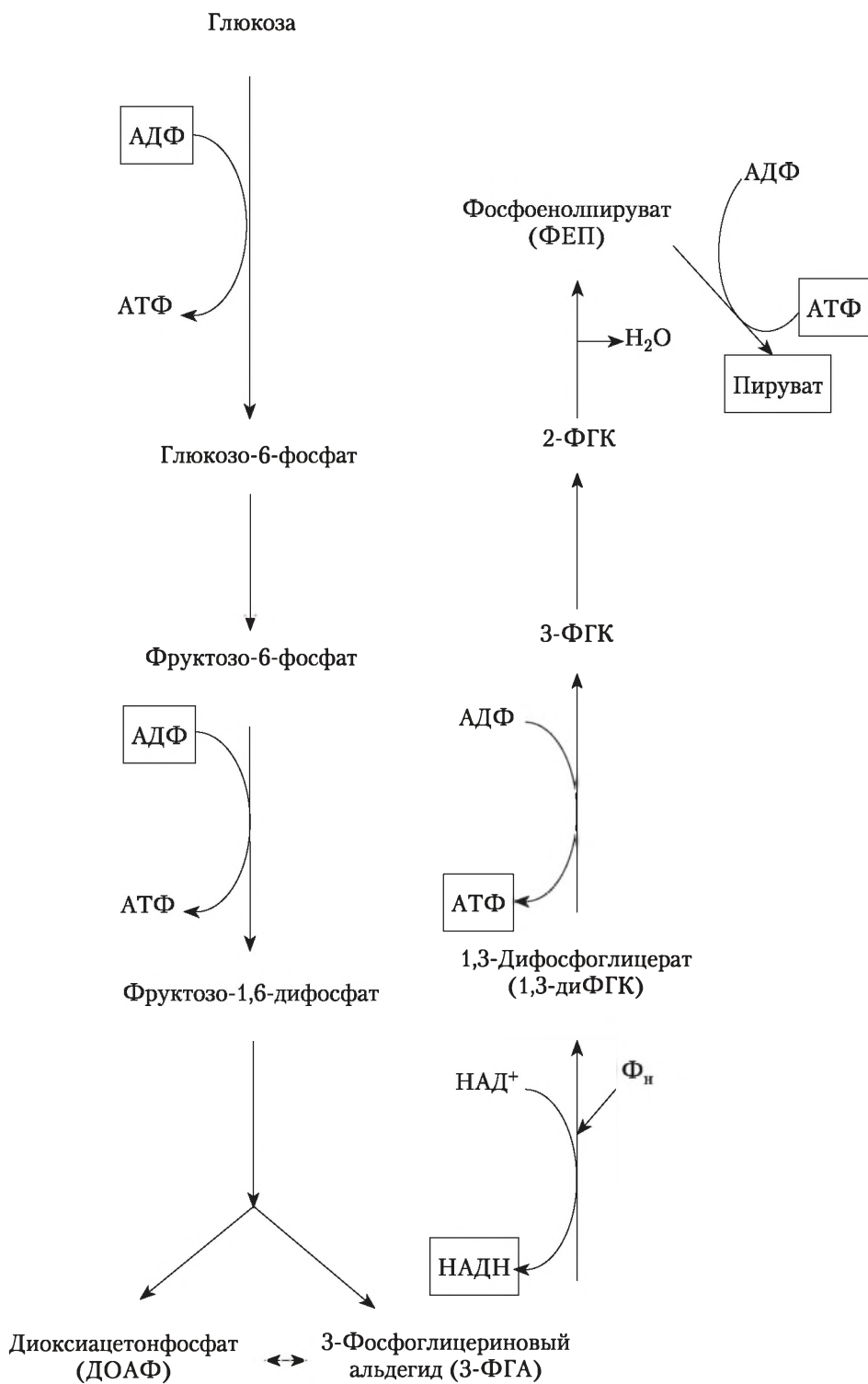


Рис. 7.1. Схема гликолиза

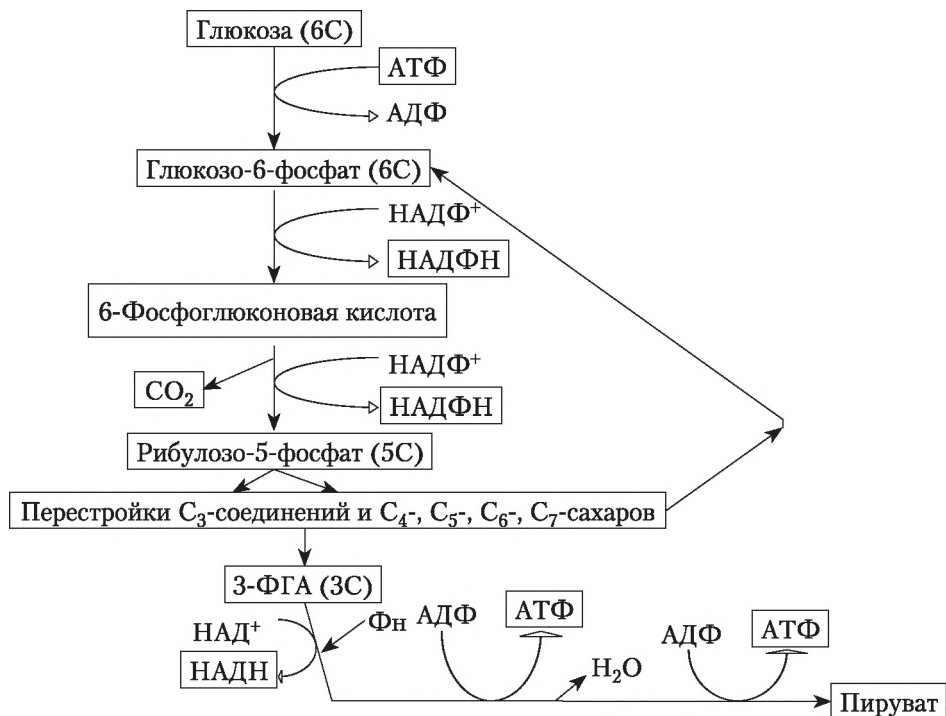


Рис. 7.2. Упрощенная схема пентозофосфатного пути

Кетодезоксифосфоглюконатный (КДФГ) путь, или путь Энтнера — Дудорова, присущ в основном микроорганизмам-прокариотам и приводит к образованию двух молекул пирувата, 1 АТФ и двух восстановленных пиридиннуклеотидов на одну молекулу глюкозы (рис. 7.3).

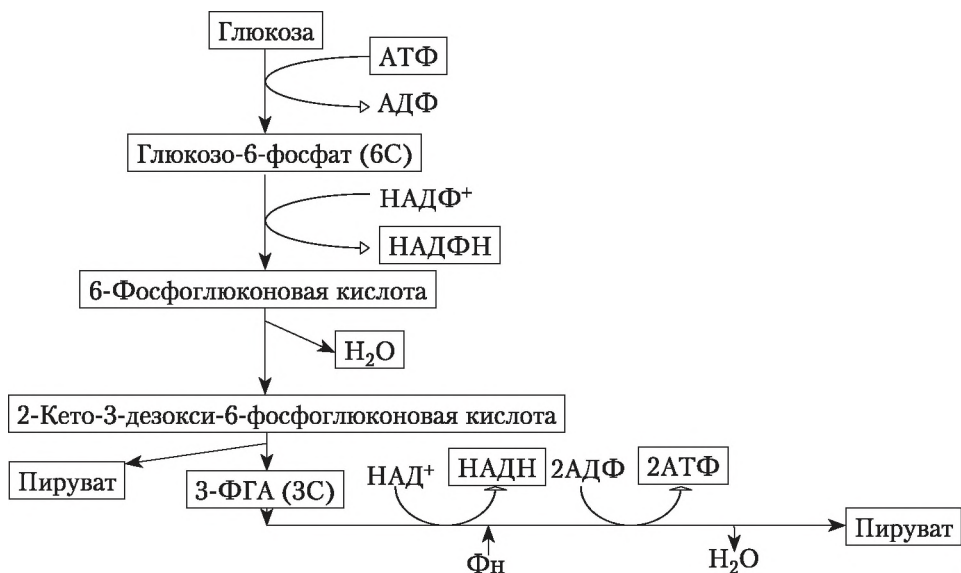


Рис. 7.3. Схема КДФГ-пути

Таким образом, в любом из путей использования сахаров конечным продуктом является пируват, вступающий в реакции, характерные для различных групп микроорганизмов.

7.1.2. Дальнейшие превращения пирувата

У представителей мира микробов обнаружены все известные реакции преобразования пирувата. У аэробных микроорганизмов реакция катализируется **пируватдегидрогеназным комплексом** с тиамином (витамином B_1) в качестве кофактора: $\text{пируват} + \text{КоА} + \text{НАД}^+ \rightarrow \text{ацетил-КоА} + \text{НАДН} + \text{CO}_2 + \text{H}^+$. Для анаэробных микроорганизмов (например, клостридий) характерно наличие **пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы**, которая катализирует реакцию: $\text{пируват} + \text{КоА} + \text{Фд} \rightarrow \text{ацетил-КоА} + \text{ФдН}_2 + \text{CO}_2$. В реакции образуется также восстановленный низкопотенциальный переносчик **ферредоксин (Фд)**, который затем окисляется при участии фермента **гидрогеназы** с выделением молекулярного водорода. У представителей семейства *Enterobacteriaceae*, фотобактерий и некоторых фототрофов имеется **пируват:формиат-лиаза**, обеспечивающая реакцию: $\text{пируват} + \text{КоА} \rightarrow \text{ацетил-КоА} + \text{формиат}$. Дрожжи преобразуют пируват с помощью **пируватдекарбоксилазы** без образования ацетил-КоА по реакции: $\text{пируват} \rightarrow \text{ацетальдегид} + \text{CO}_2$.

Далее ацетил-КоА, полученный в реакциях преобразования пирувата, поступает в реакции конечного окисления или участвует в процессах брожений.

7.1.3. Конечные пути окисления органических веществ

У аэробно и анаэробно дышащих микроорганизмов основным окислительным циклом является **цикл трикарбоновых кислот (ЦТК)**, или **цикл Кребса** (рис. 7.4). За один оборот цикла из ацетил-КоА образуется 2 молекулы CO_2 , 4 восстановительных эквивалента и 1 АТФ.

Как правило, коферменты передают электроны в ЭТЦ, где и происходит основной синтез АТФ. ЦТК выполняет функцию не только конечного окисления питательных веществ, но и обеспечивает организм многочисленными строительными блоками для процессов биосинтеза. При интенсивном отведении промежуточных продуктов цикла Кребса в анаболические реакции скорость конечного окисления ацетил-КоА может существенно замедляться. При этом выработка энергии снизится. Для восполнения отведенных в биосинтетические реакции промежуточных продуктов служат короткие обходные пути, наиболее распространенным из которых является **глиоксилатный шунт** (рис. 7.4). При росте на средах с органическими субстратами, не являющимися сахарами, дополнительные реакции требуются не только для обеспечения работы ЦТК, но и для синтеза интермедиатов процесса глюконеогенеза.

7.1.4. Особенности катаболизма анаэробных микроорганизмов

Большинство микроорганизмов, живущих без кислорода, получают энергию путем субстратного фосфорилирования при брожении. Последующие реакции расщепления только поставляют строительные блоки для

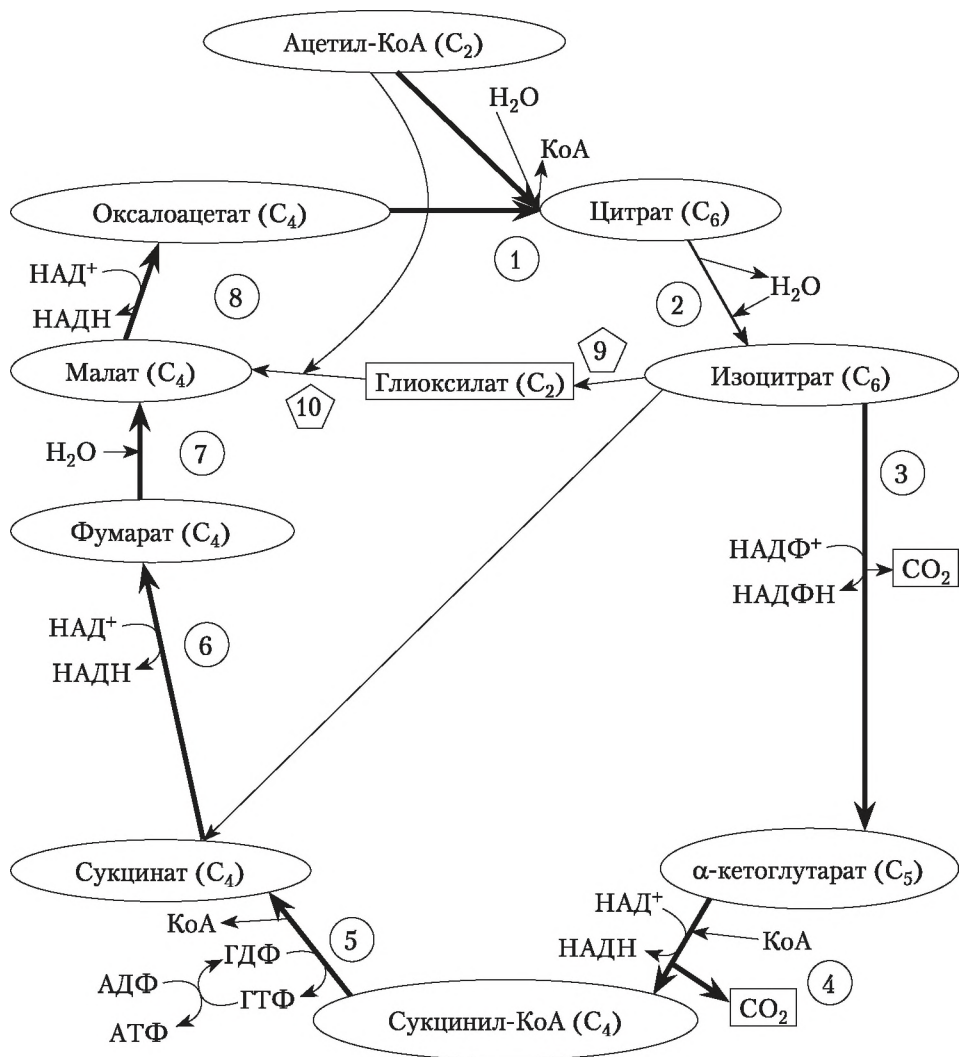


Рис. 7.4. Схема ЦТК с глиоксилатным шунтом (показан тонкими линиями):

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

биосинтеза. При этом для поддержания окислительно-восстановительного равновесия необходимо удалить избыток восстановителя. Это обычно происходит путем выделения молекулярного водорода. Так, восстановленный ферредоксин может окисляться **гидрогеназой** (выделяющей): $\text{ФдН}_2 \rightarrow \text{Фд} + \text{H}_2 \uparrow$, а формиат — разлагаться на молекулярный водород и углекислый газ **гидрогенлиазой**, комплексом гидрогеназы (выделяющей) и формиатдегидрогеназы, по реакции: $\text{НСООН} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2 \uparrow$. Под действием дегидрогеназы и гидрогеназы (выделяющей) могут происходить следующие реакции: $3\text{-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА)} + \text{Ф}_\text{н} + \text{НАД}^+ \rightarrow 1,3\text{-дифГК} + \text{НАДН} + \text{Н}^+$; $\text{НАДН} + \text{Н}^+ + \text{Фд} \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{ФдН}_2$; $\text{ФдН}_2 \rightarrow \text{Фд} + \text{H}_2 \uparrow$.

Во всех случаях брожение предполагает строгое равновесие процессов окисления и восстановления (пиридиннуклеотиды, восстановленные на одном этапе брожения, впоследствии в том же количестве должны быть окислены на другом). В более узком смысле брожение может быть определено как бескислородное превращение пирувата, полученного в реакциях одного из путей преобразования сахаров (гликолиза, пентозофосфатного или КДФГ-пути).

7.2.1. Спиртовое брожение

Исторически первым было изучено спиртовое брожение у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи, как и большинство грибов, осуществляют аэробное дыхание, однако в отсутствии кислорода они способны сбраживать углеводы до этанола и углекислоты в соответствии с реакцией: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$ (рис. 7.6). При этом пируват образуется в процессе гликолиза.

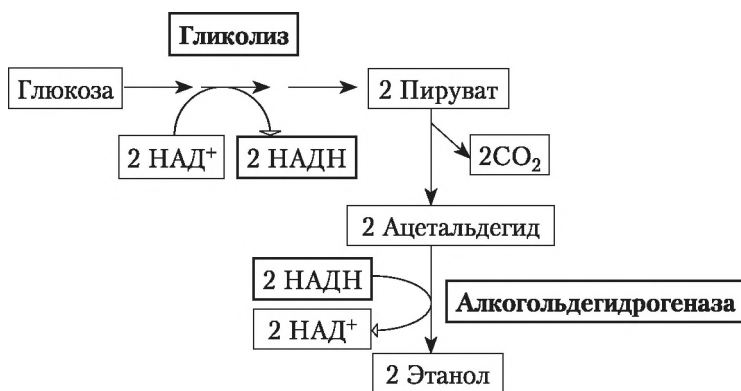


Рис. 7.6. Схема спиртового брожения у дрожжей и бактерий рода *Sarcina*

Бактерии рода *Sarcina* образуют этанол тем же путем, что и дрожжи.

Дрожжевое спиртовое брожение происходит при температурах до 30°C, поэтому саморазогрев бродящей массы является серьезной проблемой при производстве этанола и спиртосодержащих напитков. Этанол, образуемый дрожжами, не является для них «безразличным» соединением, так как уже 1—2%-й этанол может увеличивать текучесть мембран, и они перестают поддерживать градиент протонов. Дрожжи относятся к спиртоtolерантным микроорганизмам — они способны выдерживать 9—12% (об.) этанола. Наиболее экстремальными в этом отношении являются дрожжи расы *sake* (до 18%). Они используются для приготовления рисовой водки (саке). Процесс начинается с расщепления крахмала риса плесневыми грибами рода *Aspergillus*, образующими амилазы. Полученные олиго- и моносахара дрожжи сбраживают до этанола.

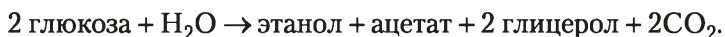
Дрожжи не могут существовать в анаэробных условиях постоянно. Обычно они останавливаются в росте после 5—6 делений, так как одна из стадий синтеза их мембранных фосфолипидов требует присутствия кислорода. При наличии ~0,02% кислорода дрожжи переключаются

на аэробное дыхание, при котором образуется в 20 раз больше биомассы и синтезируется значительно больше АТФ. Процесс брожения, наоборот, подавляется, а явление носит название **эффект Пастера**. В то же время при избыточной концентрации сахара в среде наблюдается **эффект Крэбтри**, когда дрожжи даже в присутствии кислорода сохраняют высокую активность брожения и не переходят на аэробное дыхание.

Изучая спиртовое брожение дрожжей, немецкий исследователь Карл Нейберг показал, что при добавлении некоторых химических веществ к бродящей массе можно получить измененный состав продуктов брожения. Нормальное дрожжевое брожение К. Нейберг называл I формой. При связывании ацетальдегида бисульфитом ($\text{NaHSO}_3 + \text{CH}_3\text{CHO} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHON-SO}_3\text{Na}$) акцептором водорода становится диоксиацетонфосфат (ДОАФ), который восстанавливается и дефосфорилируется до глицерола. Суммарная реакция брожения в этом случае выглядит так:

глюкоза + бисульфит натрия $\rightarrow$ глицерол + ацетальдегидсульфит + CO_2 .

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 принимает III форму по Нейбергу. При этом ацетальдегид превращается путем реакции дисмутации в этанол и ацетат, а акцептором водорода опять становится ДОАФ, образуя глицерол по реакции



Некоторые бактерии способны осуществлять процесс спиртового брожения при повышенных температурах. Например, подвижный палочковидный микроорганизм *Zyotomonas mobilis* способен сбраживать сахара при 45°C. Этот монотрих был выделен из сброженного сока агавы (пульке), из которого путем перегонки получают известный алкогольный напиток текилу. *Zyotomonas mobilis*, в отличие от дрожжей, превращает глюкозу в пируват по КДФГ-пути.

Некоторые клостридии и энтеробактерии проводят процессы брожения, в которых этанол является одним из продуктов (рис. 7.7). В зависимости от условий соотношение веществ (ацетат, этанол, CO_2 , лактат) может значительно варьировать.

В гетероферментативном молочнокислом брожении этанол образуется как минорный продукт (например, у *Leuconostoc mesenteroides*).

7.2.2. Молочнокислое брожение

Молочнокислое брожение осуществляют филогенетически неродственные микроорганизмы, объединяемые по признаку образования молочной кислоты. Это представители порядков *Lactobacillales* и *Bacillales* из филума *Firmicutes* и члены семейства *Bifidobacteriaceae* из филума *Actinobacteria*. Они различны по морфологии, но все грамположительны и неподвижны. Среди них только споролактобациллы способны к спорообразованию. **Молочнокислые бактерии (МКБ)** растут исключительно на богатых средах с добавлением большого количества факторов роста. Они могут

использовать лактозу, чем схожи с бактериями кишечной группы. Эти микроорганизмы являются в разной степени аэротолерантными, но АТФ получают исключительно путем субстратного фосфорилирования. В обычных условиях молекулярный кислород они в своем метаболизме не используют и живут только за счет брожения. У них не обнаружены каталазы и гемопотеины (цитохромы). Различают два варианта молочнокислого брожения. При **гомоферментативном молочнокислом брожении** сахара используются путем гликолиза (рис. 7.8, а), молочной кислоты образуется $\approx 90\%$ и только 10% приходится на другие продукты (ацетат, ацетоин, этанол). Таким способом сбраживают сахара многие лактококки и лактобациллы.

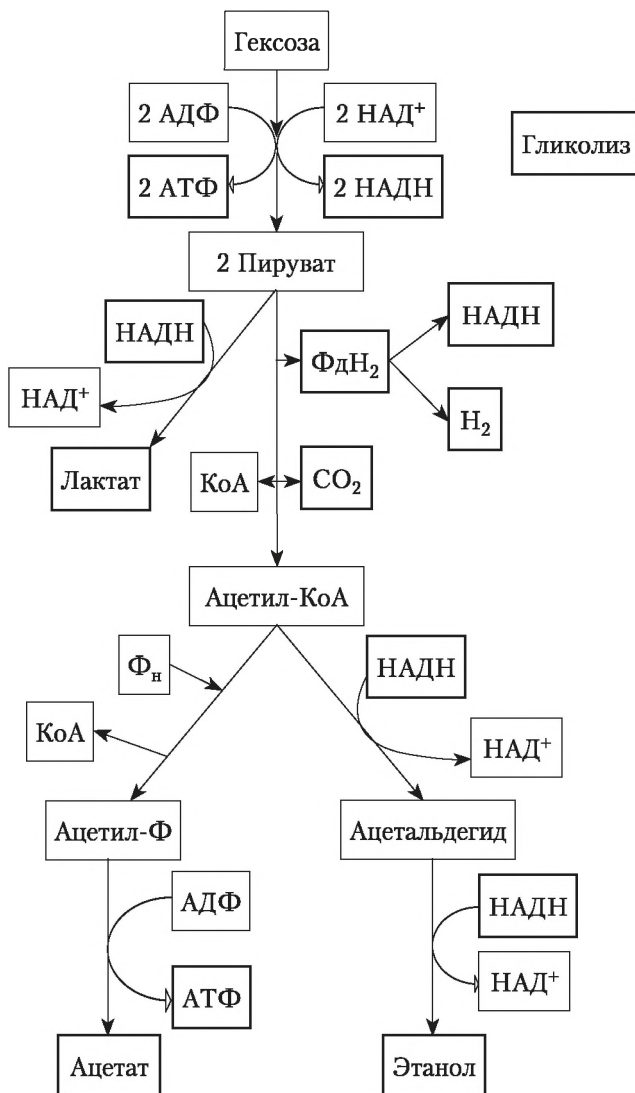


Рис. 7.7. Схема брожения с образованием спирта у некоторых энтеробактерий и клостридий

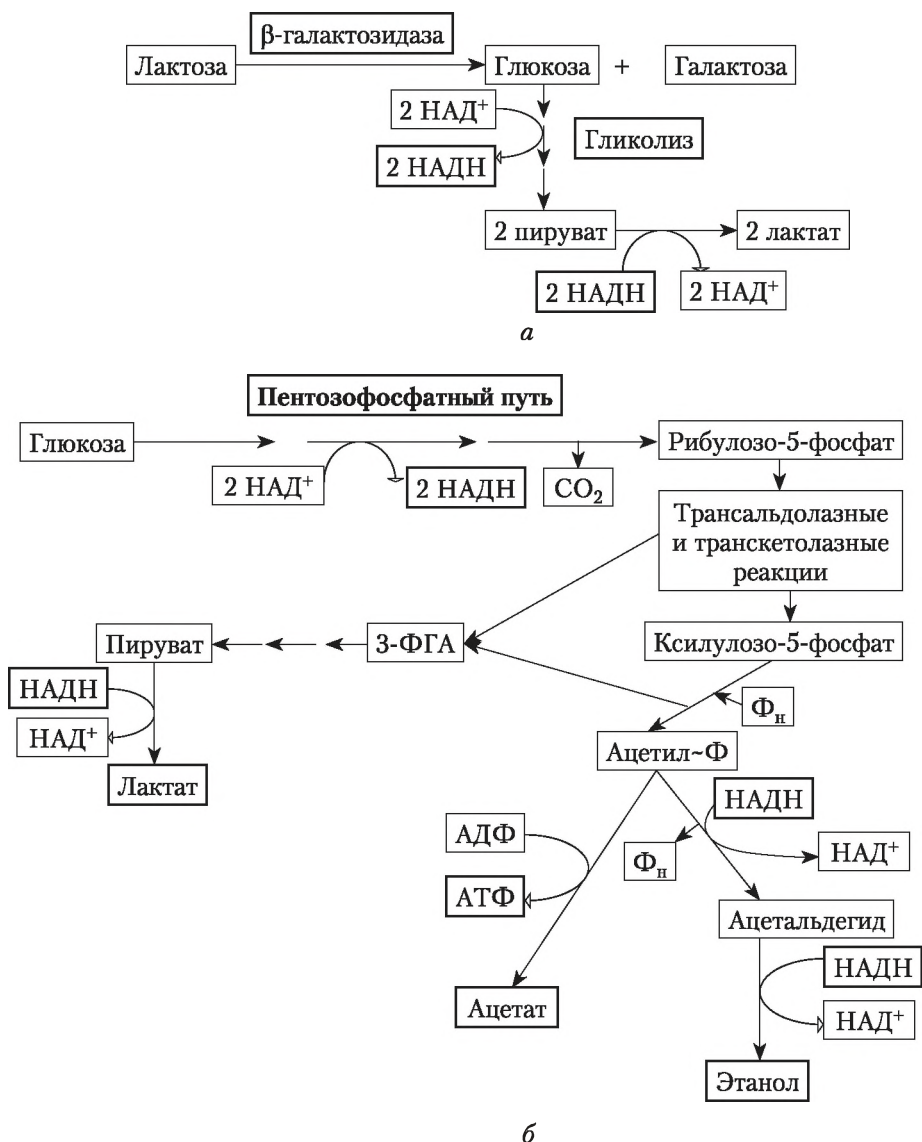
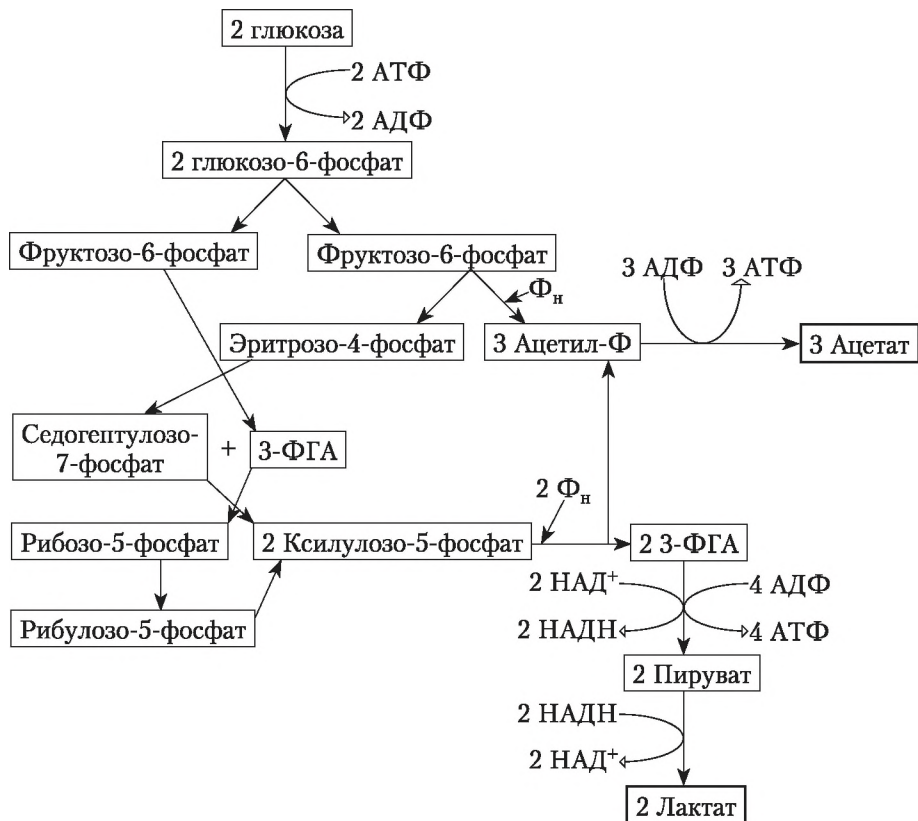


Рис. 7.8. Упрощенные схемы молочнокислого брожения:

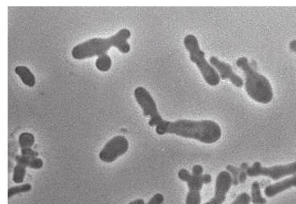
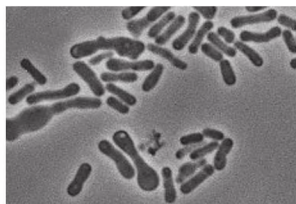
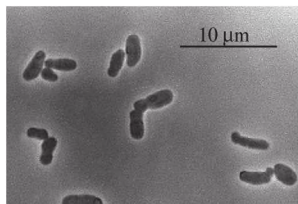
а — гомоферментативного; *б* — гетероферментативного

При **гетероферментативном молочнокислом брожении** (рис. 7.8, *б*) сахара сбраживаются через пентозофосфатный путь, а лактата образуется $\approx 50\%$. Такой тип брожения осуществляют представители родов *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и некоторые другие микроорганизмы. Ряд гетероферментативных молочнокислых бактерий очень чувствителен к изменению условий. Так, *Leuconostoc mesenteroides* при соприкосновении с кислородом образует значительное количество полисахарида (происходит ослизнение продукта). Большинство бифидобактерий перестают расти даже при незначительной концентрации кислорода в среде.

Бифидобактерии, характеризующиеся своеобразной морфологией клеток с булавовидными или лопатовидными вздутиями на концах (рис. 7.9, а), при делении образуют V-подобные структуры (вилочки). Они отличаются особой модификацией гетероферментативного молочнокислого брожения без образования этанола и выделения CO_2 , происходящей в соответствии с реакцией: $2 \text{ глюкоза} \rightarrow 2 \text{ лактат} + 3 \text{ ацетат}$ (рис. 7.9, б).



а



б

Рис. 7.9. Бифидобактерии:

а — модификация гетероферментативного молочнокислого брожения;

б — микрофотографии клеток

Микробное население (**микробиота**) внутренних органов и поверхностей тела в норме находится в мутуалистическом симбиозе с многоклеточным организмом. Например, нормальная микробиота кишечника

поставляет млекопитающим витамины и обеспечивает правильность путей переваривания пищи. Молочнокислые бактерии являются обычными компонентами микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) высших животных и человека. Известный физиолог И. И. Мечников считал, что молочнокислые бактерии и их продукты выполняют ряд полезных функций в организме человека, подавляя гнилостные и болезнетворные микроорганизмы. Этому способствует выделение молочной кислоты, приводящее к снижению pH, и образование антибиотических соединений (низина). Наличие в ЖКТ молочнокислых бактерий препятствует прикреплению к слизистой оболочке патогенных микроорганизмов. В настоящее время обнаружено также иммуностимулирующее действие бактерий молочной кислоты группы. Для восстановления нормальной микробиоты кишечника при дисбактериозе, вызванном, например, приемом антибиотиков, врачи рекомендуют принимать препараты сухих клеток или суспензии чистых культур или смесей молочнокислых микроорганизмов. Преобладающим компонентом микробиоты ЖКТ грудных детей являются **бифидобактерии**, защищающие их от гнилостных и патогенных микроорганизмов. Есть сведения, что некоторые бифидобактерии способны к нитратредукции с образованием нитрита: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$, особенно в присутствии гемина.

Нитриты в крови необратимо связываются с гемоглобином, который теряет способность переносить кислород. Поскольку у грудных детей бифидобактерии преобладают, то при попадании значительного количества нитратов с пищей у них может наступить удушье. Именно поэтому к детскому питанию предъявляются очень жесткие требования по содержанию нитратов.

Свойство молочнокислых бактерий 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. Молочная кислота выступает при этом естественным консервантом, снижающим pH до 3 и препятствующим развитию в продукте микробиоты разложения (например, клостридий). Ту же цель преследует искусственное снижение pH (добавление уксуса, лимонной или бензойной кислот) при мариновании продуктов.

При низком значении pH короткоцепочечные алифатические жирные кислоты становятся протонофорами, препятствуя, таким образом, развитию микроорганизмов. Свойство образовывать лактат при брожении МКБ используется также для получения чистой молочной кислоты.

7.2.3. Пропионовокислое брожение

Этот вид брожения осуществляют микроорганизмы, относящиеся к подпорядку *Propionibacterineae* филума *Actinobacteria*, которые обитают в рубце и кишечнике жвачных животных. Их грамположительные, неподвижные бесспорные палочки из-за особенностей снеппинг-деления и последующего расхождения клеток формируют характерные «вилочки» и «заборчики» (рис. 7.10, а).

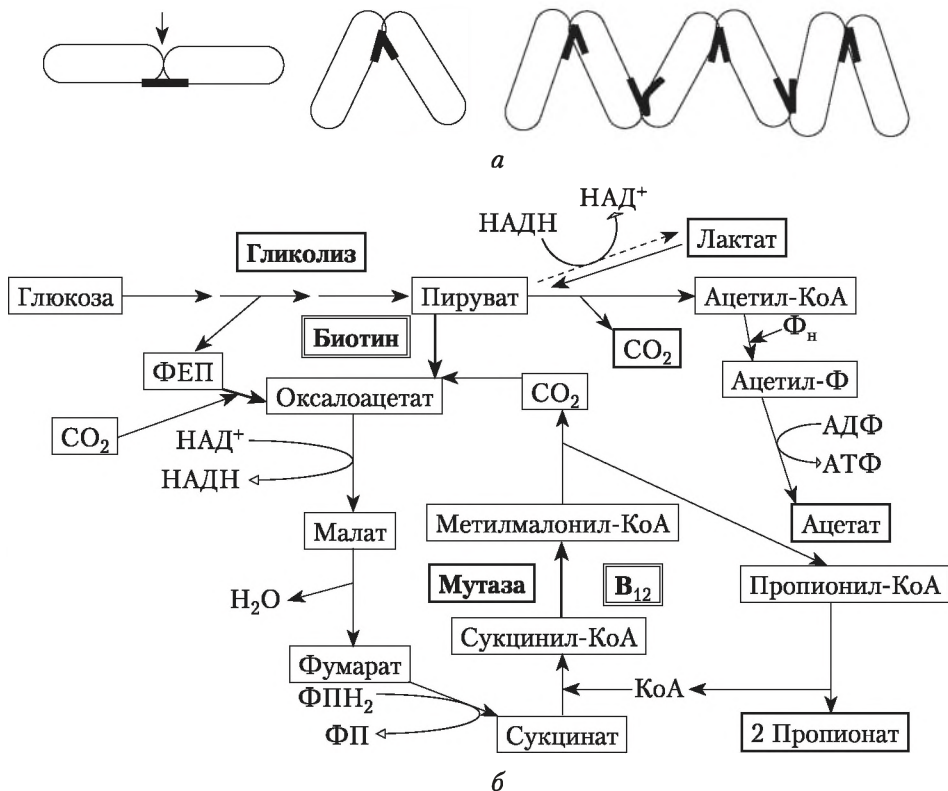


Рис. 7.10. Схемы:

а — снеппинг-деления; б — пропионовокислого брожения

Пропионовокислое брожение включает стадию **гетеротрофной фиксации CO_2** , при которой C_3 -кислоты достраиваются до C_4 -кислот путем присоединения молекулы углекислого газа. Это явление впервые было обнаружено в 1936 г. Харландом Вудом, который открыл реакцию карбоксилирования пирувата или ФЕП (**реакцию Вуда — Веркмана**) при росте пропионовокислых бактерий в гетеротрофных условиях. Эта реакция «встроена» в схему пропионовокислого брожения, в двух стадиях которого в качестве кофакторов участвуют витамины биотин и B_{12} . При их недостатке брожение превращается в ацетат-янтарное. Образование пропионовой кислоты происходит по метилмалонил-КоА-пути (рис. 7.10, б) с суммарной реакцией: $1\frac{1}{2}$ глюкоза $\rightarrow$ 2 пропионат + ацетат + CO_2 . Для пропионовокислых бактерий показано также использование в качестве субстратов при брожении лактата и глицерола в соответствии с реакциями:



Пропионовокислые бактерии способны расти в присутствии небольшого количества кислорода, а также осуществлять анаэробное фумаратное дыхание, так как обладают короткой ЭТЦ и имеют гемсодержащие ферменты — цитохромы и каталазу.

Эти бактерии традиционно применяют при приготовлении некоторых твердых сыров. Поскольку пропионовокислые бактерии являются природными сверхсинтетиками витамина В₁₂, то их используют при получении этого вещества для медицинских целей. В настоящее время эти бактерии добавляют в некоторые хлебные закваски, а также рассматривают их как потенциальные пробиотики.

7.2.4. Смешанное (муравьинокислое) и бутандиоловое брожения

Этот вид брожения приводит к образованию этанола и сложной смеси органических кислот (уксусной, молочной, янтарной, муравьиной и др.). Характерный, но не главный продукт брожения, муравьиная кислота (формиат) сначала может накапливаться, а затем расщепляться на Н₂ и СО₂ (рис. 7.11, а). Смешанное брожение осуществляют микроорганизмы, объединенные в порядок *Enterobacteriales* филума *Proteobacteria*, а также представители родов *Vibrio* и *Yersinia*, близкие к ним по метаболизму. Порядок *Enterobacteriales* содержит роды *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia* и др. Это грамотрицательные, подвижные бесспорные палочки с перитрихальным жгутикованием, факультативные анаэробы, способные получать энергию как в процессе брожения, так и за счет дыхания. Клетки этих микроорганизмов содержат гемопротеины (цитохромы, каталазу), совершенно нетребовательны к условиям роста и могут развиваться на очень простых минеральных средах (являются **прототрофами**). Смешанное брожение в анаэробных условиях осуществляют также светящиеся бактерии.

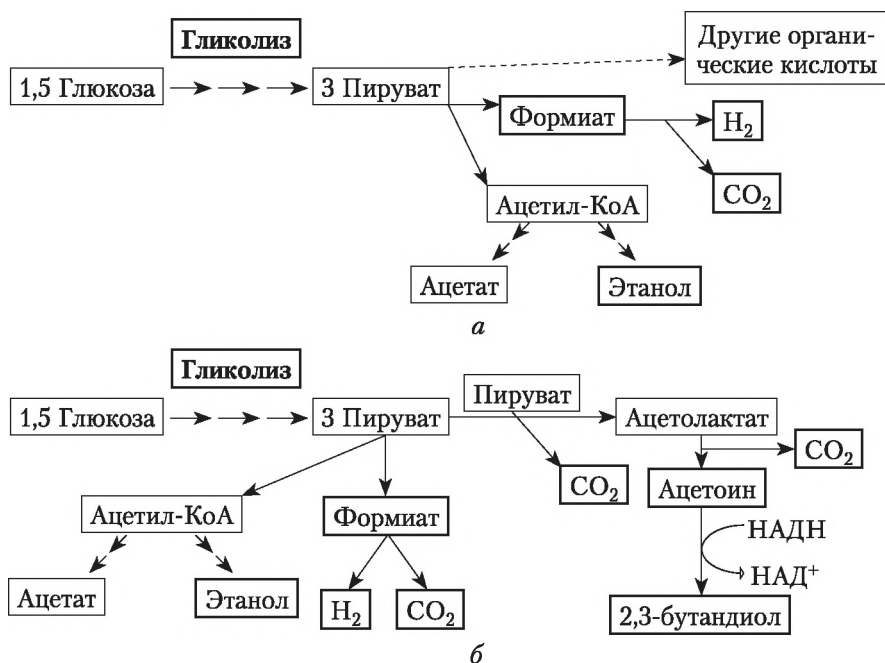


Рис. 7.11. Схемы брожений:

а — смешанного; б — бутандиолового

Для родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Erwinia*, а также некоторых видов рода *Bacillus* характерна модифицированная схема смешанного брожения с преобладанием 2,3-бутандиола (рис. 7.11, б), а не органических кислот, получившая отдельное название **бутандиолового брожения**.

Среди представителей группы есть возбудители опасных заболеваний человека. Патогенные представители рода *Klebsiella* могут вызывать пневмонии, *Shigella* и *Salmonella* — тифы, дизентерию и сальмонеллез, *Vibrio* — холеру, а *Yersinia* — чуму. Некоторые энтеробактерии (*E. coli*, *Proteus vulgaris*) являются **санитарно-показательными организмами**, определяемыми при анализе питьевой воды и при сертификации пищевых продуктов. Поскольку они представляют собой типичных обитателей кишечника человека, то их наличие в пробах говорит о загрязненности фекальными массами. Санитарно-показательные микроорганизмы обнаруживаются в пробах легче и быстрее, чем возбудители заболеваний, и служат показателем потенциальной опасности, так как экскременты больных людей могут содержать и патогенные микроорганизмы. Для питьевой воды определяют такие параметры, как **коли-индекс** (число клеток кишечной палочки в 1 л воды) и **коли-титр** (количество мл воды, в котором содержится 1 клетка этого микроорганизма). Показателем чистой воды служит коли-титр > 300. К группе микроорганизмов, осуществляющих смешанное брожение, относятся фитопатогенные представители рода *Erwinia*. Обладая мощными ферментами, разрушающими пектин, они вызывают развитие мягких гнилей растений. Пектиназы эрвиний (ферменты из *E. carotovora*) используют в пищевой промышленности для осветления фруктовых и овощных соков. Для биотехнологии представляет интерес также *Serratia marcescens* (*Bacterium prodigiosum*, «чудесная палочка»), образующая ярко-красный пигмент продигиозин, обладающий антимикробным действием.

7.2.5. Маслянокислое и ацетонобутиловое брожение

Сложное двухстадийное маслянокислое и ацетонобутиловое брожение осуществляют микроорганизмы рода *Clostridium*, относящегося к семейству *Clostridiaceae* из филума *Firmicutes*.

Клостридии — это грамположительные палочки с перитрихальным жгутикованием, формирующие сферические или овальные эндоспоры, раздувающие клетку.

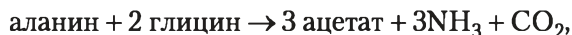
В качестве запасных веществ для клостридий характерны крахмалоподобные полисахариды (гранулеза). Некоторые виды рода строго анаэробны (*C. pasteurianum*, *C. kluyveri*), другие аэротолерантны (*C. histolyticum*, *C. acetobutylicum*). Многие не содержат гемопротеинов (цитохромов, каталазы), но у некоторых обнаружены каталаза и супероксиддисмутаза. При добавлении в среду предшественников гема клостридии способны образовывать цитохромы. Основная масса развивается мезофильно, в нейтральной или щелочной среде, но есть виды, растущие при 75°C. Некоторые представители способны к фиксации молекулярного азота. Клостридии относят к универсальным микроорганизмам, способным использовать множество субстратов. Они обладают мощным комплексом экзогидролаз. По питательным предпочтениям их подразделяют на три группы. Сахаро-

литические клостридии растут на сахаросодержащих и полисахаридных средах. Протеолитические (или пептолитические) виды способны использовать белки и аминокислоты. Именно среди них много болезнетворных форм. Пуринолитические клостридии гидролизуют нуклеиновые кислоты и сбраживают пурины и пиримидины.

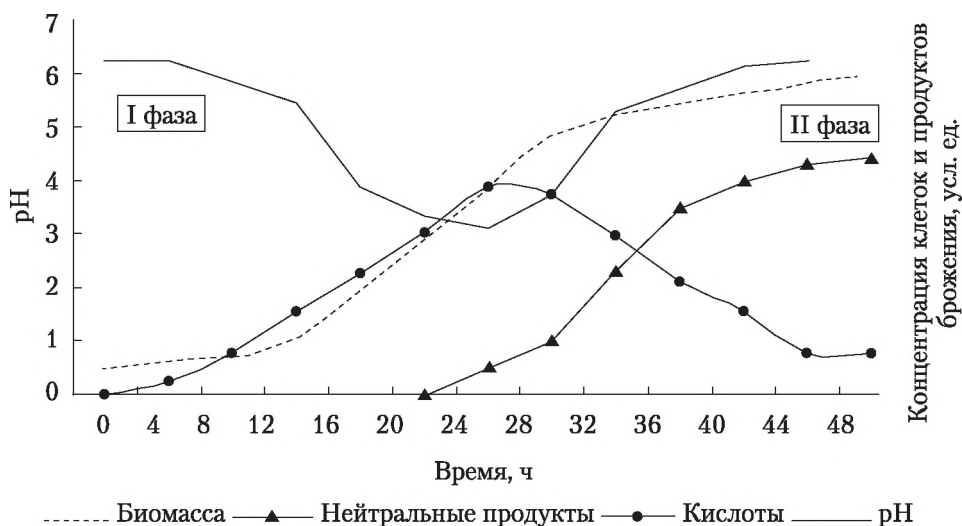
Продуктами маслянокислого и ацетонобутилового брожения являются масляная и другие органические кислоты, а также ацетон, бутанол, этанол, изопропанол. Брожение характеризуется четко выраженной **двухфазностью** (рис. 7.12). В I фазе клетки активно растут, образуют кислые продукты и рН снижается. При этом рост культуры замедляется, хотя субстрата еще достаточно. В течение II стадии восстановительные эквиваленты переносятся на образовавшиеся кислые продукты и получаются нейтральные вещества, вследствие чего рН возвращается к нормальному уровню и культура снова может развиваться.

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. Таким способом решаются две проблемы — «исправления рН» и избавления от «лишнего» восстановителя. Синтез ряда ферментов II фазы (в частности, ацетатдекарбоксилазы) индуцируется понижением рН среды до 5,0.

Клостридии и некоторые бациллы могут осуществлять парные брожения, когда одно вещество служит донором, а другое — акцептором электронов. Так, сбраживание аминокислот без предварительного дезаминирования происходит в соответствии с реакцией Стигленда. Донорами могут служить аланин, лейцин, *изо*-лейцин, валин, серин, акцепторами — глицин, пролин, аргинин, триптофан. Например, в реакции:



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



а

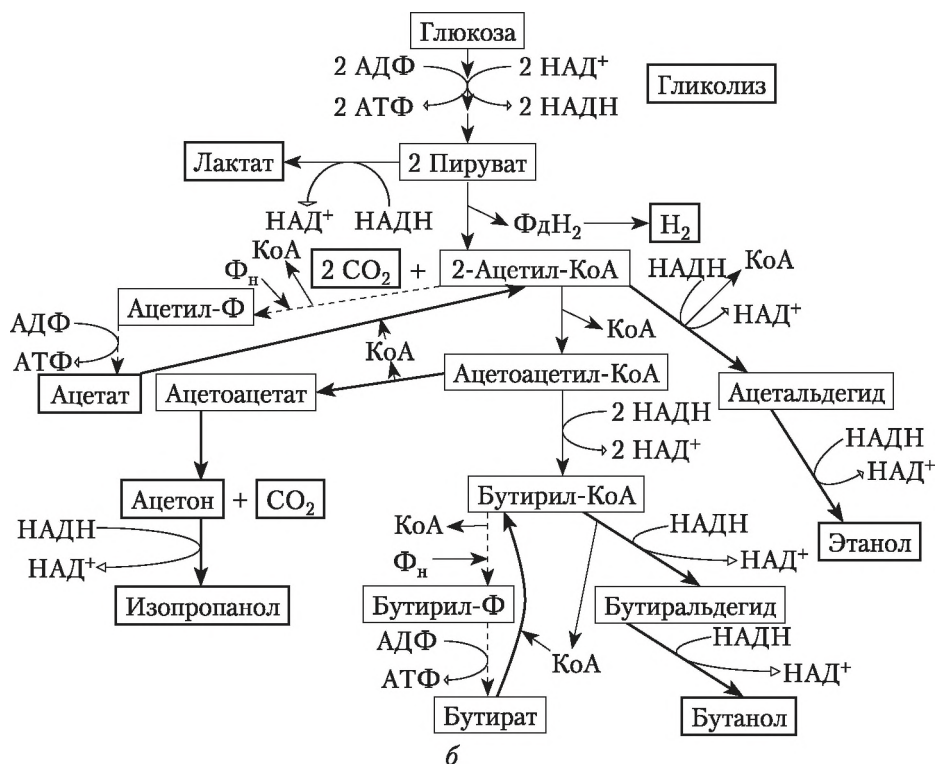


Рис. 7.12. Особенности маслянокислого и ацетобутилового брожения:

а — двухфазность; б — схема брожения (тонкие стрелки — реакции, общие для двух фаз; пунктирные — реакции I фазы; жирные — II фазы)

примером парного процесса является сукцинат-этанольное брожение у *C. kluyveri* (рис. 7.13) с суммарным уравнением: сукцинат + этанол → 3 ацетат.

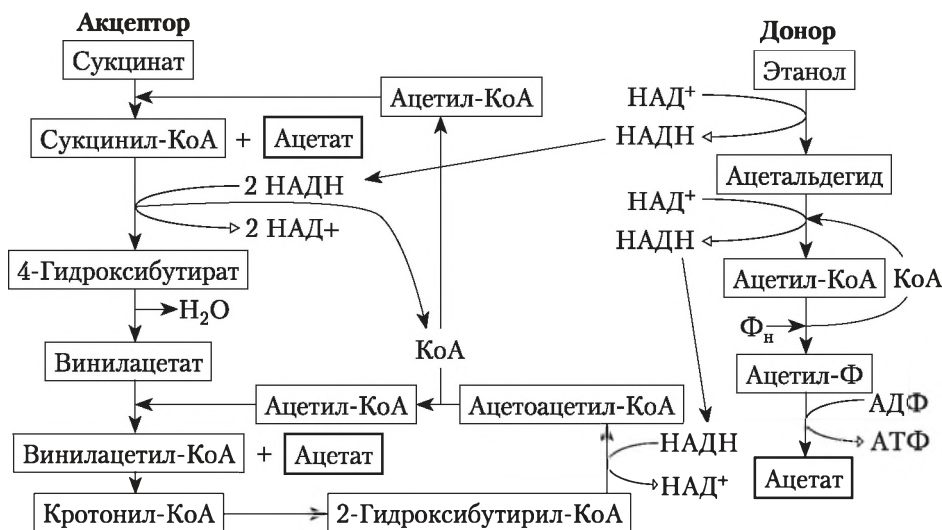


Рис. 7.13. Схема сукцинат-этанольного брожения *C. kluyveri*

Клостридии являются типичными обитателями почвы, но среди них есть и патогенные виды. Например, *C. histolyticum* и *C. septicum*, возбудители **газовой гангрены**, — это протеолитические клостридии, обычно обитающие в почве, но образующие токсины при попадании в богатую белковым субстратом среду (при загрязнении рваных ран почвой). Большое количество летальных исходов в госпиталях в период военных действий связано как раз с развитием так называемых раневых инфекций (в основном, газовой гангрены). При пережатии артерий для остановки кровотечения в тканях возникал анаэробноз, что стимулировало брожение клостридий с интенсивным выделением газов. Поврежденная ткань раздувалась, издавала неприятный запах и чернела из-за некроза. Развитие гангрены могло быть остановлено насыщением раны кислородом до 3 атм. Этот способ лечения был предложен военным хирургом В. И. Кравченко («бочка Кравченко»). Поврежденную конечность помещали в герметичный сосуд и наполняли его кислородом под давлением. *C. tetani*, вызывающий **столбняк**, образует при попадании в раны столбнячный токсин, приводящий к судорогам всех мышц и в конечном счете к остановке дыхания. В неправильно приготовленных консервированных белковых продуктах (рыбных, мясных, бобовых) может развиваться продуцент смертельного нейротоксина **ботулина** *C. botulinum*, попадающий туда с почвой.

Клостридии относятся к микроорганизмам-**гидролитикам** и играют существенную роль в природных местообитаниях. В анаэробных пищевых цепях деструкции биополимеров они осуществляют первую стадию их гидролиза, а затем наряду с другими группами проводят сбраживание образовавшихся олиго- и мономеров.

7.2.6. Гомоацетатное брожение

Гомоацетатное брожение — это сложный процесс, часть реакций которого происходит за счет анаэробного карбонатного дыхания. Единственным его продуктом является уксусная кислота (ацетат). Микроорганизмы, его осуществляющие (**гомоацетогены**), распространены во многих таксономических группах. Это представители родов *Clostridium* (*C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum*, *C. thermoautotrophicum*, растущий при 70°C), *Sporomusa*, *Acetobacterium* (*A. woodii*), *Acetoanaerobium*, *Acetogenium*, *Acetitumaculum*, *Acetohalobium*, *Acetonema*, *Moorella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Syntrophococcus*. Все они относятся к домену *Bacteria*. Среди архей и эукариот гомоацетогенов не обнаружено. Гомоацетогенные микроорганизмы являются облигатными анаэробами. Их ферменты и кофакторы в присутствии кислорода быстро теряют свою активность, поэтому выделение и очистку необходимо проводить в анаэробных боксах.

Гомоацетогены способны перерабатывать множество субстратов (полисахариды, сахара, органические кислоты, спирты, аминокислоты, одноуглеродные соединения, ароматические вещества, молекулярный водород). В гетеротрофных условиях две молекулы ацетата получаются в типичных реакциях брожения, а третью дает анаэробное карбонатное дыхание (рис. 7.14).

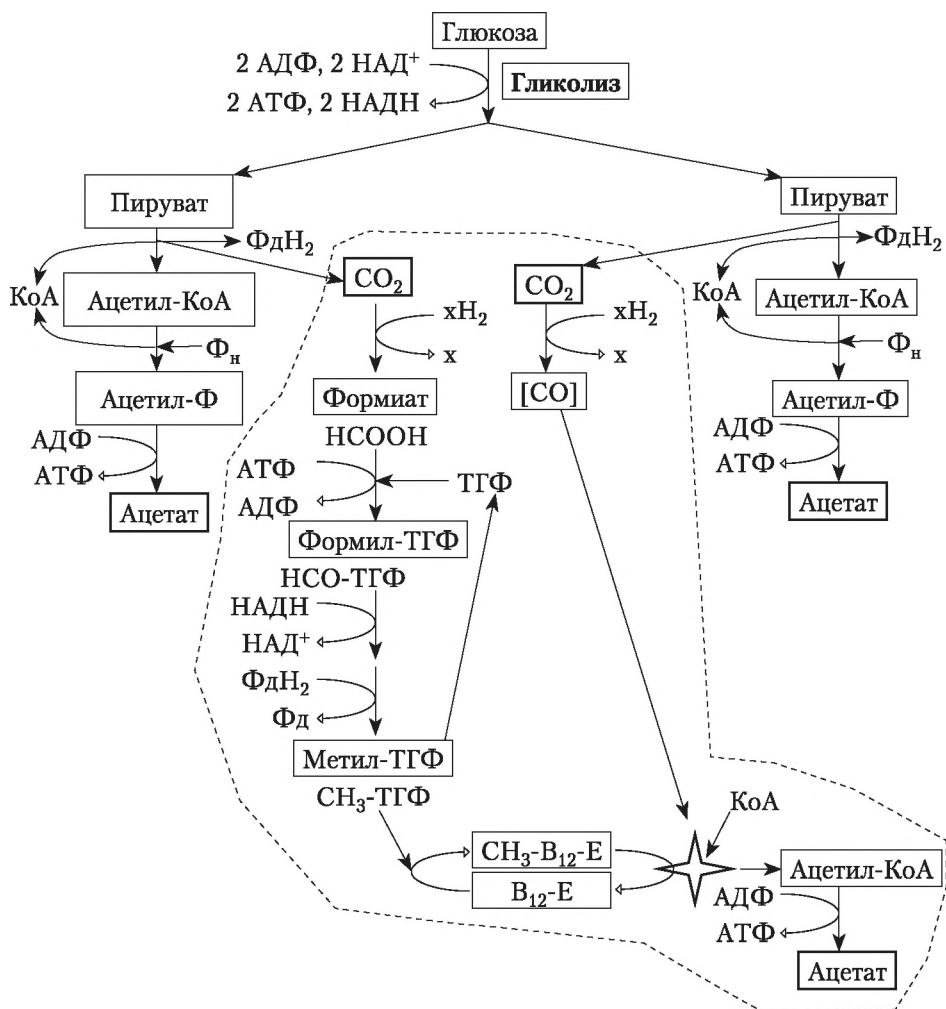


Рис. 7.14. Схема гомоацетатного брожения

Работа ключевого ферментного комплекса CO -дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза представлена на рис. 7.15.

При автотрофном росте гомоацетогенов на $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ водород служит донором, а углекислый газ — акцептором электронов. Органическое вещество в этом случае синтезируется в цепи реакций, получившей название **ацетил-КоА-пути автотрофной фиксации CO_2** , или **пути Вуда — Льюнгадала** (рис. 7.14 — обведенная пунктиром область). В условиях автотрофии формирование АТФ путем субстратного фосфорилирования ограничено, а ее образование на мембранах сопряжено с восстановлением углекислоты до ацетил-КоА. Показано, что мембраны гомоацетогенных клостридий содержат ферменты гидрогеназу, НАДН:ферредоксин-оксидоредуктазу, пирролохинолинхинон-зависимую метанолдегидрогеназу, CO -дегидрогеназу, метилен-ТГФ-редуктазу и протонзависимую АТФазу. АТФ у гомоацетогенов может синтезироваться как за счет протондвижущей силы, так и за

ное дыхание сопряжено с функционированием ЭТЦ и происходит на мембранах. По используемому конечному акцептору электронов анаэробное дыхание подразделяется на несколько видов (табл. 7.1).

Таблица 7.1

Виды анаэробного дыхания

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

Процессы восстановления (**редукции**) акцепторов электронов приводят к образованию продуктов, которые могут идти непосредственно в реакции анаболизма или не участвуют в ассимиляции. В первом случае редукцию называют **ассимиляционной**, во втором — **диссимиляционной**. Анаэробное дыхание относится к диссимиляционной редукции.

7.3.2. Нитратное дыхание

Анаэробное нитратное дыхание встречается в двух модификациях. Процесс называют **нитратредукцией**, если восстановление нитрата идет только до уровня нитрита $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$. Такая форма нитратного дыхания присуща энтеробактериям. Восстановление нитрата до нитрита кишечной микробиотой может приводить к цианозу, когда эритроциты, заблокированные нитритом, не способны переносить кислород. У некоторых микроорганиз-

мов, восстанавливающих нитрат до нитрита, при накоплении последнего в культуральной жидкости иногда происходит **ассимиляционная нитрит-редукция (аммонификация нитрата)**, не дающая энергии, но зато преобразующая высокотоксичный нитрит в NH_4^+ . Аммоний поступает в реакции синтеза аминокислот и других азотсодержащих соединений.

Энергодающий процесс восстановления нитрата через ряд интермедиатов до газообразного азота ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) называется **денитрификацией**. Такая форма нитратного дыхания встречается у псевдомонад и бацилл. Это единственный процесс, позволяющий превратить связанный азот в газообразный, и именно таким образом происходит **вынос азота из почвы**.

Микроорганизмы, осуществляющие нитратное дыхание, относятся к факультативным анаэробам и обладают полной дыхательной системой. Донором электронов обычно служит органическое вещество. Синтез мембрансвязанных нитрат- и нитритредуктаз индуцируется только в анаэробных условиях, а у некоторых микроорганизмов — еще и в присутствии нитрата. У бактерий существует два типа нитритредуктазы, катализирующей образование NO. Одна содержит цитохромы *c* и *d*₁ (как у *Pseudomonas aeruginosa*), другая является медь-содержащим белком (как у *Alcaligenes*). Нитритредуктаза грамотрицательных бактерий, возможно, находится в периплазме.

Процесс денитрификации необходимо учитывать в земледелии. Обеднение почвы азотом может активизироваться при неграмотном внесении удобрений и создании анаэробных условий. Одновременное внесение минеральных нитратов и навоза вместе в качестве удобрений при пониженном содержании кислорода в почве (например, после дождя) стимулирует мощную денитрификацию. Поэтому, чтобы не происходило выноса азота из почвы, необходима вспашка, т.е. создание аэробных условий, и раздельное использование минеральных и органических азотных удобрений.

Восстановление нитрата до аммония, который встраивается в органические молекулы при пластическом обмене, называется **ассимиляционной нитратредукцией**.

Она имеется у растений, грибов, бактерий и проходит с помощью совершенно других ферментов, находящихся в цитоплазме.

Интересно, что для млекопитающих NO является нейротрансмиттером, регулирующим кровяное давление, а также используется макрофагами для уничтожения бактерий и опухолевых клеток.

7.3.3. Сульфатное дыхание

При сульфатном дыхании конечным акцептором электронов служит сульфат. Физиологическую группу микроорганизмов, восстанавливающих сульфат, называют **сульфатредукторами**, или **сульфидогенами**. Эта группа объединяет представителей с разным систематическим положением, причем названия их родов часто начинаются с приставки *Desulfo*- (табл. 7.2). В отличие от нитратредукторов, все сульфатредукторы — облигатные анаэробы.

Некоторые сульфатредукторы различных таксономических групп

Представители родов	Краткое описание
Домен <i>Bacteria</i>	
Спорообразующие	
<i>Desulfotomaculum</i> <i>Desulfosporosinus</i>	Грамположительные, разные по морфологии микроорганизмы, образующие эндоспores. Есть представители, способные как к полному, так и к неполному окислению субстратов. Некоторые — автотрофы, азотфиксаторы, термофилы. Имеют цит <i>b</i> (<i>c</i>), не содержат десульфовиридина
Беспоровые	
<i>Desulfobacterium</i>	Мелкие палочки с полным окислением субстратов, некоторые — автотрофы
<i>Desulfococcus</i>	Кокки, полностью окисляющие субстраты
<i>Desulfonema</i>	Нити, передвигающиеся скольжением. Полностью окисляют ацетат
<i>Thermodesulfobacterium</i>	Термофильные палочки с неполным окислением субстратов
<i>Desulfosarcina</i>	Крупные кокки в кубовидных пакетах с полным окислением ацетата
<i>Desulfovibrio</i>	Подвижные вибрионы, содержащие цит <i>c</i> , <i>b</i> и десульфовиридин. Имеют незамкнутый ЦТК
Домен <i>Archaea</i>	
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	Архей с нерегулярной формой клеток из морского гидротермального источника. Кроме сульфата, хорошо восстанавливает тиосульфат с глюкозой, формиадом, лактатом, пируватом в качестве доноров электронов. H_2 может быть донором при росте с тиосульфатом, но не с сульфатом. Элементарную серу не восстанавливает

Сульфатное дыхание является **диссимиляционной сульфатредукцией**. Сульфат восстанавливается в соответствии со следующей реакцией:



Первая стадия диссимиляционного и ассимиляционного процессов одинакова, а все последующие проводятся разными ферментами (рис. 7.16).

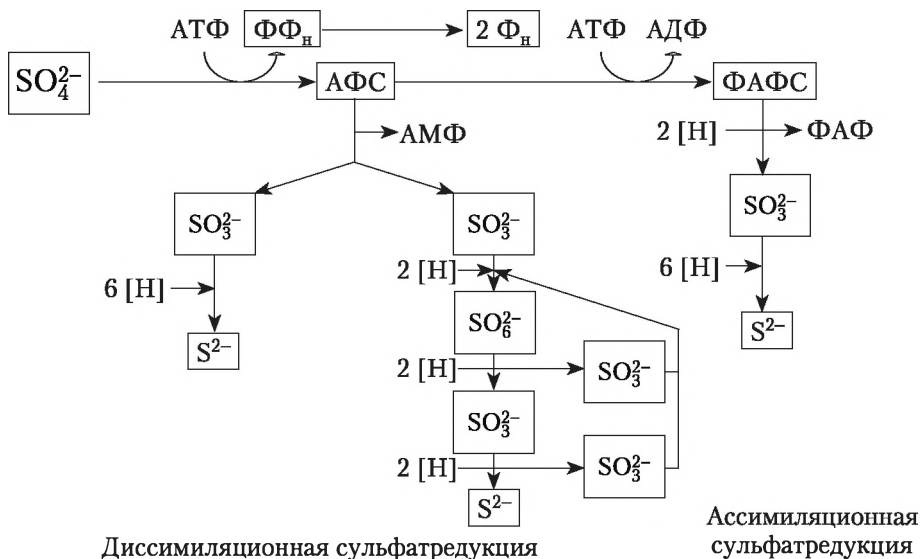


Рис. 7.16. Последовательность реакций при диссимиляционной и ассимиляционной сульфатредукции

Донорами электронов при сульфатном дыхании могут служить молекулярный водород, органические кислоты, спирты и другие органические соединения. Сульфатредукторы способны расти гетеротрофно, причем часть их окисляет органические вещества до воды и углекислого газа, а другие осуществляют неполное окисление с образованием ацетата из-за отсутствия α -кетоглутаратдегидрогеназы в ЦТК. При истощении сульфата и наличии органических веществ сульфатредукторы могут переходить на сбраживание молочной и пировиноградной кислот с образованием ацетата и H_2 . В таких условиях они становятся **синтрофами**, для которых обязательно присутствие группы микроорганизмов, потребляющих молекулярный водород. У автотрофных сульфатредукторов (H_2/CO_2 и SO_4^{2-}) присутствует ацетил-КоА-путь фиксации CO_2 (путь Вуда — Льюнгдала), такой же как у гомоацетогенов, с ключевым ферментом СО-дегидрогеназой-ацетил-КоА-синтазой.

Сульфатовосстанавливающие микроорганизмы обычно обитают в морских донных осадках и являются важным звеном глобального круговорота серы. Большая часть сероводорода в природе возникает именно благодаря сульфатному дыханию. Образующийся сульфид служит донором электронов при бактериальном фотосинтезе. В то же время накопление сероводорода в водоемах может вызывать замор рыб. Деятельность сульфатредукторов приводит к коррозии металла (рис. 7.17) и бетона. При тесном контакте клеток 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 целей анаболизма, либо связывается экстракеллюлярно с сульфидом, полученным в результате сульфатного дыхания. При этом структура металла разрушается.

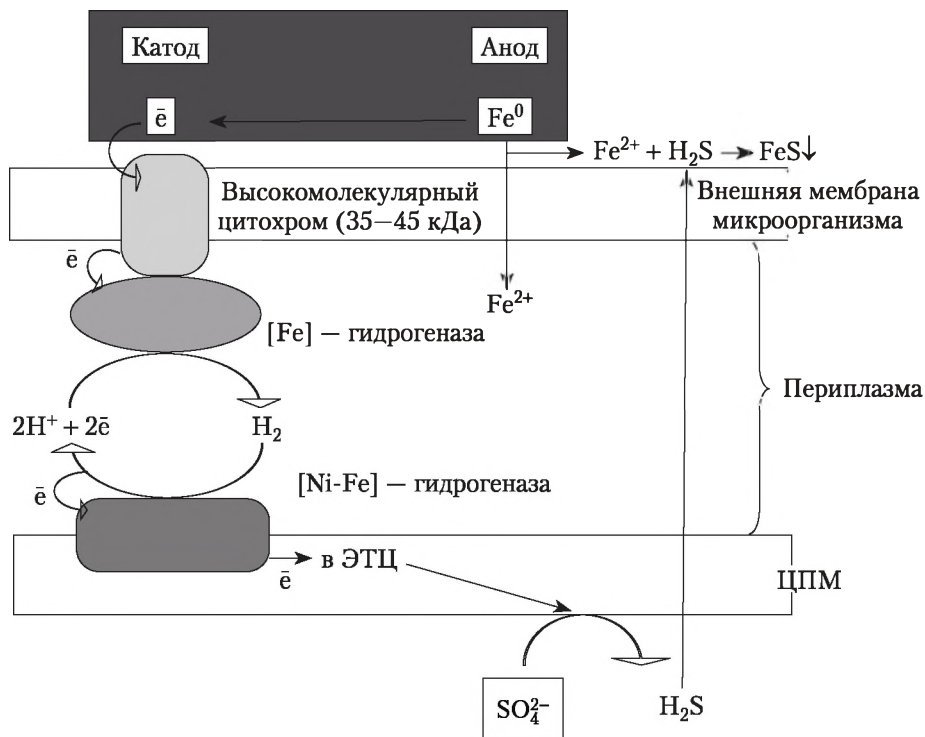


Рис. 7.17. Процесс разрушения железа сульфатредукторами

На нефтяных месторождениях биокоррозия труб нефтепроводов в незначительной степени связана с развитием на их внутренних поверхностях биопленок, содержащих клетки сульфатредукторов.

Помимо сульфатного дыхания, восстановление сульфата может осуществляться бактериями, грибами и растениями в процессе ассимиляционной сульфатредукции. В этом случае сера в виде сульфида затем включается в серосодержащие аминокислоты и белки.

7.3.4. Серное дыхание

Серное дыхание происходит в местообитаниях, связанных с вулканической деятельностью, где в анаэробных условиях много абигенной элементарной серы. Больше всего восстанавливающих серу микроорганизмов обнаружено среди архей-экстремофилов. Это представители родов *Thermoproteus*, *Pyrobaculum*, *Desulfurococcus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*, *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Sulfurococcus* и других, входящих в класс *Thermoprotei* филума *Crenarchaeota*, а также эвриархеот родов *Thermococcus*, *Pyrococcus*, относящихся к классу *Thermococci*, и рода *Thermoplasma*, входящего в класс *Thermoplasmata*. Среди них имеются как авто-, так и гетеротрофы. Многие из архей, способных к серному дыханию, отличаются также термофилией (до 113°C) и ацидофилией (до pH = 1,0÷1,5). Представители родов *Sulfolobus* и *Sulfurococcus* в аэробных условиях могут использовать элементарную серу в качестве донора электронов, окисляя ее для получения

энергии. Из домена *Bacteria* наиболее изучен род *Desulfuromonas* и его представитель *D. acetoxidans*. Это палочковидные клетки с латерально расположенным жгутиком, окисляющие ацетат или этанол до углекислого газа и воды. Они синтезируют низкопотенциальный цитохром c_7 , FeS-белки и ферменты ЦТК. В природе эти микроорганизмы живут в синтрофных ассоциациях с фототрофными серобактериями, использующими сероводород в качестве донора электронов при фотосинтезе (рис. 7.18).

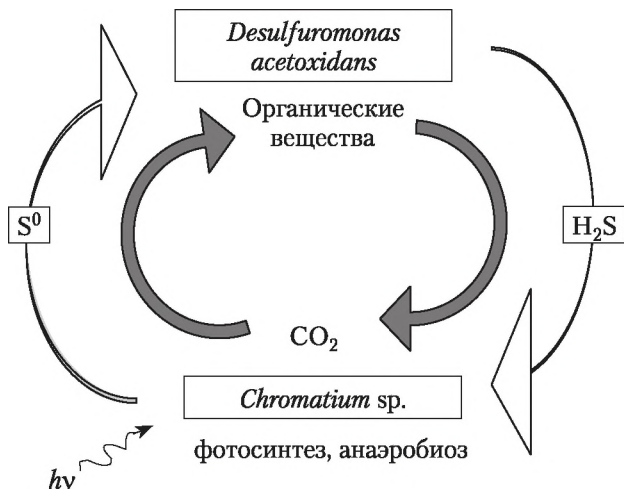
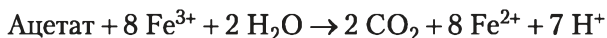


Рис. 7.18. Микроциклы серы и углерода в синтрофных ассоциациях *D. acetoxidans* с аноксигенными фототрофами

7.3.5. «Железное» дыхание

«Железное» дыхание — это восстановление Fe^{3+} в Fe^{2+} в ЭТЦ, сопряженное с получением энергии. Соединения железа широко распространены в природе в виде различных минералов (гематита, ферригидрита, магнетита, пирита и др.) и $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Восстановление Fe^{3+} в Fe^{2+} является термодинамически выгодным процессом, так как ОВП пары +770 мВ, однако при нейтральном pH соединения трехвалентного железа практически нерастворимы в воде ($K_p = 10^{-18}\text{М}$) и клетки постоянно испытывают дефицит внеклеточного акцептора электронов. В связи с этим, чтобы добыть и доставить Fe^{3+} , микроорганизмы должны использовать сидерофоры. Интересно, что теоретически при восстановлении трехвалентного железа и использовании ацетата в качестве донора электронов может быть синтезировано ≈ 11 молекул АТФ:



($\Delta G^{0'} = -815$ кДж/моль ацетата). Однако при $\text{pH} = 7,0$ на практике $\Delta G^{0'}$ не превышает -34 кДж/моль ацетата, т.е. энергии едва хватает на одну молекулу АТФ. Синтез АТФ, сопряженный с восстановлением Fe^{3+} , осуществляют представители семейства *Geobacteriaceae* — *Geobacter metallireducens* и *G. sulfurreducens*, причем последний способен также восстанавливать S^0 . Цепь переноса электронов при «железном» дыхании изображена на рис. 7.19.

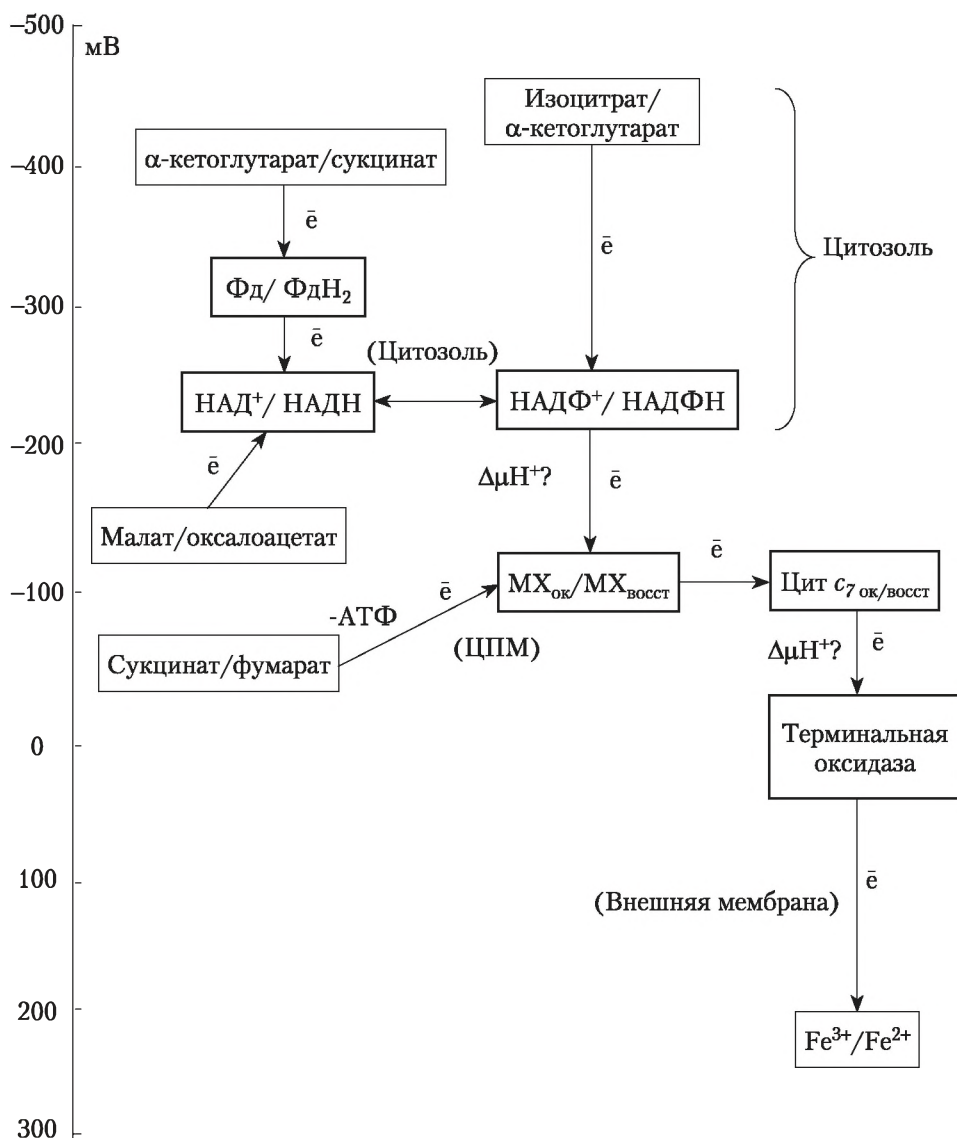


Рис. 7.19. ЭТЦ «железного» дыхания у бактерий рода *Geobacter*

Восстановленный продукт «железного» дыхания (Fe^{2+}) обнаруживается вне клетки, хотя механизм его выброса в среду неизвестен.

Считают, что «железное» дыхание — эволюционно более древнее, чем сульфатное, нитратное и аэробное дыхание, и возникло на ранней стадии развития жизни на Земле, еще в условиях «восстановленной» атмосферы. К восстановлению трехвалентного железа способны микроорганизмы родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Serratia*, но не доказано, что этот процесс связан у них с получением энергии. Также описаны микроорганизмы, способные восстанавливать четырехвалентный марганец в двухвалентный.

7.3.6. Фумаратное дыхание

Одним из распространенных видов дыхания, где конечным акцептором служит органическое вещество, является **фумаратное дыхание**. К нему способны практически все микроорганизмы, имеющие сукцинатдегидрогеназу, осуществляющую реакцию: $2[H^+] + \text{фумарат} \rightarrow \text{сукцинат}$. Это, например, энтеробактерии, бактерии родов *Vibrio* и *Propionibacterium*. В этом случае формируется короткая ЭТЦ с одним пунктом сопряжения, в котором происходит окислительное фосфорилирование. К фумаратному дыханию способны также некоторые факультативно анаэробные черви (*Ascaris*, *Fasciola*, *Arenicola*).

7.3.7. Карбонатное дыхание

Карбонатным дыханием называют анаэробное дыхание, где конечным акцептором электронов служит углекислый газ (или CO). Группой микроорганизмов, использующих в метаболизме **карбонатное дыхание** и синтезирующих в автотрофных условиях клеточное вещество по пути Вуда — Льюнгадала (ацетил-КоА-пути), являются **гомоацетогенные бактерии**. Второй большой 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 и повсеместно распространенные в анаэробных местообитаниях.

Метаногенные археи группируются в три класса:

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. *Methanosaetaceae*
- Род 1. *Methanosaeta*
- Класс 3. *Methanopyri*
- Порядок 1. *Methanopyrales*
- Семейство 1. *Methanopyraceae*
- Род 1. *Methanopyrus*

Метаногены считаются древнейшими организмами в истории Земли, которые могли зародиться тогда, 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. В их клеточных стенках содержится псевдомуреин, пептиды и(или) полисахариды. Метаногены синтезируют ряд специфических кофакторов, которые флуоресцируют сине-зеленым светом под действием ультрафиолета. Это коэнзимы М и В, никель-корриноид F_{430} , метанофуран и метаноптерин, производное 5-деа-зофлавина — F_{420} . Кофакторы метаногенеза очень чувствительны к кислороду, но могут длительно сохраняться без доступа кислорода и воды. Они найдены в глубоких нефтяных пластах, что также является одним из свидетельств древности метаногенов.

Метаногены могут расти при средних и экстремально высоких температурах. Лишь небольшая их часть способна к психротрофии. Истинных психрофилов среди метаногенов не обнаружено. Метаногены потребляют довольно узкий набор питательных субстратов. В автотрофных условиях (H_2/CO_2 , CO — I группа субстратов) органическое вещество у них синтезируется по ацетил-КоА-пути, причем только 5% поглощенного углекислого газа идет на биосинтез. 95% CO_2 используется для получения энергии в процессе карбонатного дыхания и восстанавливается до метана. В качестве донора электронов при этом используется молекулярный водород, поэтому процесс получил название **водородотрофного (гидрогенотрофного) метаногенеза** (рис. 7.20).

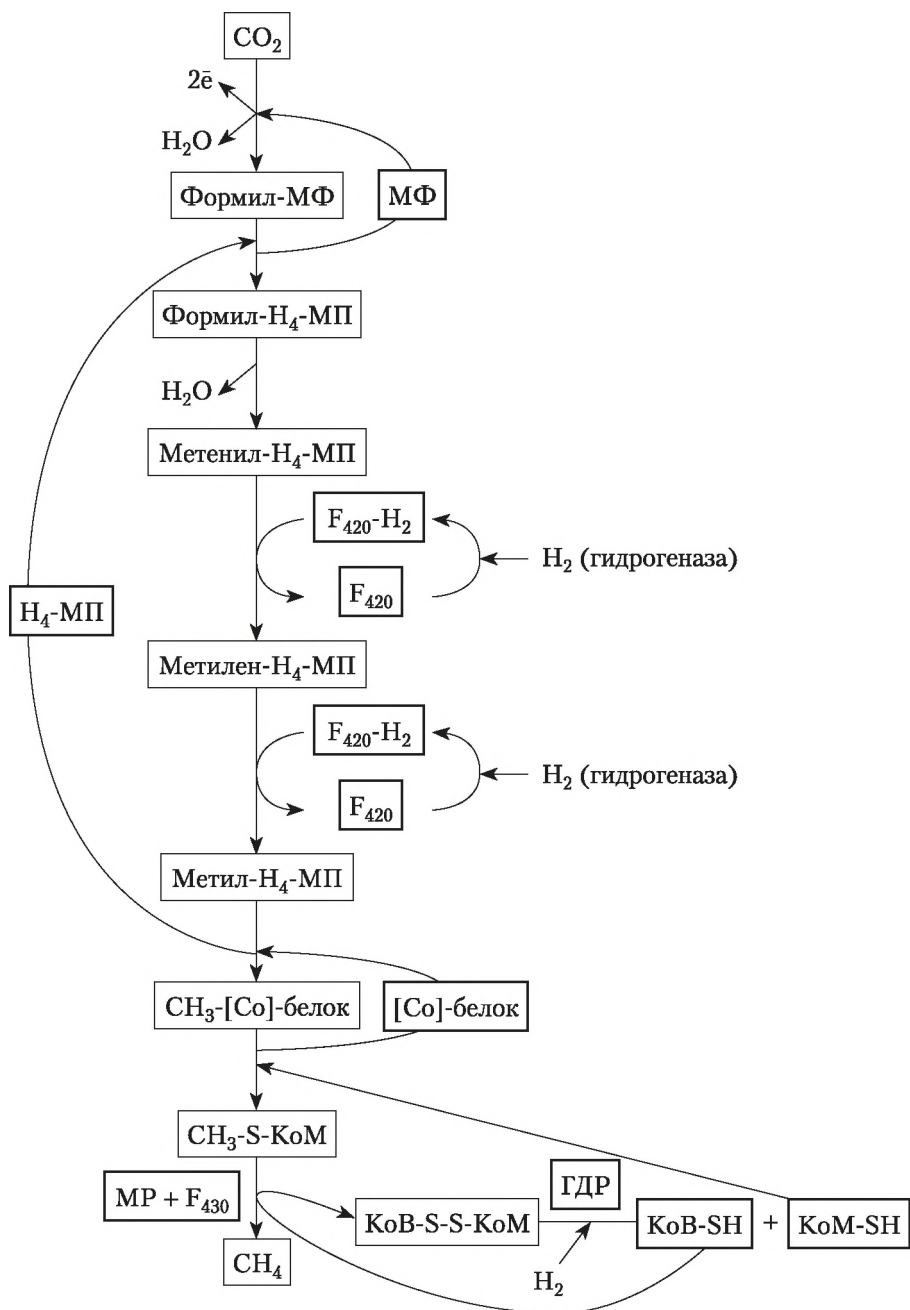


Рис. 7.20. Водородотрофный метаногенез:

МП — метаноптерин; МР — метилредуктаза; ГДР — гетеродисульфидредуктаза;
КоМ и КоВ — коферменты М и В; МФ — метанофуран

В гетеротрофных условиях роста метаногены способны использовать только уксусную кислоту (II группа субстратов), осуществляя **ацетокла-стический метаногенез** (рис. 7.21).

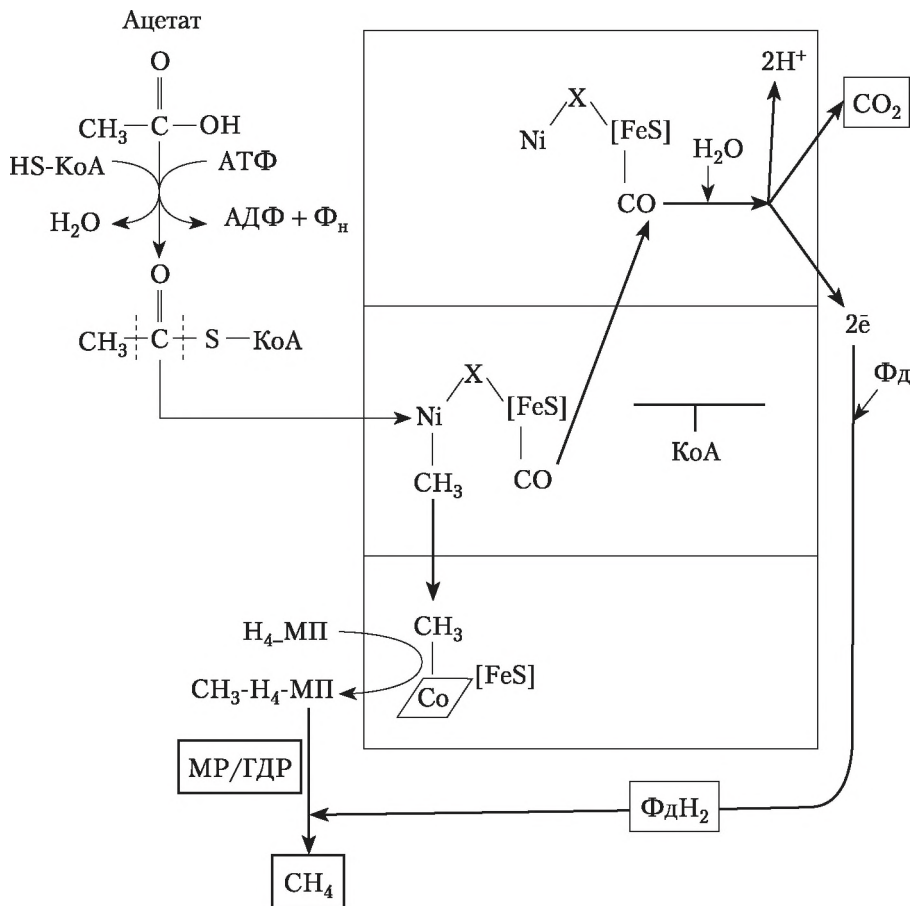


Рис. 7.21. Ацетокластический метаногенез:

МП — метаноптерин; МР — метилредуктаза; ГДР — гетеродисульфидредуктаза;
 КоМ и КоВ — коферменты М и В; МФ — метанофуран

Этот процесс был описан Р. Баркером еще в 1956 г., но его расшифровка произошла только в конце XX в. До сих пор не показано, является ли основной комплекс ацетокластического метаногенеза одним ферментом с тремя активными центрами (как СО-дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза у гомоацетогенов) или это три разных фермента. Также неизвестно, способна ли СО-дегидрогеназа-ацетил-КоА-синтаза гомоацетогенов катализировать обратную реакцию, приводящую к расщеплению ацетил-КоА. Особым случаем гетеротрофии, при котором потребляются органические одноуглеродные соединения (без С—С-связей), является свойственная метаногенам **метилотрофия**. С₁-соединения представляют у метаногенов III группу субстратов. Это формиат, метанол, метиламин, ди- и триметиламины и т.д. Особенно важен для метаногенов метанол (рис. 7.22), так как он в значительных количествах образуется в анаэробных зонах при гидролизе широко распространенных природных биополимеров пектина и лигнина.

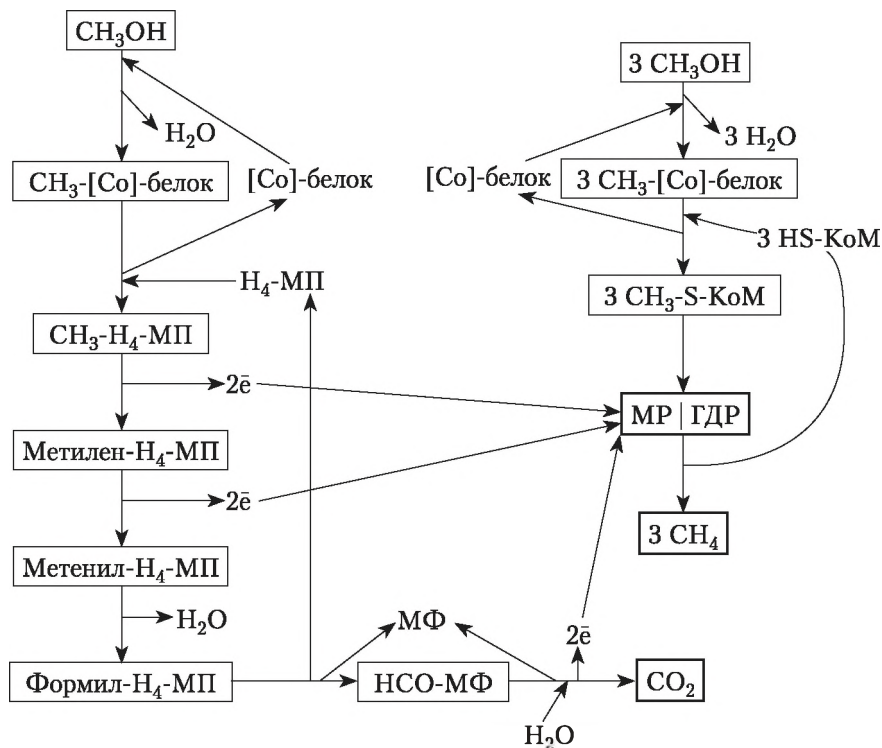
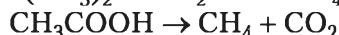
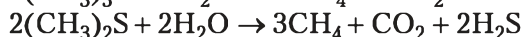
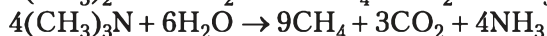
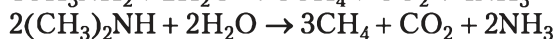
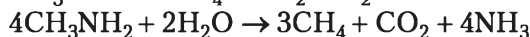
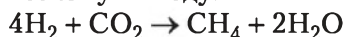


Рис. 7.22. Метаногенез на метаноле:

МП — метаноптерин; МР — метилредуктаза; ГДР — гетеродисульфидредуктаза;
КоМ — кофермент М; МΦ — метанофуран

Реакции, приводящие к образованию метана, различаются по энергетическому выходу:



$$\Delta G^{\circ'} = -135 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -130 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -104 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -75 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -73 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -74 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -73 \text{ кДж/моль метана}$$

$$\Delta G^{\circ'} = -31 \text{ кДж/моль метана}$$

Классы *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri* объединяют метаногенных архей, образующих метан на H_2/CO_2 , формиате, ацетате, метаноле, метиламинах и H_2 /метаноле, однако скорость роста на разных субстратах может различаться. Представители семейства *Methanosetaeaceae* используют в качестве субстрата метаногенеза преимущественно ацетат — самый энергетически невыгодный питательный субстрат.

Метаногенные археи занимают важное место в природных экосистемах. Метаногенез активно идет на рисовых полях, причем 90% образованного метана попадает в атмосферу через сосудистую систему растений риса. Источниками метана являются рубец жвачных животных (корова выделяет

до 900 л метана в день), кишечник лошадей и других млекопитающих (примерно 70% людей имеют метаногенов в кишечной микробиоте), а также кишечник термитов. **Биогаз**, состоящий на 60–70% из CH_4 и 40–30% из CO_2 , образуется метаногенами на дне пресноводных водоемов и, поднимаясь вверх, попадает в аэробную зону, где обычно используется метанокисляющими микроорганизмами. Метан попадает в атмосферу также при разработке угольных шахт, через разломы на дне океанов и при вулканической деятельности. Еще один источник образования метана — это искусственные сооружения для очистки стоков и получения биогаза (анаэробные реакторы и метантенки), а также свалки твердых бытовых отходов.

Обычно в анаэробных пресноводных местообитаниях метаногены являются последним звеном пищевой цепи разрушения биологических полимеров, т.е. в этих условиях они завершают цикл углерода на Земле. В морских водоемах метанобразующие археи также присутствуют, но не доминируют, так как сульфатредукторы побеждают их в борьбе за ацетат и молекулярный водород. Сульфатредукторы эффективней получают энергию, имея полную ЭТЦ, заканчивающуюся сульфатом. Они имеют более высокое сродство к молекулярному водороду и поэтому могут полнее его использовать при низких концентрациях. Ацетат у них окисляется полностью через ЦТК. В то же время метаногены всегда представлены в морских донных осадках, так как способны использовать распространенные в водоемах метиламины, которые не являются питательными субстратами для сульфатредукторов. Некоторые анаэробные реснитчатые простейшие могут жить с метаногенами в тесном экзо- и эндосимбиозе (при этом на одну клетку простейшего может приходиться до 700 клеток метанобразующих архей).

Метан — это один из газов, ответственных за «парниковый эффект». Он обладает высокой отражающей способностью и значительным временем жизни в атмосфере (8–10 лет). Из всего выделяемого в год метана ($670\text{--}1600 \cdot 10^{12}$ г) «живой» и «мертвый» метан составляют соответственно $312\text{--}755 \cdot 10^{12}$ г и $355\text{--}870 \cdot 10^{12}$ г. Концентрация метана в атмосфере равна $1,75 \text{ млн}^{-1}$ (ppm) в Северном полушарии и $1,67 \text{ ppm}$ — в Южном. Присутствие $1,3 \text{ ppm}$ метана вызывает на Земле потепление на $1,3^\circ\text{C}$.

7.4. Модификации аэробного дыхания

7.4.1. Основные понятия

При **аэробном дыхании** молекулярный кислород является конечным акцептором электронов в ЭТЦ, поэтому он необходим для роста облигатно аэробных микроорганизмов. При таком конечном акцепторе (ОВП пары $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} + 810 \text{ мВ}$) получается существенный выигрыш энергии по сравнению с брожением и анаэробным дыханием. Аэробный метаболизм часто включает в себя бескислородные стадии (например, **гликолиз** и **молочнокислое брожение** в мышцах), но исключительно за счет них аэробные организмы не могут обеспечить себя энергией. 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). Дыхание большинства микроорганизмов в принципе не отличается от процесса в митохондриях (рис. 7.23).

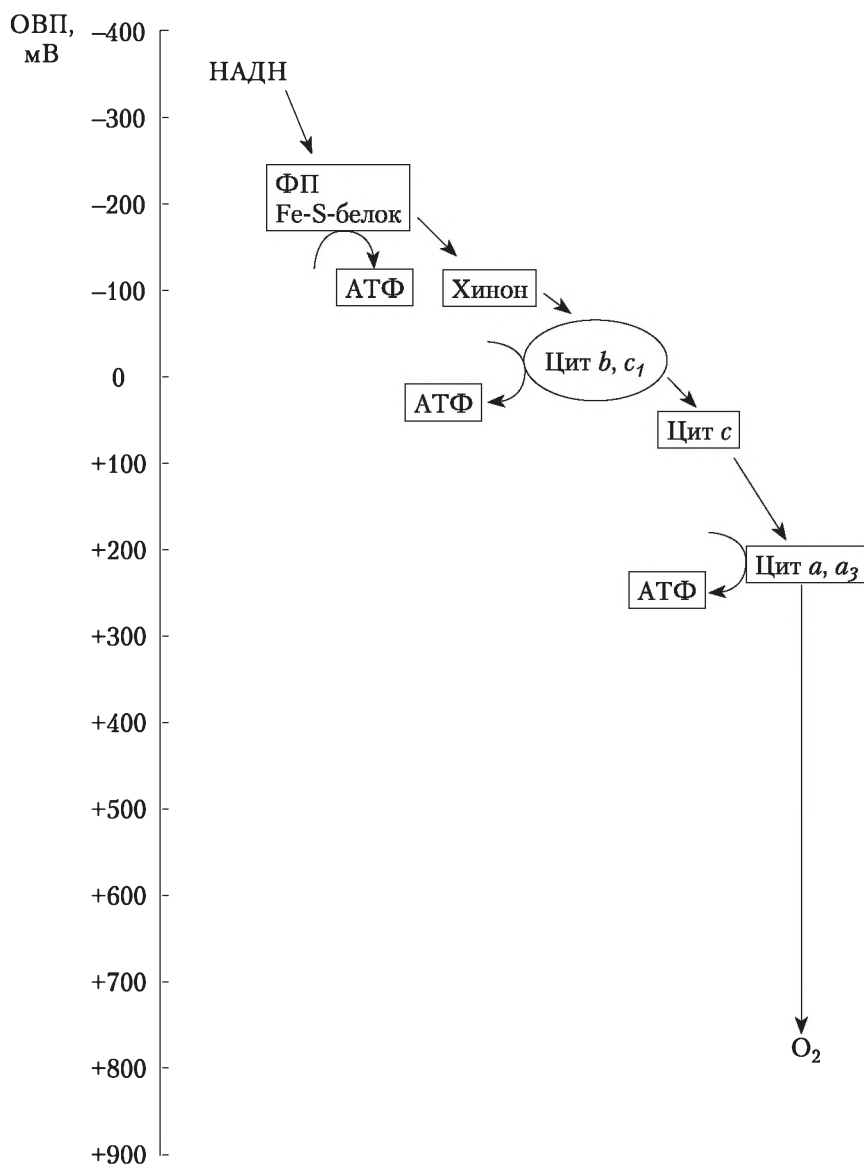


Рис. 7.23. ЭТЦ митохондрий

Однако, в зависимости от условий роста у микроорганизмов ЭТЦ может модифицироваться. В большинстве случаев питательные субстраты окисляются при участии НАД⁺-зависимых дегидрогеназ, отдающих электроны пиридиннуклеотидам. Если микроорганизм использует вещество, передающее электроны в ЭТЦ на уровне других переносчиков, то пунктов сопряжения в такой укороченной цепи будет меньше. Например, у метилотрофов,

растущих на метаноле, электроны поступают на цитохромы, количество которых существенно возрастает. ЭТЦ у кишечной палочки в терминальном участке образует разветвление (рис. 7.24).

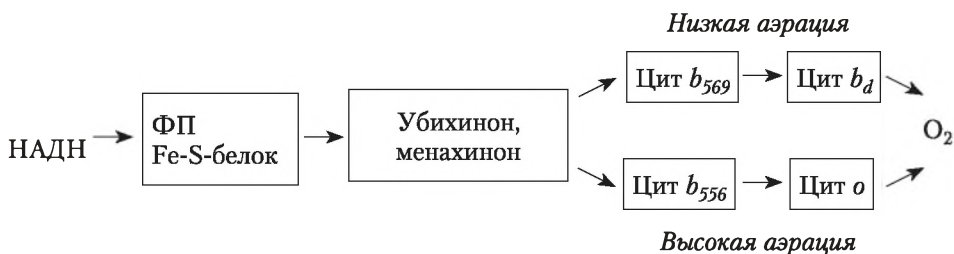


Рис. 7.24. Разветвленная ЭТЦ у *E. coli*

Микроорганизмы обладают широкими возможностями в использовании различных доноров электронов при аэробном дыхании.

7.4.2. Особенности использования многоуглеродных субстратов микроорганизмами

Окисление многоуглеродного субстрата начинается с его преобразования в вещество, которое клетка способна транспортировать внутрь и с которым смогут работать клеточные ферменты. У микроорганизмов подготовительными реакциями использования биополимеров будут реакции гидролиза с помощью выделяемых в среду ферментов. Так, для окисления белков некоторые патогенные, портящие продукты, почвенные бактерии и грибы синтезируют внеклеточные протеазы, которые гидролизуют белки до коротких пептидов и аминокислот. Разложение белка микроорганизмами (**аммонификация**) всегда сопровождается образованием ряда продуктов: аммиака при дезаминировании аминокислот, сероводорода при расщеплении серосодержащих аминокислот (метионина, цистеина и их производных) и индола при распаде триптофана. При этом происходит подщелачивание среды. Аминокислоты дезаминируются с образованием органических кислот (пирувата, ацетата и интермедиатов ЦТК) и в виде ацетил-КоА 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.

У многих аэробных и анаэробных почвенных и фитопатогенных бактерий (цитобаг, миксобактерий, клостридий, эрвиний) и грибов имеются экзоферменты для гидролиза целлюлозы, ксилана древесины и луба, крахмала, пектина, агара, хитина, лигнина. Образовавшиеся при гидролизе дисахариды далее подвергаются либо гидролизу, либо фосфоролиту. Моносахара превращаются в пируват по одному из рассмотренных ранее путей: гликолизу, пентозофосфатному или КДФГ-пути. В аэробных условиях ацетил-КоА образуется из пирувата с помощью пируватдегидрогеназного комплекса с тиамином (B_1) в качестве кофермента.

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, метаболизируемого в цикле Кребса.

Ароматические соединения сначала подвергаются атаке моно- или диоксигеназ, внедряющих в бензольное кольцо один или два атома кислорода, соответственно. Образовавшаяся β -кетoadипиновая кислота или ее производное затем расщепляется до линейного продукта, который разлагается на ацетил-КоА и сукцинат, окисляющиеся в ЦТК.

Предельные и непредельные углеводороды (кроме одноуглеродных соединений) используются почвенными микроорганизмами разных групп. Сначала они окисляются до соответствующих жирных кислот с помощью оксигеназ, а затем подвергаются β -окислению.

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

Многоуглеродные субстраты могут при дыхании подвергаться полному или неполному окислению. При **полном окислении** единственным окисленным продуктом будет CO_2 , а конечным этапом окисления, как правило, цикл Кребса. В качестве альтернативных путей конечного окисления следует назвать цикл дикарбоновых кислот у *E. coli* (рис. 7.25) и окислительный пентозофосфатный путь (Варбурга — Диккенса — Хорекера) у бактерий рода *Glucanobacter*. В последнем случае, чтобы молекула гексозы окислилась полностью, цикл должен «прокрутиться» шесть раз.

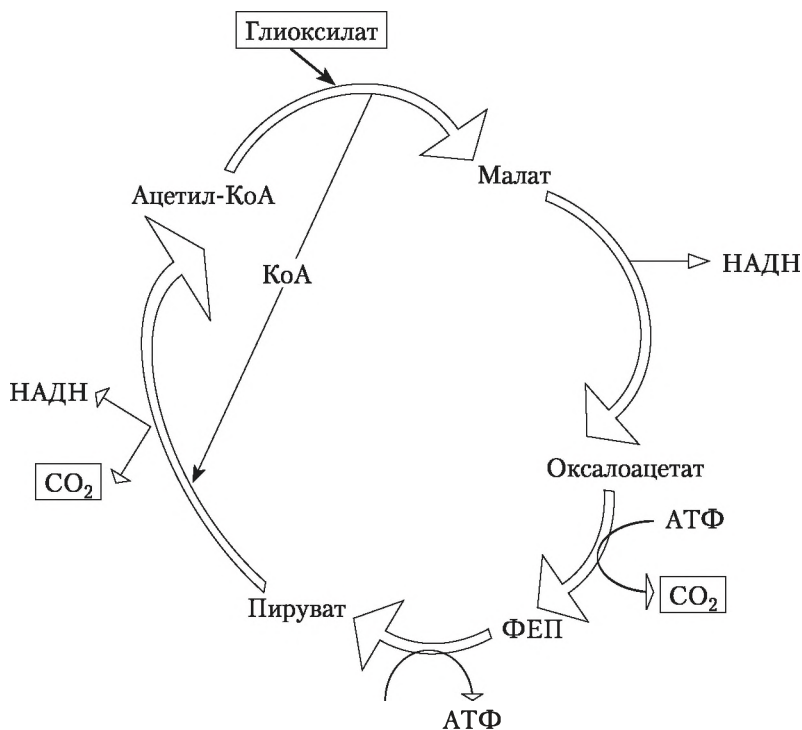


Рис. 7.25. Цикл дикарбоновых кислот у *E. coli*

При **неполном окислении** питательного субстрата в качестве конечных продуктов в среду выделяются наряду с углекислым газом различные органические соединения, часто схожие с продуктами некоторых брожений. Неполное окисление многоуглеродных органических субстратов происходит либо из-за дефектов ферментных систем микроорганизмов, либо в результате существенного замедления их работы из-за неоптимальности условий культивирования. Типичными представителями микроорганизмов, осуществляющих неполные окисления, являются **уксуснокислые бактерии**. Эти грамотрицательные мелкие палочки широко распространены в природе и живут на листьях растений. Они устойчивы к кислотам (до $\text{pH} = 3\text{--}5$) и к этанолу (до $9\text{--}10\%$). Уксуснокислые бактерии способны образовывать органические кислоты путем неполного окисления сахаров и спиртов. Наиболее известны два рода: *Acetobacter* с перитрихальным жгутикованием и *Gluconobacter* с полярно расположенными жгутиками. У представителей рода *Acetobacter* высокая активность алкогольдегидрогеназы сочетается с низкой активностью ферментов ЦТК, а у бактерий рода *Gluconobacter* отсутствует ключевой фермент ЦТК α -кетоглутаратдегидрогеназа. Уксуснокислые бактерии используют в биотехнологии для превращения этанола в ацетат, сорбита в сорбозу, образования глюконата и ацетона.

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

7.4.3. Микробная биолюминесценция

Одна из групп микроорганизмов, использующих многоуглеродные субстраты, отличается уникальной способностью к биолюминесценции и называется **светящимися бактериями**, или **фотобактериями**. Большинство фотобактерий — это выделенные из морских вод хемоорганотрофы, сходные с представителями семейства *Enterobacteriaceae*. Они представляют собой грамотрицательные, факультативно анаэробные палочки, передвигающиеся с помощью жгутиков, склонные к психрофилии и галофилии. В анаэробных условиях они осуществляют смешанное брожение. По большей части, это свободноживущие микроорганизмы, но есть среди них и симбионты морских животных (рыб и моллюсков). Например, *Photobacterium phosphoreum* и *P. leiognathi* живут в светящихся органах рыб. Обычно бактерии испускают сине-зеленый свет ($472\text{--}505\text{ нм}$), но один из штаммов *Vibrio fischeri* светится желтым светом с длиной волны 545 нм .

Свечение наблюдается только в присутствии кислорода и осуществляется совместно с аэробным дыханием (рис. 7.26). У фотобактерий имеется обычная дыхательная цепь и цикл Кребса. Свет испускает возбужденный флавин под действием фермента люциферазы при окислении альдегида с 13–18 атомами углерода в молекуле.

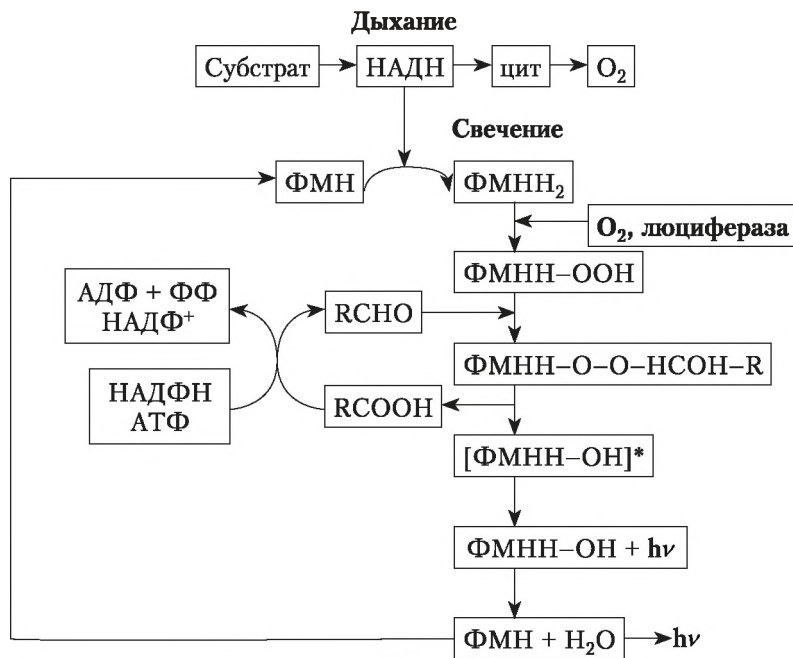


Рис. 7.26. Реакции, приводящие к испусканию света, и их связь с дыхательной цепью

Люцифераза — это двухсубъединичный фермент, похожий на монооксигеназу. Гены, кодирующие функцию свечения, расположены тесной группой и образуют *lux-оперон*. В биоинженерных работах его часто применяют в качестве **репортерного**, т.е. «сообщающего» свечением, что введенные гены успешно транскрибируются и транслируются в клетке.

Биологический смысл свечения пока неясен. Есть гипотеза, что это защита от перекисления: когда накапливается много восстановленных пиридиннуклеотидов, срабатывает «отводной канал», электроны сбрасываются на флавин и высвечиваются. Другая гипотеза объясняет свечение как защитную реакцию против активных форм кислорода (перекиси, супероксидрадикала). Способностью к свечению обладают представители родов *Photobacterium*, *Beneckia*, *Vibrio*, *Photorhabdus*. Фотобактерии обнаружены также в пресных водах и в почве. Например, светящиеся почвенные бактерии рода *Xenorhabdus* не требуют присутствия повышенной концентрации Na⁺ и развиваются при средних значениях температуры. Возможно, свойство светиться не связано с определенными таксономическими группами. Показано также, что свечение (особенно у симбиотических бактерий) подчинено эффекту «кворума», т.е. зависит от пороговой плотности популяции.

Система люциферазы очень чувствительна к различным загрязнениям, поэтому светящиеся микроорганизмы можно использовать в неизбирательных экспресс-тестах на общую токсичность.

7.4.4. Метилотрофия (использование одноуглеродных соединений)

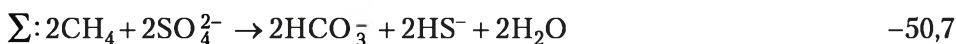
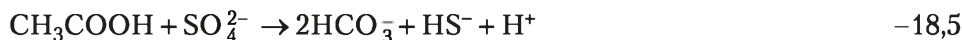
Использование одноуглеродных соединений микроорганизмами (**метилотрофия**) характеризуется определенными особенностями их метаболизма. Одноуглеродными (C_1) соединениями называют такие углеродсодержащие вещества, в состав молекулы которых входит один или несколько атомов углерода, не связанных $C-C$ -связями.

Физиологическая группа, способная расти на одноуглеродных соединениях, называется **метилотрофными микроорганизмами**.

Наибольшее значение имеют такие C_1 -соединения, как метан, выделяемый метаногенами, метанол, образуемый при разложении пектина и лигнина, продукт смешанного брожения формиат и метиламины, получающиеся при гибели морских животных. Триметиламин образуется из N -оксида триметиламина, который синтезируется у морских обитателей как осморегулятор, поддерживающий в цитоплазме их клеток осмотическое равновесие. Поскольку это соединение является универсальным акцептором электронов (+730 мВ), то после гибели морских животных происходит его восстановление в триметиламин, имеющий запах тухлой рыбы. Формальдегид в природе в свободном виде не встречается. Формиат никогда не накапливается в больших количествах.

В анаэробных условиях C_1 -соединения используются различными группами микроорганизмов. Метан в отсутствие кислорода может окисляться до CO_2 только ассоциацией по крайней мере двух микроорганизмов — метаногенного архея и сульфатредуцирующей бактерии, и **анаэробное окисление метана** количественно связано с восстановлением сульфата. Поскольку по современным представлениям минимальное количество свободной энергии для одного организма должно составлять ≈ 20 кДж на реакцию, то предполагают, что этот процесс может происходить следующим образом:

$\Delta G^\circ'$ (кДж/моль)



В такой системе метан — единственный источник углерода для обоих микроорганизмов, а сульфат — единственный акцептор электронов. Биохимия этого процесса пока не известна, и микроорганизмы не выделены

в чистой культуре, но их систематическое положение установлено с помощью молекулярно-генетических методов.

Сравнительно недавно был открыт процесс анаэробного окисления метана, сопряженного с денитрификацией, DAMO (*denitrifying anaerobic methane oxidation*). Он обнаружен в морских и почвенных природных и антропогенных местообитаниях. DAMO-микроорганизмы относятся к некультивируемым формам и включены в новый филум NC10. В пробах их клетки выглядят как многоугольники, что нетипично для живой материи. Окисление метана происходит по интра-аэробному механизму, когда молекулярный кислород образуется в процессе реакции дисмутации оксида азота (NO), полученной из нитрита при участии нитритредуктазы. Часть такого эндогенного кислорода используется для окисления метана.

Метанол в анаэробной зоне используется сульфатредукторами, гомоацетогенами или метаногенами. Формиат может расщепляться самими энтеробактериями, образующими его при смешанном брожении.

Окисление метана в аэробных условиях происходит в соответствии со схемой



Метилотрофы подразделяют на факультативных и облигатных. Факультативные метилотрофы способны использовать как одно-, так и многоуглеродные соединения. Облигатные метилотрофы растут только на C₁-соединениях. Среди них выделяют группу, способную окислять только метан (**метанотрофы**). Другие одноуглеродные соединения (обычно метанол) они окисляют значительно реже и менее эффективно.

Первый метилотрофный микроорганизм *Bacillus methanica* (*Methylobacillus methanicus*) был описан еще в 1906 г. До 1970 г. имелось всего пять чистых культур метилотрофов, так как их выделение представляло значительную трудность из-за постоянного присутствия микроорганизмов-спутников, например, олиготрофных бактерий рода *Nyphomicrobium*. Массовое получение чистых культур метилотрофов началось с развитием техники микробиологических посевов и появлением ламинарных боксов, микроманипуляторов, силикагелевых пластинок. Выделение этих микроорганизмов из отдельных колоний обычно ведут на силикагелевых пластинках, не содержащих органических соединений, тонкими иглами под микроскопическим контролем в ламинаре.

Метанотрофы отличаются высоким сродством к метану ($K_{\text{CH}_4} = 0,1 \div 30 \text{ } \mu\text{M}$) и кислороду ($K_{\text{O}_2} = 0,14 \div 0,18 \text{ } \mu\text{M}$), высокой скоростью окисления метана ($V_{\text{max}} = 10 \div 31 \text{ mM CH}_4 \text{ г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$) и небольшой скоростью роста ($\mu = 0,02 \div 0,07 \text{ ч}^{-1}$). Они предпочитают среды с пониженным содержанием O₂ (0,45–20%), являясь микроаэрофилами. Большинство из них — мезофилы и нейтрофилы, но некоторые виды растут при 62°C, есть ацидо- (до pH 5) и алкалифильные (до pH 10) представители. Члены четырех родов способны к азотфиксации.

Метанотрофы — это граммотрицательные микроорганизмы, обладающие хорошо развитой системой внутрицитоплазматических мембран, на типе которой и строится их первичная классификация. I тип представляет собой стопки «тарелочек» и характерен для семейства *Methylococcaceae*. II тип этой

системы состоит из мембран, параллельных ЦПМ и не пересекающих центр клетки, и встречается в семействах *Methylosinaceae* и *Methylocystaceae*. Члены родов *Methylocella* и *Methylocapsa*, входящие в семейство *Beijerinckaceae*, обладают уникальной системой в виде мембранных везикул, однако их пока относят к группе, имеющей II тип мембранной системы. Все метанотрофы группируются в классы *Alpha*- и *Gamma*proteobacteria филума *Proteobacteria*. Для метанотрофов характерно наличие сложных и разнообразных поверхностных структур: капсул, трубчатых и бокаловидных выростов, микрофибрилл и регулярных слоев. Ряд важных дифференцирующих признаков родов метанотрофов перечислен в табл. 7.3.

Таблица 7.3

Классификация и некоторые основные свойства групп метанотрофов

I тип мембран (входят в класс <i>Gamma</i> proteobacteria, семейство <i>Methylococcaceae</i>)						
Признак	<i>Methylo-</i> <i>monas</i>	<i>Methylo-</i> <i>bacter</i>	<i>Methylo-</i> <i>coccus</i>	<i>Methylo-</i> <i>microbium</i>	<i>Methylo-</i> <i>sphaera</i>	<i>Methylo-</i> <i>caldium</i>
Форма клеток	Палочки, большинство подвижны	Палочки, кокки, некоторые подвижны	Кокки, овалы, неподвижны	Палочки, подвижны	Кокки, неподвижны	Палочки, кокки, некоторые подвижны
Стадия покоя	Незрелые цисты	Зрелые цисты (как у азотобактера)	Незрелые цисты	Нет	Нет	Незрелые цисты
РубисКО	–	–	+	–	–	+
РМФ-путь	+	+	+	+	+	+
Сериновый путь	–	–	+	–	–	+
Мембрансвязанная ММО	+	+	+	+	+	+
Растворимая ММО	–/+	–	+/-	–/+	+	–
ЦТК	Неполный (без α -КГДГ)				?	Неполный (без α -КГДГ)
Азотфиксация	–	–	–	–	+	–
Температура роста	25–40°C	20–40°C	37–62°C	20–35°C	0–21°C	30–62°C

II тип мембран (входят в класс <i>Alphaproteobacteria</i>)			
Признак	Семейство <i>Methylosinaceae</i> , род <i>Methylosinus</i>	Семейство <i>Methylocystaceae</i> , род <i>Methylocystis</i>	Семейство <i>Beijerinckaceae</i> , род <i>Methylocella</i>
Форма клеток	Вибриониды, образуют розетки, подвижны	Вибриониды и овалы, иногда образуют розетки, неподвижны	Кокки, изогнутые палочки, неподвижны
Стадия покоя	Экзоспores	Липидные цисты	Экзоспores
РубисКО	—	—	Нет данных
РМФ-путь	—	—	—
Сериновый путь	+	+	+
Растворимая ММО	+/-	+/-	+
Мембрансвязанная ММО	+	+	—
ЦТК	Полный		Нет данных
Азотфиксация	+	—	Нет данных
Температура роста	15—35°C	15—35°C	15—35°C

Примечания. ММО — метанмонооксигеназа; ЦТК — цикл трикарбоновых кислот; α -КГДГ — α -кетоглутаратдегидрогеназа.

В энергетическом метаболизме первая реакция окисления метана до метанола происходит при участии фермента **метанмонооксигеназы** (ММО). Обычно этот фермент мембрансвязанный, растворимая форма ММО у метанотрофов встречается реже. У бактерий родов *Methylocella* и *Methylocapsa*, наоборот, присутствует только растворимая ММО и пока не обнаружена мембрансвязанная. Монооксигеназа встраивает один атом кислорода в молекулу метана, а второй с затратой двух электронов и двух протонов от донора-восстановителя идет на формирование молекулы H_2O . При работе фермента расходуется энергия, которую клетка получает в дальнейших реакциях окисления с помощью дегидрогеназ метанола, формальдегида и формата.

Метанол образуется и окисляется в периплазматическом пространстве до формальдегида с помощью дегидрогеназ двух типов. Классическая дегидрогеназа метанола, содержащая в виде простетической группы пирролохинолинхинон (ПХХ), отдает электроны на цитохром *c*. В этом случае имеется только один пункт сопряжения в ЭТЦ. Вторая метанолдегидрогеназа восстанавливает $НАД^+$, и при таком процессе может быть до трех пунктов сопряжения. $НАД^+$ -зависимый фермент обнаружен 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 почти мгновенно лизируются.

Окисление формальдегида может происходить в диссимиляционном цикле (рис. 7.27, а), а также по пути, в котором принимают участие тетрагидрофолат (ТГФ) или переносчики, свойственные метаногенам (рис. 7.27, б).

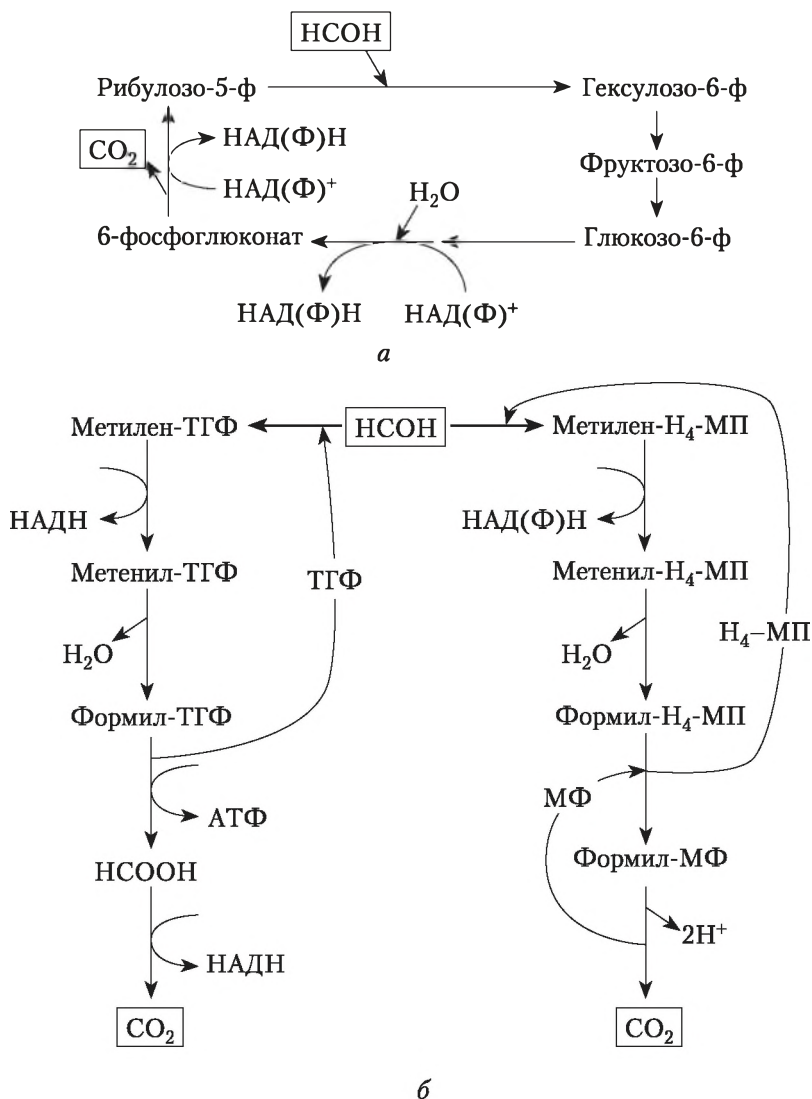


Рис. 7.27. Пути окисления формальдегида у метилотрофов:

а — диссимиляционный цикл; б — путь с участием переносчиков; ТГФ — тетрагидрофолат; Н₄-МП — тетрагидрометанооптерин; МФ — метанофуран

Формиат обычно окисляется НАД⁺-зависимыми дегидрогеназами. Окисление метиламинов идет с участием ряда ферментов до формальдегида и NH₃ (рис. 7.28).

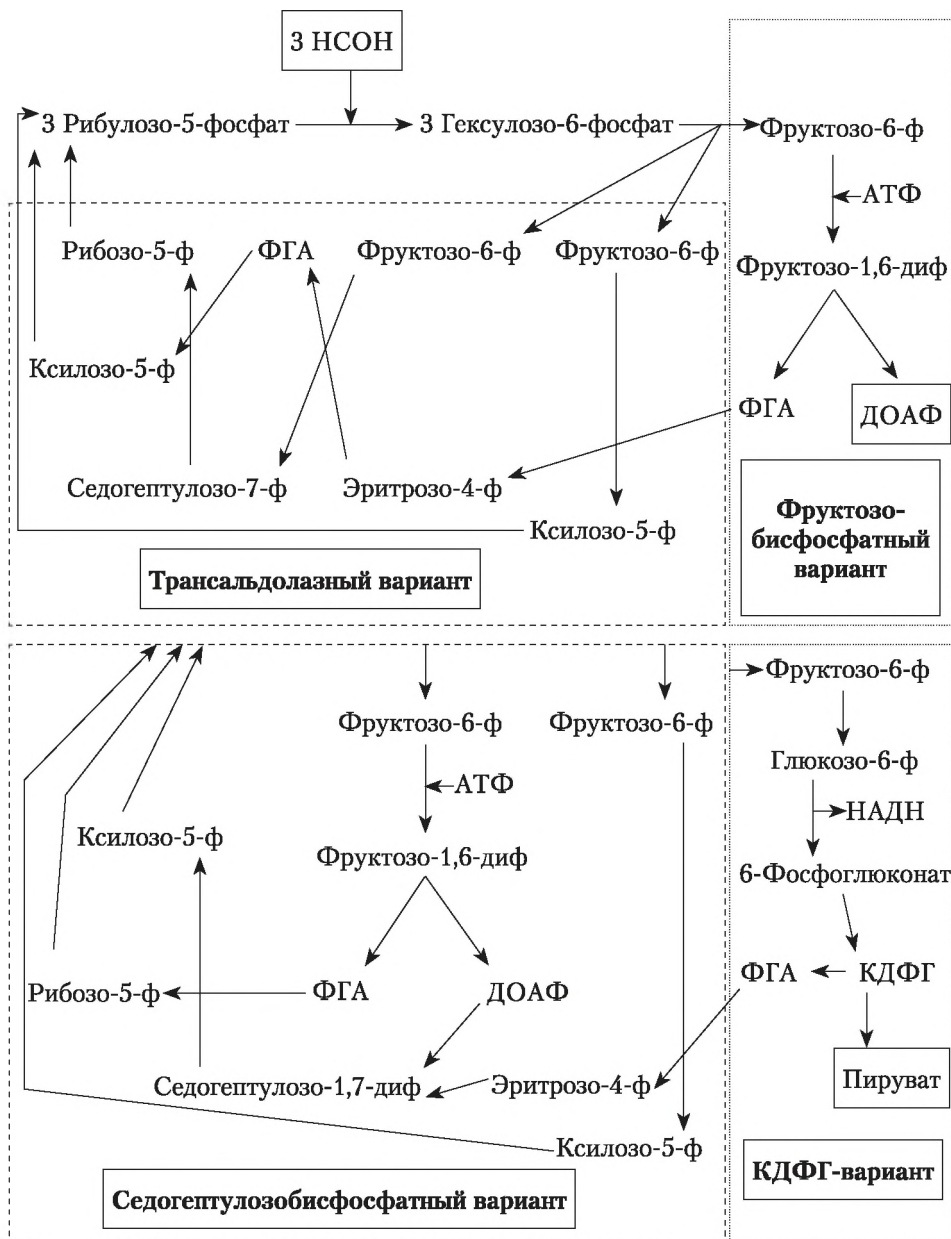


Рис. 7.30. Рибулозомонофосфатный (РМФ-) цикл ассимиляции углерода у метилотрофов

РМФ-цикл у конкретного микроорганизма может быть представлен одним из четырех типов, сочетающих один из вариантов последовательности реакций регенерации акцептора формальдегида и один из вариантов получения C_3 -соединения для биосинтезов (КДФГ + трансальдозазный, фруктозобисфосфатный + седогептулозобисфосфатный, КДФГ + седогептулозобисфосфатный, фруктозобисфосфатный + трансальдозазный).

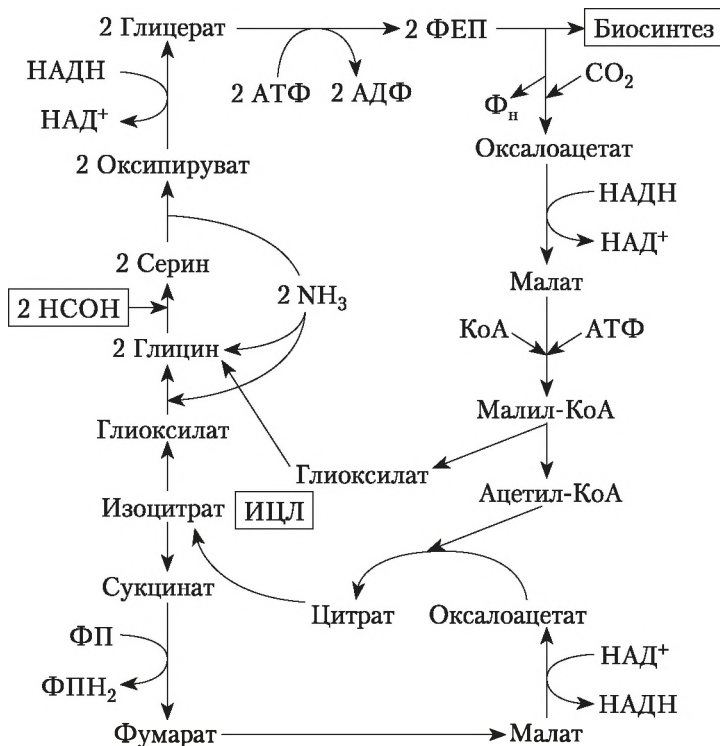


Рис. 7.31. Сериновый путь ассимиляции углерода у метилотрофов:
ИЦЛ – изоцитратлиаза

В сериновом пути наряду с формальдегидом фиксируется и углекислый газ. Цикл Кальвина может функционировать у метилотрофов как вспомогательный вдобавок к основному пути фиксации формальдегида. Таким образом, у метилотрофов формальдегид является центральным амфиболитом, используемым как в энергетическом, так и в пластическом обмене. Часть субстрата всегда окисляется до CO₂ с запасанием энергии, которая затем и тратится при фиксации формальдегида.

К метилотрофии способны и некоторые эукариотические микроорганизмы. 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 пять содержали метилотрофных представителей. Это 18 видов рода *Candida* (наиболее изученный — *C. methylica*), девять видов рода *Hansenula* (*H. polymorpha*, *H. capsulata*, *H. minuta* и др.), шесть видов рода *Pichia* (*P. pinus*, *P. pastoris* и др.), а также *Saccharomyces* sp. и *Rhodotorula* sp. *Sporobolomyces roseus* и *S. gracilis* могут расти на средах с метиламинами, используя их в качестве источника азота. Из мицелиальных грибов метилотрофами являются *Glucocladium deliquescens*, *Paecilomyces varioti*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium* sp., способные к росту на средах с метанолом.

При росте на среде с метанолом у дрожжей пространство клетки заполнено пероксисомами, а все органеллы сдвинуты к одному из полюсов (рис. 7.32).

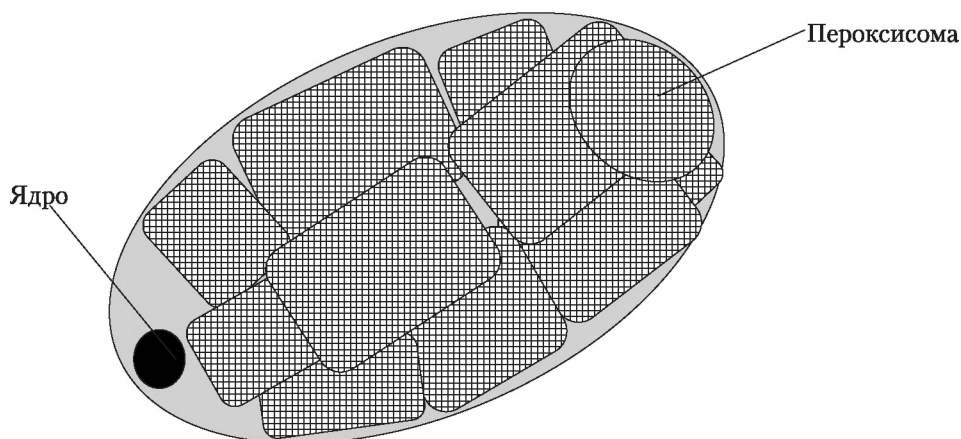


Рис. 7.32. Дрожжевая клетка с пероксисомами

Пероксисома — это покрытая трехслойной белковой оболочкой структура, содержащая два фермента — алкогольоксидазу и каталазу (рис. 7.33).

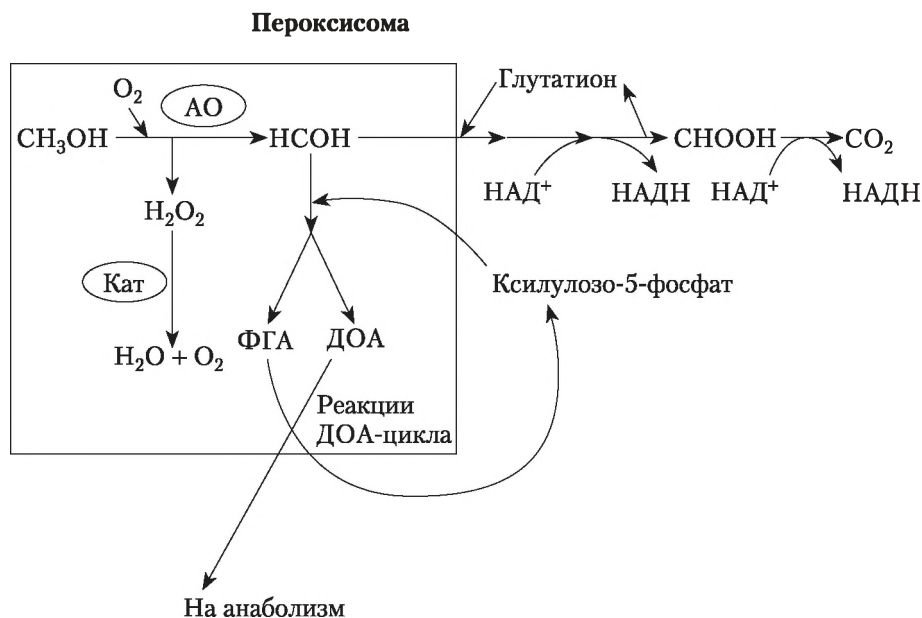


Рис. 7.33. Использование метанола метилотрофными дрожжами:

АО — алкогольоксидаза; Кат — каталаза

Алкогольоксидаза (АО) переносит два протона и два электрона от субстрата сразу на кислород с образованием перекиси, которая расщепляется каталазой (Кат). Поскольку оксидазы не восстанавливают переносчики электронов, то на первом этапе окисления субстрата дрожжи не получают энергии. Поэтому метилотрофные дрожжи проигрывают в эффективности роста метилотрофным бактериям, обладающим цит *c*- или НАД⁺-

АО может составлять в клетке до 20% всех белков. Она имеет широкую субстратную специфичность к спиртам.

Метилотрофы рассматриваются как потенциальный источник пищевого и кормового белка, поскольку углерод метана и метанола очень эффективно (до 70%) включается в их биомассу. Клетки легко можно очистить от исходного питательного субстрата. Для получения белково-витаминного концентрата, используемого в качестве кормовой добавки, разработаны технологические процессы на основе метилотрофных бактерий и дрожжей. Например, компанией ICI (Великобритания) внедрен процесс производства белково-витаминного концентрата, используемого в качестве кормовой добавки Pruteen, на основе *Methylophilus methylotrophus*. Время генерации этого микроорганизма — 1,5 ч, при этом конверсия углерода метанола составляет 70%. Компания Shell (Великобритания/Нидерланды) пыталась организовать получение пищевого белка на смеси метана и воздуха при 7 атм. Однако работы были свернуты с началом «зеленой революции», так как соевый белок оказался дешевле и привычнее. Метилотрофные дрожжи могут быть источником кормового белка, однако, так как дрожжевая клеточная стенка не у всех животных в пищеварительном тракте расщепляется, то дрожжи перед сушкой приходится подвергать автолизу. Алкогольоксидаза метилотрофных дрожжей, имеющая широкую субстратную специфичность к спиртам, применяется для определения алкоголя в крови. Метилотрофы могут быть источником биотина, витамина В₁₂, аминокислот тирозина и глутамата, поли-β-гидроксимасляной кислоты, полисахаридов, кофермента Q₁₀ и т.д. Метилотрофы — перспективные объекты биоинженерии, поскольку при проточном культивировании может быть достигнута высокая плотность клеток. Системы транскрипции и трансляции метилотрофных микроорганизмов работают настолько эффективно, что при встраивании в нее нужных генов можно осуществлять сверхсинтез продукта. Так, *P. pinus* при выращивании в проточном ферментере на метаноле способна давать плотность до 125 г/л. Встраивая гены инсулина или интерферона человека под промотор ее АО, можно получить сверхсинтез этих продуктов.

В природе метилотрофы играют важную роль в глобальном цикле углерода. Они являются **бактериальным газовым фильтром** для метана, выделяемого в атмосферу метаногенными археями.

7.4.5. Хемолитоавтотрофия (окисление восстановленных неорганических соединений для получения энергии)

Окисление неорганических соединений для получения энергии, сопряженное с построением клеточного материала из СО₂, свойственно только прокариотам. Такой *modus vivendi* носит название **хемолитоавтотрофии**. Процесс хемолитоавтотрофии был открыт в 1887 г. С. Н. Виноградским, работавшим в ту пору в Страсбурге в лаборатории А. де Бари. Исследуя метаболизм бесцветной нитчатой серобактерии из рода *Beggiatoa*, растущей на поверхности донных осадков в застойных водоемах, ученый заметил, что клетки росли и размножались, окисляя Н₂S и откладывая элементарную серу в цитоплазме. При истощении сероводорода микроорганизмы окис-

ляли отложенную серу до сульфата. В 1983 г. было показано, что штамм, с которым работал С. Н. Виноградский, требует небольших количеств органических соединений для роста, т.е. является факультативным автотрофом. Значительно позднее из морских местообитаний в зоне «черных курильщиков» были выделены облигатно автотрофные виды *Beggiatoa*. Там они обеспечивают первичную продукцию органического вещества за счет хемолитоавтотрофии. Также тионовые бактерии участвуют в образовании микробных матов толщиной до 60 см и диаметром до 32 м, где толстые и длинные клетки *Beggiatoa* служат структурообразующим элементом.

В настоящее время известно значительное число **тионовых микроорганизмов**, способных окислять восстановленные соединения серы. Эти микроорганизмы принимают участие в глобальном цикле серы. Сероводород образуется в природе повсеместно в процессе аммонификации и по достижении аэробной зоны окисляется тионовыми микроорганизмами. Таким образом, тионовые микроорганизмы являются **бактериальным газовым фильтром** для H_2S , не позволяющим ему попадать в значительных количествах в атмосферу. В районах с вулканической активностью имеются природные выходы серы на поверхности Земли (сульфатары).

Тионовые микроорганизмы являются, в основном, аэробами. Короткий период они могут существовать без кислорода, окисляя сероводород в процессе нитратного дыхания, но при наличии подвижности активно покидают анаэробные местообитания.

Традиционно организмы, окисляющие восстановленные соединения серы, делят на две группы: I группа окисляет сероводород и откладывает элементарную серу в виде капель внутри клеток, а II группа никогда серу внутри клеток не откладывает. К I группе относятся морфологически своеобразные микроорганизмы. Это представители родов *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Macromonas*, *Bilophococcus*, *Thioploca*, *Thiospirillopsis*, *Achromatium*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Thiovulum*. Только для некоторых представителей четко установлен тип метаболизма, поскольку лишь в первых четырех родах из списка получены чистые культуры. Выделение чистых культур бактерий I группы затруднено из-за присутствия в их слизистых чехлах многочисленных микробов-спутников. В эту группу входят грамтрицательные бесцветные клетки разной морфологии (крупные кокки и овалы, мелкие спирали, нити и длинные палочки), растущие на средах с H_2S и откладывающие серу в клетках. Некоторые движутся с помощью скольжения или жгутиков, *Achromatium* и *Thiobacterium* — неподвижны. Большинство образует мощные капсулы или чехлы. Они обычно растут на границе аэробной и анаэробной зон (в зоне хемоклина стратифицированных озер) в условиях микроаэрофилии, образуя налет на донных осадках. Оптимальная концентрация кислорода для их роста составляет 0,6–6%. Для тионовых бактерий I группы характерен отрицательный свето- и аэротаксис, некоторые имеют магнитосомы. 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).

II группа тионовых микроорганизмов — это одиночные небольшие палочковидные клетки, относящиеся к наиболее изученным родам *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, а также археи родов *Sulfolobus* и *Acidianus*. Они никогда не откладывают элементарную серу в клетках и проводят процесс до образования сульфата. Первые тиобациллы были выделены А. Натансоном в 1902 г., а в 1904 г. М. Бейеринк показал, что *Thiobacillus thioparus* и *T. thiooxidans* (в настоящее время относимая к роду *Acidithiobacillus*) используют в своем метаболизме сероводород.

Микроорганизмы этих родов различаются по отношению к pH: тиобациллы растут при слабокислых значениях pH, а ацидитиобациллы и сульфобациллы — при pH < 4,0 (до 1,5). Большинство представителей этой группы — мезофилы. Они широко распространены и обитают в почвах, соленых болотах, в зоне термоклина стратифицированных озер, в сульфатарах, 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). Наличие в щелочных почвах тиобацилл иногда используют для «исправления» pH: в почвы вносят порошок серы, и образующийся при ее окислении SO_4^{2-} подкисляет почву. При температуре выше 50°C серу окисляют археи (*Sulfolobus*, *Acidianus*) или представители рода *Sulfobacillus*.

Реакции окисления восстановленных соединений серы характеризуются разными значениями свободной энергии:

ΔG° (кДж/моль)



Электроны попадают в ЭТЦ тионовых бактерий на уровне цитохромов (рис. 7.35), поэтому для синтеза восстановительных эквивалентов приходится затрачивать энергию для синтеза восстановительных эквивалентов путем обратного переноса электронов.

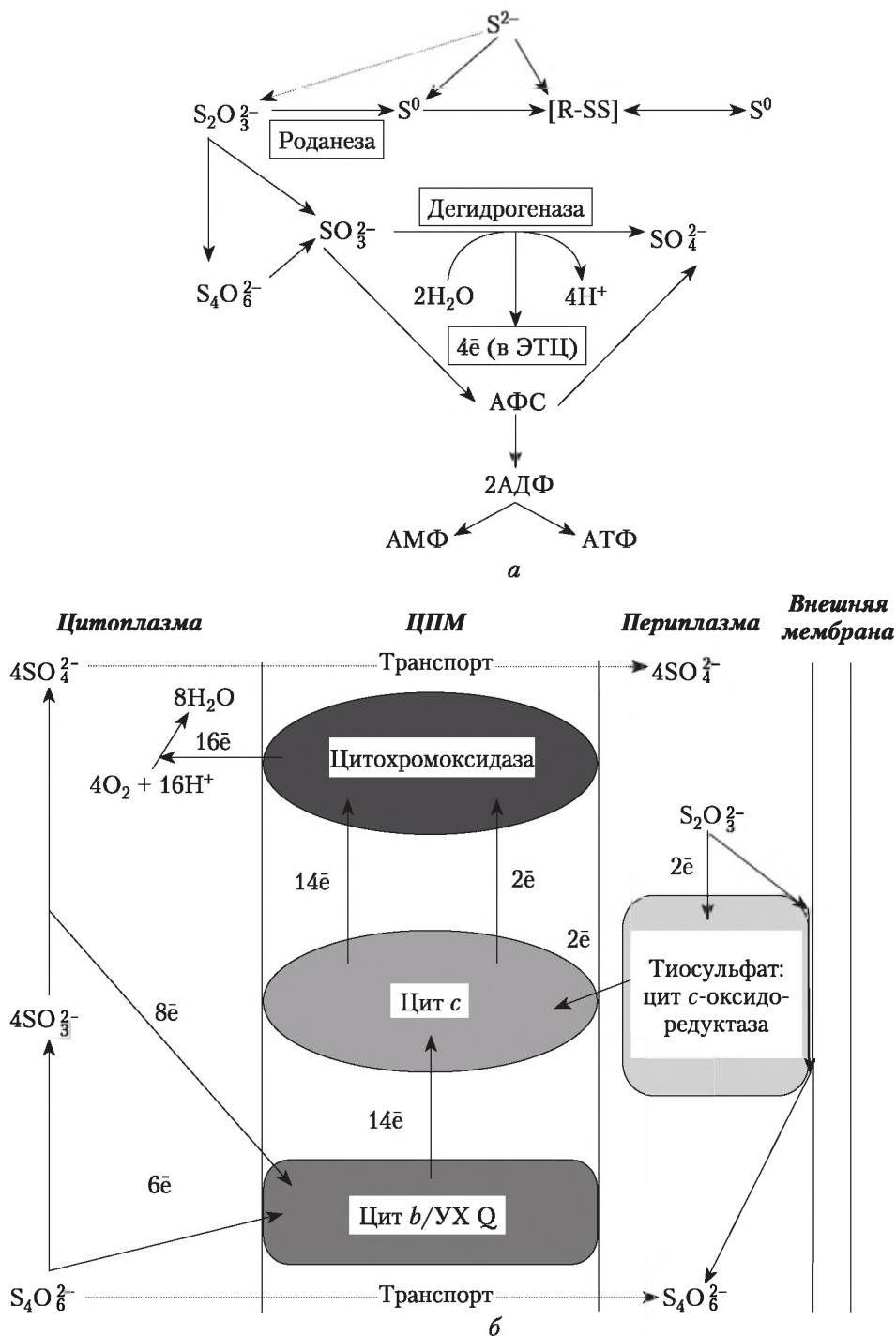
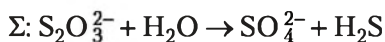
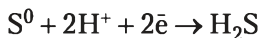
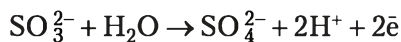
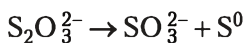


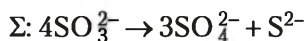
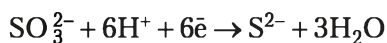
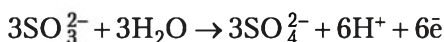
Рис. 7.35. Использование соединений серы тионовыми микроорганизмами:

а — схема превращений соединений серы; R-SS — мембрансвязанный полисульфид; АФС — аденозинфосфосульфат; *б* — организация ЭТЦ некоторых тиобацилл

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



В том же году установили наличие такой реакции:

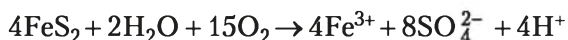


Автотрофная ассимиляция CO_2 у тионовых микроорганизмов происходит через **цикл Кальвина**. В клетках формируются окруженные простой белковой мембраной **карбоксисомы**, в которых содержится ключевой фермент этого цикла — рибулозобисфосфаткарбоксилаза-оксигеназа (РубисКО, RubisCO). При переходе к ассимиляции органических веществ карбоксисомы в клетках не обнаруживаются.

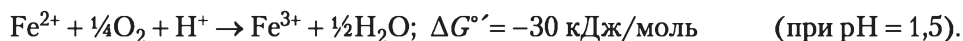
Металлоокисляющие микроорганизмы — это еще одна группа хемоли-тоавтотрофов, среди которых наиболее изучены железоокисляющие орга-низмы, окисляющие Fe^{2+} до Fe^{3+} . Большой вклад в их исследование внесли С. Н. Виноградский и М. Бейеринк.

Такие микроорганизмы легко обнаруживаются в природных водоемах в виде обрастаний нижней части водных растений. Большинство из них растет при средних температурах в аэробных условиях, экстремальные тер-мофилы встречаются только среди архей. При $\text{pH} < 5,0$ Fe^{2+} стабилен, поэ-тому в таких природных местообитаниях преимущественно развиваются ацидофильные железоокислители (например, бактерии рода *Leptothrix* и *Acidithiobacillus*). Они, как правило, заключены в слизистые чехлы, кото-рые постепенно инкрустируются гидроксидом железа (III). Лишь некото-рые представители железоокислителей (например, *Galionella ferruginea*, выделенная Х. Г. Эренбергом в 1836 г.) растут в нейтральных средах. Поскольку при $\text{pH} = 7,0$ в аэробных условиях Fe^{2+} нестабилен, то галио-неллы обитают на выходе подземных ключей, где концентрация кислорода очень низкая. *G. ferruginea* имеет фасолевидные клетки, прикрепляющиеся к поверхности с помощью слизистой скрученной ножки, инкрустирован-ной $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

Fe^{2+} -оксидоредуктаза, содержащая в качестве кофактора рустицианин с ОВП + 680 мВ, передает электроны на цитохром aa_3 , поэтому ЭТЦ получается короткой с одним пунктом сопряжения. Окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} дает мало энергии (при $\text{pH} = 2,0$ $\text{ОВП}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} = +650$ мВ), и для поддержания роста микроорганизму необходимо переработать большое количество двухвалентного железа. Подсчитано, что для фиксации 48 г CO_2 требуется окислить 2,8 кг Fe^{2+} . Предполагают, что в природных условиях может происходить процесс одновременного окисления железа и сульфида в составе нерастворимых минералов:



Выделены микроорганизмы, способные окислять другие металлы, например, Mn^{2+} , устойчивый при щелочных pH , до Mn^{4+} . Окисление марганца термодинамически выгодно в интервале pH от 6 до 8, поэтому такие микроорганизмы растут в этом диапазоне кислотности среды. С понижением pH оно становится менее выгодным, а для окисления железа зависимость обратная. Микроорганизмы, способные окислять и железо, и марганец, обладают устойчивым ростом в широком диапазоне значений pH :



Некоторые металлоокисляющие микроорганизмы представлены в табл. 7.4.

Таблица 7.4

Микроорганизмы, окисляющие металлы

Микроорганизм	Неорганический субстрат	Форма клеток	Место обитания
Бактерии-автотрофы			
<i>Galionella ferruginea</i>	Fe^{2+}	Изогнутые фасолевидные палочки с закругленными концами	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
Бактерии-гетеротрофы			
<i>Arthrobacter</i> sp.	Mn^{2+}	Плейоморфные палочки	Почва

Микроорганизм	Неорганический субстрат	Форма клеток	Место обитания
<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>	Fe ²⁺ , 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-автотрофы			
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Mn ²⁺ , S ⁰ , Fe ²⁺	Лопастные и кокковидные клетки	Горячие источники

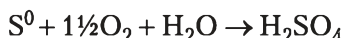
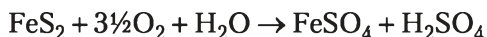
Среди бактерий к автотрофии за счет окисления железа способны представители родов *Galionella*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*. Последние могут также окислять элементную серу, селен и уран. К автотрофному окислению сурьмы способен *Stibiobacter senarmontii*. Автотрофный архей *Sulfolobus acidocaldarius*, выделенный из горячего источника, может использовать для получения энергии железо и марганец. Только для *Sulfolobus acidocaldarius* доказана четкая автотрофия при окислении марганца, при этом CO₂ фиксируется в цикле Кальвина. Гетеротрофные металлоокислители распространены в почве, пресных и морских водоемах. Это представители родов *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Pseudomonas*, *Vibrio* и др. Бурное развитие железобактерий рода *Leptothrix*

в водопроводных трубах приводит к их забиванию слизью и губчатой ржавчиной. Для местообитаний с низкой кислотностью среды ($\text{pH} < 5,0$) характерно присутствие *Acidithiobacillus thiooxidans* и *A. ferrooxidans*. Недавно установлен факт развития *A. ferrooxidans* за счет анаэробного дыхания с Fe^{3+} и S^0 в качестве конечных акцепторов электронов.

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

Окисление ряда металлов с переменной валентностью (Cu^{2+} , U^{4+} , As^{3+} , Sb^{3+} , Mo^{4+} , Se^0 , Zn^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Au^0 и т.д.) показано для некоторых накопительных культур.

Микроорганизмы, способные окислять восстановленные соединения серы и металлы с переменной валентностью, применяют в **биогидрометаллургии** для получения (**выщелачивания**) **металлов** из бедных руд. Обычно используют природные микробные сообщества, содержащие представителей бактериальных родов *Acidithiobacillus* (*A. ferrooxidans* и *A. thiooxidans*), *Leptospirillum*, *Sulfobacillus* и архей родов *Sulfolobus*, *Ferroplasma*, *Metallosphaera*, *Acidianus*. Суспензия микроорганизмов, обогащенная кислородом, закачивается в пласт, либо ею орошают рудные отвалы. Посредством следующих реакций металл переводится в растворенное состояние:



Полученный раствор откачивают из скважины или собирают у подножия кучи, концентрируют и осаждают из него металл. Участвующие в этом процессе микроорганизмы обладают устойчивостью к высоким концентрациям металлов. Микробиологические процессы используют при получении меди, урана, марганца, а также для освобождения олова, серебра и золота из нерастворимых сульфидных минералов, содержащих мышьяк.

Еще одной группой хемолитоавтотрофов являются **нитрифицирующие микроорганизмы**. Процесс превращения аммиака в нитрат использовался в Европе для получения селитры при изготовлении пороха задолго до того, как стала известна его микробная природа. Земляные валы поливали кровью животных со скотобоен, перекапывали для обогащения кислородом и вносили золу для нейтрализации и как источник калия. Белки крови разлагались под действием почвенных микроорганизмов с выделением аммиака, который окислялся нитрифицирующими бактериями до нитрата. При реакции нитрата с ионами калия образовывался выцвет селитры, который растворяли и выпаривали.

С. Н. Виноградский для выделения чистых культур нитрификаторов предложил метод «отрицательных пластинок»: сильно разведенные суспен-

зии высевались на агар или силикагель, и те кусочки агара, где не было роста гетеротрофов, переносили на среду с NH_4^+ . В его статье, появившейся в 1890 г., процесс нитрификации описывался как одностадийный ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_3^-$). В том же году Дж. и Г. Франкланды опубликовали статью о выделении микроорганизма, который осуществляет реакцию $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$. Стало ясно, что нитрификация идет в две стадии, а супруги Франкланд выделили микроорганизмы I фазы. В 1949 г. С. Н. Виноградский исправил прежнюю статью, признав двустадийность процесса нитрификации ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$).

Нитрифицирующие микроорганизмы — это грамотрицательные виды, объединенные по способности окислять аммиак, а не филогенетически. Они встречаются в классах *Beta*-, *Gamma*- и *Epsilonproteobacteria* филума *Proteobacteria*, а также в классе *Nitrospira* филума *Nitrospirae*. Названия родов нитрификаторов I фазы обычно начинаются с *Nitroso*-, а нитрификаторов II фазы — с *Nitro*-. Микроорганизмы I ($\text{NH}_3 \rightarrow \text{NO}_2^-$) и II ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$) стадий нитрификации в природе всегда живут вместе, и токсичный нитрит, образованный бактериями I стадии, быстро потребляется нитрификаторами II фазы и не накапливается выше, чем 10^{-4} М. Клетки различной формы (палочковидные, изогнутые, спиральные, кокковидные) могут быть подвижными в молодом возрасте, а при старении формируют биопленки. Нитрификаторы имеют в разной степени развитые внутриклеточные разрастания ЦПМ. У *Nitrosomonas* они параллельны мембране клетки, у *Nitrosococcus* образуют стопки ламелл, у *Nitrosolobus* формируют инвагинации.

Для фиксации CO_2 нитрификаторы используют **цикл Кальвина**, в котором затрачивается большое количество АТФ и восстановительных эквивалентов. При автотрофном росте в клетках образуются **карбоксисомы** с РубисКО. Процесс образования карбоксисом для бактерий II фазы более редок, чем для микроорганизмов I фазы. Все нитрификаторы II фазы способны также к миксотрофному росту. Некоторые представители рода *Nitrobacter* могут расти гетеротрофно, используя органические вещества (ацетат, казеин, пируват и т.д.), но преимуществ в росте при этом не получают.

При окислении аммиака и нитрита электроны поступают в ЭТЦ на уровне цитохромов, и энергии запасается мало, так как имеется только один пункт сопряжения (рис. 7.36). На I стадии аммиак проникает в клетки и окисляется монооксигеназой до гидроксиламина: $\text{NH}_3 + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$. Эта реакция идет с затратой энергии в виде восстановителя. При окислении гидроксиламина периплазматической гидроксиламиноксидоредуктазой образуется нитрит ($\text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$). При этом электроны переносятся на уровень цитохромов *b* и *c*. Гидроксиламиноксидоредуктаза — это фермент с молекулярной массой ≈ 200 кДа, имеющий структуру $\alpha_3\beta_3$ и находящийся в периплазме. С активностью этого фермента связаны также активности монооксигеназы аммиака и цитохромоксидазы. В то же время клетки на среде с чистым гидроксиламином вырастить не удастся (без аммиака гидроксиламин целыми клетками не окисляется).

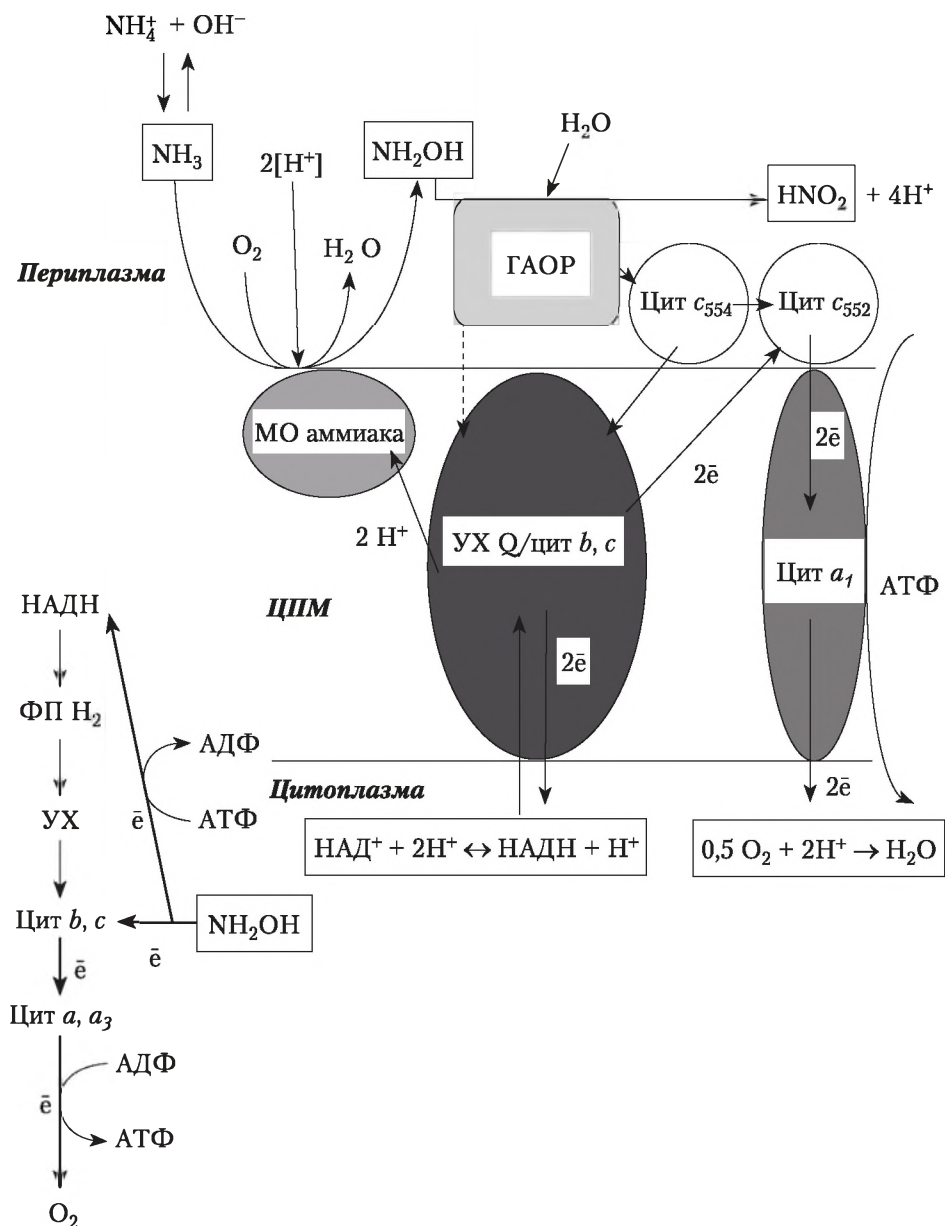


Рис. 7.36. Схема ЭТЦ окисления субстратов нитрификаторами I фазы:

МО — монооксигеназа; ГАОР — гидроксиламиноксидоредуктаза

Для образования восстановленных пиридиннуклеотидов у нитрификаторов I фазы задействован обратный перенос электронов с затратой энергии. Именно поэтому они растут довольно медленно (время генерации составляет около 24 ч) и накапливают мало биомассы.

II стадия нитрификации приводит к окислению нитрита в нитрат с участием мембрансвязанного фермента нитритоксидоредуктазы: $NO_2^- + H_2O \rightarrow$

→ $\text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ и $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$. Подсчитано, что при окислении 14,5 моля NO_2^- в NO_3^- образуется $4 \cdot 10^7$ клеток *Nitrobacter*, а время генерации составляет от 10 до 100 ч. Пара нитрит/нитрат имеет ОВП = +400 мВ, и электроны переносятся на уровень цитохромоксидазы, поэтому в результате генерируется только одна молекула АТФ (имеется один пункт сопряжения). Подсчитано, что на образование 1 моля НАДН путем обратного переноса электронов необходимо затратить 5 молей нитрита, а для фиксации 1 г CO_2 нужно окислить 35 г NO_2^- . В то же время установлено, что клетки рода *Nitrobacter* используют только 2–10% энергии, заключенной в NO_2^- .

Нитрификаторы обычно растут в аэробных (или микроаэрофильных) зонах с нейтральным рН (оптимум рН 7,5) и средними температурами (оптимум 28–30°C). При низком рН (< 5,0) нитрит диспропорционирует на нитрат и оксид азота. Нитрификаторы чувствительны к повышенной концентрации нитрата и кислорода.

В настоящее время доказана способность к нитрификации у архей, объединенных в новый филум *Thaumarchaeota* и обитающих преимущественно в океанах в аэробных и микроаэрофильных зонах. В конце 2015 г. в журнале «Nature» была опубликована статья об обнаружении бактерий рода *Nitrospira*, которые осуществляют самостоятельно полную нитрификацию аммония в нитрат, т.е. один микроорганизм проводит обе стадии процесса, названного **коаммокс** (*comammox* — *complete ammonia oxidation*). Оказалось, что полная нитрификация — это энергетически выгодный процесс, а коаммокс-бактерии широко распространены в природных местообитаниях. Открытие коаммокс-процесса привело к ревизии схемы глобального цикла азота и к добавлению еще одной «ветви» в его окислительную часть (см. Т. 2, рис. 14.3).

Ранее считали, что нитрификация — это сугубо аэробный процесс. Однако в анаэробных реакторах, осуществляющих очистку стоков от соединений азота, было показано, что аммоний окисляется в присутствии нитрита в соответствии с реакцией $^{15}\text{NH}_4^+ + ^{14}\text{NO}_2^- \rightarrow ^{14,15}\text{N}_2 \uparrow + \text{H}_2\text{O}$, наличие которой было доказано с помощью меченых соединений. Процесс получил название **анаммокс** (*anammox* — *anaerobic ammonia oxidation*). **Анаэробное окисление аммония** осуществляют особые бактерии-планктомицеты, входящие в филум *Planctomycetes*. Клетки анаммокс-бактерий имеют кокковидную или нерегулярно изрезанную форму диаметром около 1 мкм. В их клеточной стенке не обнаружено пептидогикана, но имеется S-слой. Клетки анаммокс-планктомицетов разделены на три компартмента, что необычно для прокариот. Под цитоплазматической мембраной лежит область толщиной 31–39 нм, не содержащая РНК (парифоплазма) с пока неясными функциями. Под ней находится первая внутренняя мембрана, за которой лежит рибоплазма, типичная бактериальная цитоплазма, содержащая рибосомы, нуклеоид и часто гранулы гликогена. Ниже расположена анаммоксосома, отграниченная прочной непроницаемой двуслойной мембраной и занимающая 50–70% объема клетки. В этой структуре осуществляются катаболические реакции клетки, и она может считаться функцио-

нальным аналогом митохондрий эукариот. Мембрана анаммоксосомы для увеличения площади поверхности образует складки, с ней ассоциирована АТФ-аза и цитохромы *c*. Непроницаемая мембрана не позволяет токсичным интермедиатам анаммокс-процесса проникать в рибоплазму, а также поддерживает протонный градиент. Мембраны анаммокс-бактерий содержат уникальные ладдеральные липиды (от англ. *ladder* — лестница), состоящие из циклобутановых колец, расположенных в одной плоскости, придающих мембранам прочность и малую проницаемость.

Анаммокс-бактерии являются медленно растущими микроорганизмами (среднее время удвоения в лаборатории составляет 11 сут.). Они обычно существуют в виде сарциноподобных микроколоний, образующих агрегаты. Ни один представитель пока не получен в виде чистой культуры, описанным анаммокс-планктомицетам присвоен статус *Candidatus*. В природных местообитаниях анаммокс-бактерии конкурируют с денитрификаторами. При наличии большого количества органических веществ денитрификаторы абсолютно доминируют из-за высокой скорости роста, но по мере исчерпания органического донора начинают преобладать анаммокс-бактерии, являющиеся хемолитотрофами. Недавно показана также функциональная связь анаммокс- и комаммокс-бактерий и присутствие их в одних и тех же агрегатах в условиях низкого содержания кислорода. Процесс окисления аммиака в анаэробных условиях всегда идет автотрофно.

Некоторые почвенные бактерии и плесневые грибы способны к **гетеротрофному окислению аммиака** (аммония). В этом случае ионы аммония окисляются до нитрата без запасаения энергии. Такой процесс наносит вред сельскому хозяйству, поскольку приводит к вымыванию связанных форм азота из почвы вследствие перевода аммонийного азота в более растворимые нитратные формы.

Группа **водородных микроорганизмов**, способных к хемолитоавтотрофии, окисляет молекулярный водород и ассимилирует CO_2 . H_2 — очень энергоемкий субстрат, дающий до трех молекул АТФ при прохождении электронов по ЭТЦ (рис. 7.37).



Рис. 7.37. ЭТЦ водородных бактерий при росте в автотрофных условиях

С этим 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.). У аэробных форм конечным акцептором электронов служит кислород. Эти микроорганизмы способны расти на очень простой среде, по сути дела осуществляя постепенную реакцию «гремучего газа». Среди анаэробов водородотрофные микроорганизмы распространены в группах метаногенов, гомоацетогенов, сульфатредукторов и пурпурных бактерий. Некоторые представители водородиспользующих микроорганизмов разных систематических и функциональных групп приведены в табл. 7.5.

Примеры водородных микроорганизмов

Группа микроорганизмов	Микроорганизм	Путь фиксации CO ₂
Автотрофы и миксотрофы	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Цикл Кальвина
	<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	
	<i>Arthrobacter</i> sp. 11/x	
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	
	<i>Paracoccus denitrificans</i>	
	<i>Mycobacterium gordonae</i>	
	<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	Цикл Арнона
Гомоацетогены	<i>A. woodii</i>	Ацетил-КоА-путь
	<i>Acetogenium kivui</i>	
	<i>Clostridium acetium</i>	
Метаногены	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	
	<i>Methanosarcina barkeri</i>	
Сульфатредукторы	<i>Desulfobacter hydrogenophilus</i>	
	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i>	

Автотрофная ассимиляция углекислого газа у разных групп водородных микроорганизмов происходит различными способами. Метаногены, гомоацетогены и сульфатредукторы фиксируют CO₂ в ацетил-КоА-пути, у большинства аэробных бактерий обнаружен цикл Кальвина. Аэробные водородные бактерии, как правило, являются факультативными автотрофами, т.е. способны переключаться на потребление органических веществ. Так, *Alcaligenes eutrophus* может аэробно расти на средах с глюкозой. *A. eutrophus* обладает цитохромами *a*, *b*, *c*, причем высокие концентрации цит *c* обнаруживаются в периплазме. Этот микроорганизм имеет две плазмиды — большую и маленькую. Установлено, что некоторые компоненты гидрогеназ и ферментов цикла Кальвина закодированы в плазмидах. Этот микроорганизм имеет два типа поглощающей гидрогеназы — растворимую и мембрансвязанную, содержащие в своем составе Ni²⁺. Первая поставляет восстановленные пиридиннуклеотиды в цикл Кальвина, вторая восстанавливает НАД⁺, окисляющийся в ЭТЦ. Регуляция этих ферментов осуществляется по типу репрессии-дерепрессии.

Другая водородная бактерия, облигатный автотроф *Hydrogenobacter thermophilus*, является типичным градиентным организмом, микроаэрофилом, растущим при 70°C на среде с соотношением газов $H_2 : CO_2 : O_2$, равным 75 : 10 : 15. При этом он имеет «анаэробный» цикл фиксации CO_2 (восстановительный ЦТК, модифицированный цикл Арнона). Углекислый газ фиксируется в реакциях карбоксилирования ацетил-КоА, пирувата, сукцинил-КоА и α -кетоглутарата. Модификации цикла Арнона у гидрогенобактера заключаются в том, что отсутствует ферредоксин в ЭТЦ, а пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназы не зависят от пиридиннуклеотидов.

Еще одна водородная бактерия, азотфиксирующий микроорганизм *Bradyrhizobium japonicum*, имеет нитрогеназу, выделяющую H_2 . 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. При пониженном содержании кислорода (1—2%) наряду с нитрогеназным комплексом экспрессируется гидрогеназа, связанная с мембранами и содержащая Ni^{2+} , и другие ферменты литотрофного метаболизма. Это дает микроорганизму определенное экологическое преимущество, поскольку молекулярный водород, являющийся «отходом» азотфиксации, может быть использован как дополнительный источник энергии.

Водородных бактерий применяют для синтеза микробного белка в качестве кормовой добавки. Молекулярный водород для этого процесса получают электролизом воды с затратой энергии гидроэлектростанций. Водородные микроорганизмы могут использоваться как поглотители углекислоты в замкнутых системах (на подводных лодках, космических кораблях и станциях). Данные микроорганизмы интересны и как источник природных полимеров. Такие вещества, получившие название **природных термопластиков** (самое известное и распространенное — поли- β -гидроксимасляная кислота), синтезируются в качестве запасного продукта до 90% по массе при росте водородных бактерий на глюкозе и могут быть легко разрушены микроорганизмами. Если такое вещество использовать как сополимер при синтезе полиэтилена или полипропилена, широко применяемых в качестве упаковочных материалов, то их разложение в природе будет происходить значительно быстрее.

Карбоксидотрофные микроорганизмы как группа хемолитоавтотрофов похожи по метаболизму на водородных микроорганизмов. Часто эти активности присутствуют у одной культуры. Угарный газ (СО) может служить как акцептором электронов при карбонатном дыхании, так и донором электронов у карбоксидобактерий. Если микроорганизмы используют СО как донор электронов, то акцептором могут быть: O_2 , S^0 , SO_4^{2-} , NO_3^- , Fe^{3+} , CO_2 .

Угарный газ появляется в природе, в основном, за счет деятельности человека, а также при горении лесов и извержении вулканов. В атмосфере он подвергается фотоокислению до CO_2 .

Некоторые карбоксидотрофные микроорганизмы, входящие в разные аэробные и анаэробные функциональные группы, приведены в табл. 7.6.

Микроорганизмы, использующие в метаболизме CO

Физиологическая группа	Микроорганизмы
Типичные карбоксидотрофы-аэробы	<i>Acinetobacter</i> sp.
	<i>Alcaligenes carboxydus</i>
	<i>Arthrobacter</i> sp.
	<i>Bacillus schlegelii</i>
	<i>Pseudomonas carboxydoflava</i>
	<i>P. carboxydovorans</i>
	<i>P. gazotrophica</i>
Азотфиксаторы	<i>Streptomyces thermoautotrophicus</i>
	<i>Azovorans</i> sp.
	<i>Azospirillum lipoferum</i>
	<i>Azotobacter</i> sp.
	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
Метанотрофы	<i>Methylobacterium methanica</i>
	<i>Methylosinus trichosporium</i>
	<i>Methylococcus capsulatus</i>
Гомоацетогены	<i>Acetobacterium woodii</i>
	<i>Clostridium formicoaceticum</i>
	<i>C. pasteurianum</i>
	<i>C. thermoaceticum</i>
Метаногены	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>
	<i>Methanosarcina barkeri</i>
	<i>Methanobrevibacter arboriphilus</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 vulgaris</i>

Каждой функциональной группой микроорганизмов использование угарного газа происходит в соответствии с реакциями:

$7\text{CO} + 2,5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow (\text{CHO}) + 6\text{CO}_2$ — для аэробных карбоксидотрофов;

$\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$ — для метаногенов;

$4\text{CO} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{-COOH} + 2\text{CO}_2$ — для гомоацетогенов;

$\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{CO}_2$ — для фототрофов и анаэробных хемотрофов;

$4\text{CO} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 4\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{S}$ — для сульфатредукторов.

Недавно выделены термофильные водородобразующие анаэробные прокариоты, окисляющие угарный газ по реакции $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2$. Это прямые и изогнутые палочки или нити, имеющие клеточную стенку грамположительного типа и S-слой (*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*, *C. restrictus*, *Carboxydocella thermoautotrophica* и др.). Многие из них обладают жгутиковой подвижностью. Они обитают в пресных и морских водоемах при температуре 80–85°C и pH, близком к нейтральному. К этой группе относится и архей рода *Thermococcus*, выделенный из глубоководного горячего источника. Такие микроорганизмы используют угарный газ в качестве единственного источника углерода и энергии.

Аэробные карбоксидобактерии обладают оксидазными системами, малочувствительными к угарному газу, а у анаэробов оксидазы отсутствуют. Окисление CO кислородом (типичная карбоксидотрофия) происходит по уравнению



У аэробных карбоксидотрофов обнаружена Mo-Fe-флавиновая форма фермента CO-дегидрогеназы (обычно НАД⁺-зависимой) массой 300 кДа, состоящая из трех субъединиц, содержащая молибден и FeS-кластер. Для анаэробных бактерий и архей, окисляющих CO, показана Ni-Fe-форма этого фермента. Иногда гены, кодирующие CO-дегидрогеназу, находятся в плаزمидах. Анаэробные прокариоты, имеющие ацетил-КоА-путь, могут окислять угарный газ с помощью CO-дегидрогеназы-ацетил-КоА-синтазы.

7.5. Фотосинтез

7.5.1. Основные понятия

Фотосинтез — один из основополагающих метаболических процессов, так как почти вся энергия на Земле происходит от энергии Солнца. Многие микроорганизмы могут поглощать свет и использовать его в качестве источника энергии для синтеза АТФ и восстановительных эквивалентов.

Процесс преобразования световой энергии в химическую носит название **фотосинтеза**.

Эта энергия дает возможность фотосинтезирующим организмам образовывать органический материал для роста. Автотрофные фотосинтетики являются первичными продуцентами в пищевых цепях биосферы. Фотосинтез также восполняет потребности в кислороде аэробно дышащих организмов. Способность к фотосинтезу наблюдается в разных системати-

ческих группах живых организмов. Среди эукариот это, прежде всего, высшие растения, а также многоклеточные зеленые, бурые, красные и одноклеточные эвгленовые, диатомовые и динофлагеллятные водоросли, а среди прокариот — цианобактерии, зеленые и пурпурные бактерии, гелиобактерии и галоархеи.

Возбужденная светом молекула фотосинтетического пигмента может передавать энергию, рассеивать ее или преобразовывать в химическую связь, направляя в ЭТЦ. Фотосинтетический аппарат (**фотосистема**) локализован в мембранах и состоит из светособирающих структур (ловушек, или антенн), реакционных центров (РЦ) и ЭТЦ. РЦ и антенна составляют фотосинтетическую единицу. Времена перехода электрона в другие энергетические состояния при фотосинтезе равняются $\approx 10^{-9}$ — 10^{-12} с. У разных групп фототрофных микроорганизмов фотосинтетический аппарат характеризуется различной степенью сложности. Основными фотосинтетическими пигментами являются сложные молекулы, имеющие разные заместители при тетрапиррольном ядре (рис. 7.38) и различающиеся способностью поглощать свет разной длины волны. У эукариот и цианобактерий — это **хлорофиллы (Хл)**, у пурпурных, зеленых и гелиобактерий — **бактериохлорофиллы (Бхл)**.

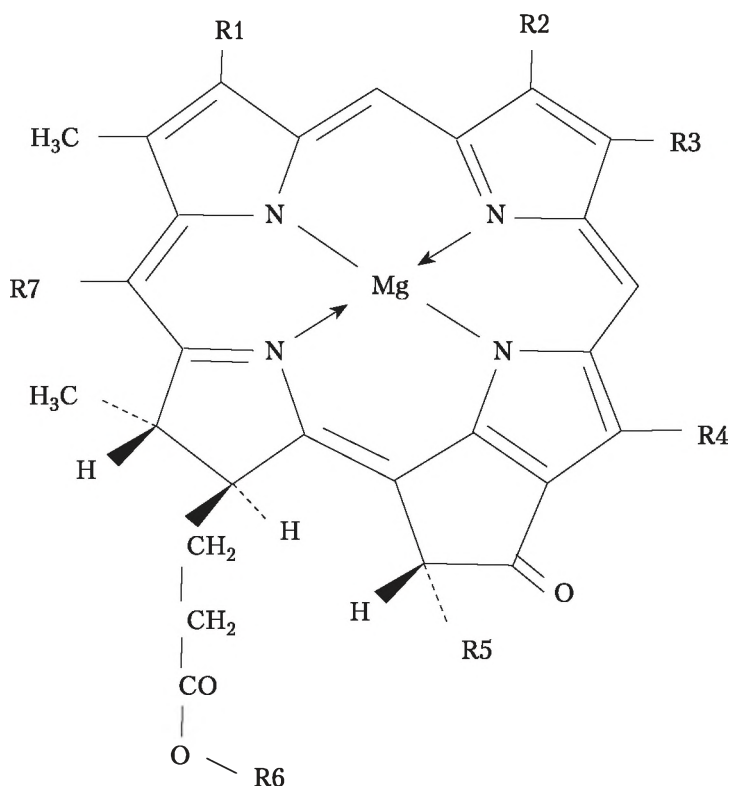


Рис. 7.38. Обобщенная формула хлорофиллов и бактериохлорофиллов:

R1...R7 — различные заместители тетрапиррольного кольца

Вспомогательные пигменты представлены **каротиноидами** и **фикобилипротеинами**, поглощающими свет в тех областях спектра (470–640 нм), которые отличаются от областей основных пигментов. Наиболее известны такие каротиноиды, как β -каротин у некоторых цианобактерий и большинства водорослей и фукоксантин у динофлагеллят, диатомовых и бурых водорослей. Красные водоросли и цианобактерии имеют фикобилипротеины — красный фикоэритрин с максимумом поглощения 550 нм и синий фикоцианин с максимумом поглощения 620–640 нм. Наличие вспомогательных пигментов позволяет использовать более широкий спектр световых волн при фотосинтезе, а также защищать клетки от высокой интенсивности солнечного света, приводящей к окислению и повреждению фотосинтетического аппарата.

Основные и вспомогательные пигменты объединены в антенны, цель которых уловить как можно больше фотонов и затем передать энергию пигменту реакционного центра, непосредственно связанному с ЭТЦ. Поглощение порции света приводит к переходу одного из электронов основного пигмента РЦ в возбужденное состояние. Он отрывается от молекулы пигмента и передается первичному переносчику в ЭТЦ. Двигаясь от переносчика к переносчику, электрон отдает энергию и возвращается к пигменту, восстанавливая его. В пунктах сопряжения ЭТЦ энергия может быть потрачена на образование макроэргической связи АТФ. Такой процесс синтеза АТФ, при котором электрон движется по кругу, называется **циклическим фотофосфорилированием** (рис. 7.39, а). В этом случае восстановительные эквиваленты не образуются. При **нециклическом фотофосфорилировании** электрон пигмента идет на восстановление пиридиннуклеотида, а окисленный пигмент получает электрон от внешнего донора через ряд переносчиков (рис. 7.39, б), т.е. поток электронов становится незамкнутым. Перенос электронов от такого донора также может сопровождаться образованием АТФ. Роль внешнего донора могут играть некоторые органические вещества, восстановленные соединения серы, молекулярный водород и вода.

Циклическое и нециклическое фотофосфорилирование с участием всех доноров электронов, кроме воды, осуществляют **фотосистемы I** типа (**ФС I**). Использование воды предполагает ее окисление до молекулярного кислорода и требует участия дополнительной **фотосистемы II** (**ФС II**). ФС I поглощает квант света (≥ 680 нм) и передает электрон на низкопотенциальный переносчик **ферредоксин (Фд)**, который восстанавливает НАД(Ф)⁺ до НАДФН. Так как этот электрон потрачен на синтез восстановителя, то другой электрон для восстановления пигмента фотосистемы I поставляет фотосистема II. Антенны ФС II поглощают более коротковолновый свет (≤ 680 нм) и передают энергию пигменту РЦ II, высокоэнергетичный электрон которого, проходя по ЭТЦ II, восстанавливает пигмент РЦ I и обеспечивает образование АТФ. Сам пигмент РЦ II получает необходимый электрон, окисляя воду. При этом в качестве побочного продукта фотосинтеза выделяется О₂. Поток электронов от воды через ФС II и ФС I к пиридиннуклеотиду носит название **Z-схемы** (рис. 7.40).

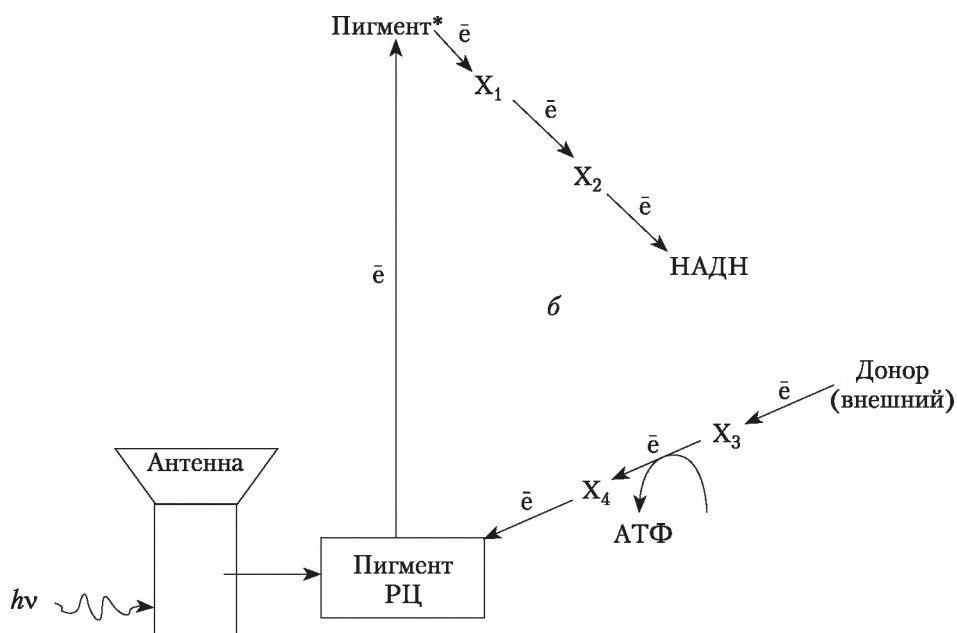
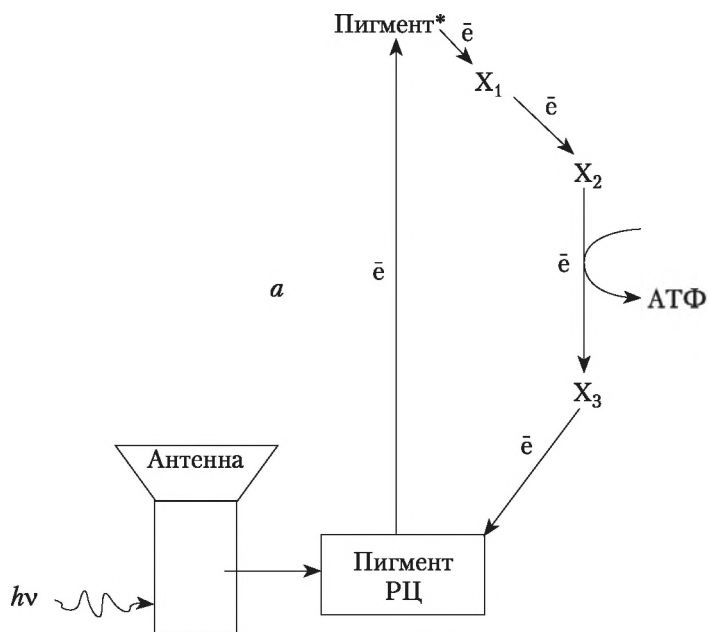


Рис. 7.39. Фотофосфорилирование:

a — циклическое; b — нециклическое;
РЦ — реакционный центр; $X_{1,2,\dots}$ — переносчики в ЭТЦ

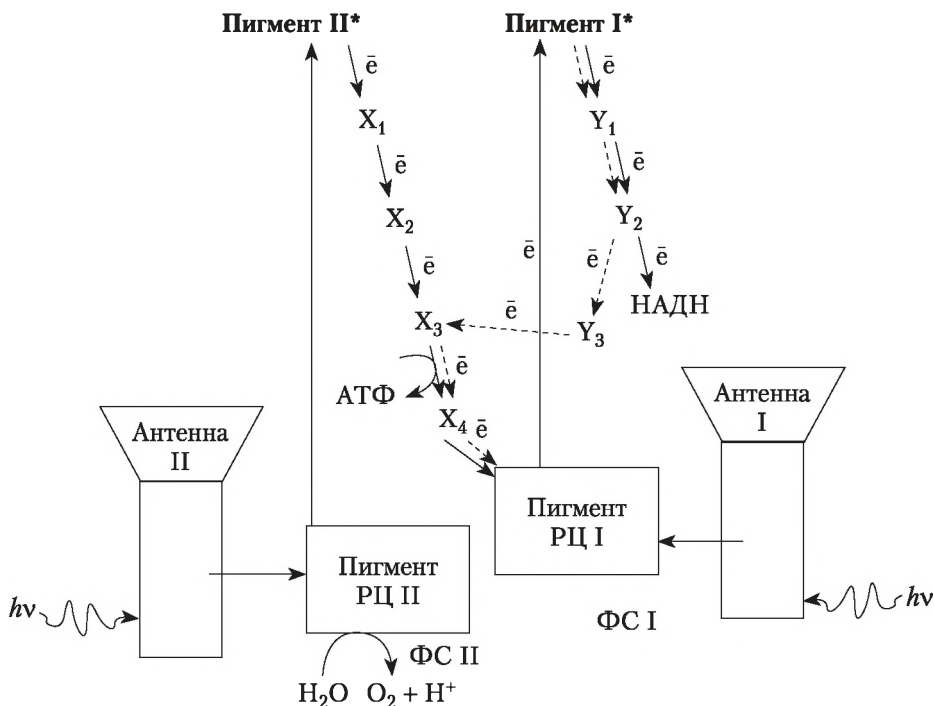
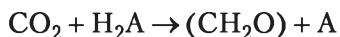


Рис. 7.40. Z-схема оксигенного фотосинтеза:

РЦ — реакционный центр; $X_{1,2...}$, $Y_{1,2...}$ — переносчики в ЭТЦ; циклический путь показан пунктирными стрелками

Фотосинтез с выделением кислорода при участии ФС II называют **оксигенным**. При функционировании только ФС I с использованием отличных от воды доноров электронов происходит **аноксигенный фотосинтез**, так как в этом случае кислород не образуется.

Часто под фотосинтезом подразумевают не только образование АТФ и восстановителей под действием света, но и их дальнейшее использование для автотрофной ассимиляции CO_2 и синтеза клеточных компонентов. Тогда процесс делят на две стадии: **световая стадия** заключается в поглощении света и его преобразовании в энергию химических связей, а **темновая стадия** проходит уже без участия света и приводит к ассимиляции углерода с затратой синтезированных в световой стадии АТФ и восстановителей. В этом случае суммарное уравнение фотосинтеза, сформулированное К. ван Нилем, в общем виде может быть записано таким образом:



где H_2A и A — восстановленная и окисленная формы донора электронов.

Темновые реакции ассимиляции у разных микроорганизмов происходят по-разному.

Микроорганизмы, осуществляющие бактериальный фотосинтез, входят в различные кластеры на филогенетическом древе (рис. 7.41) и не формируют общей компактной группы.

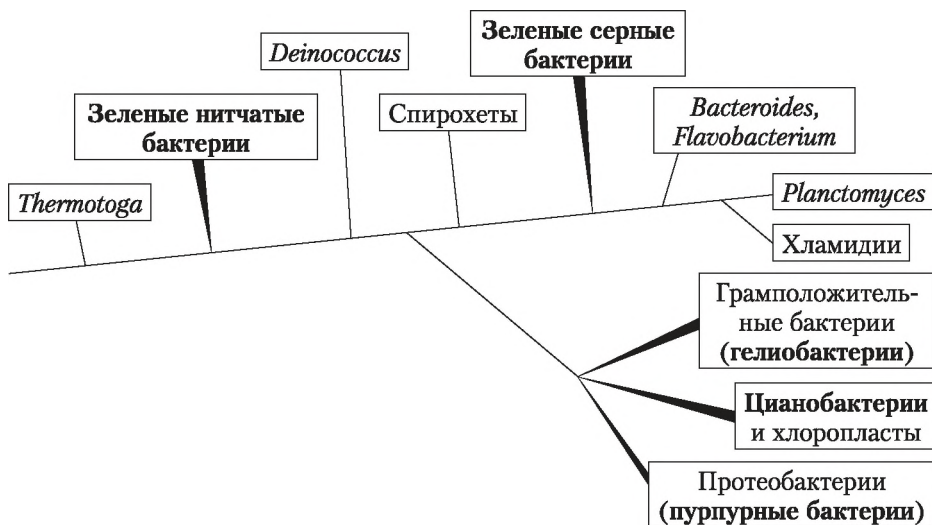


Рис. 7.41. Расположение групп фототрофных микроорганизмов (выделены жирным шрифтом) на филогенетическом древе

7.5.2. Пурпурные бактерии

Пурпурные бактерии — это грамотрицательные микроорганизмы, входящие в классы *Alpha*-, *Beta*- и *Gamma*proteobacteria (рис. 7.42) и осуществляющие **аноксигенный фотосинтез**.

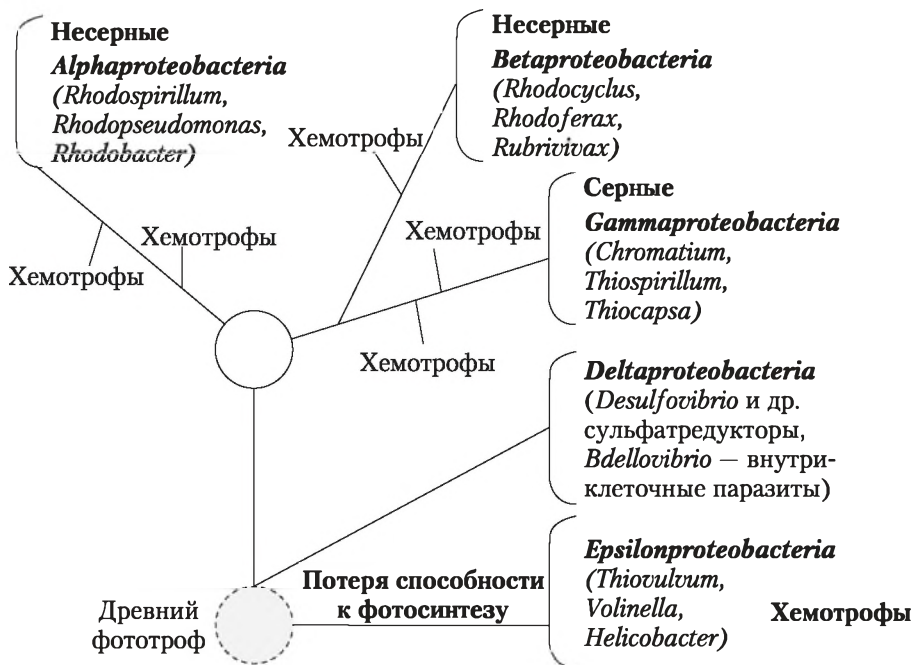


Рис. 7.42. Место пурпурных бактерий в филуме *Proteobacteria*

Фотосинтетический аппарат у них расположен во внутриклеточных выростах ЦПМ различной формы. По традиции очень разнородную группу пурпурных бактерий делят на **серных**, которые откладывают элементарную серу внутри и вне клеток, и **несерных**, никогда серу не откладывающих. Так, представители семейства *Chromatiaceae* откладывают элементарную серу внутри клеток и способны к автотрофии. Организмы семейства *Ectothiorhodospiraceae* также могут расти автотрофно, но элементарную серу откладывают вне клеток. Среди них много морских и алкалифильных видов. Порядки *Rhodospirillales*, *Rhodobacterales*, *Rhodocyclales* относятся к так называемым пурпурным несерным бактериям, которые не накапливают серу внутри клеток и преимущественно растут фотогетеротрофно. **Пурпурные бактерии** — одноклеточные организмы разной формы и размеров, часто образующие устойчивые сочетания клеток (диплококки, тетрады, сеточки, таблички и т.д.) (рис. 7.43, табл. 7.7). Среди них встречаются неподвижные, иногда содержащие газовые вакуоли формы, и клетки, имеющие жгутики. Подвижные виды обладают активным фототаксисом.

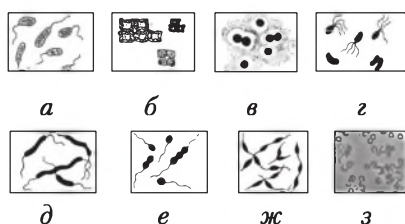


Рис. 7.43. Представители пурпурных бактерий:

a — *Chromatium okenii*; *б* — *Thiopedia rosea*; *в* — *Thiocapsa roseopersicina*;
з — *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*; *д* — *Rhodospirillum rubrum*; *е* — *Rhodopseudomonas spheroides*; *ж* — *Rhodobacterium vannielii*; *з* — *Rhodocyclus purpureus*

Таблица 7.7

Краткая характеристика некоторых пурпурных бактерий

Характеристика	Род	Систематическое положение
Пурпурные несерные бактерии		
Спириллы с полярными жгутиками	<i>Rhodospirillum</i>	Филум <i>Proteobacteria</i> Класс <i>Alphaproteobacteria</i>
Палочки с полярными жгутиками, размножаются почкованием	<i>Rhodopseudomonas</i>	
Палочки, размножаются бинарным делением	<i>Rhodobacter</i>	
Яйцеобразные клетки	<i>Rhodovulum</i>	
Овальные клетки с перитрихальным жгутикованием, образуют гифы, размножаются почкованием	<i>Rhodobacterium</i>	
Большие сферические клетки, ацидофилы (pH = 5,0)	<i>Rhodopila</i>	

Характеристика	Род	Систематическое положение
Кольцеобразные изогнутые клетки	<i>Rhodocyclus</i>	Филум <i>Proteobacteria</i> Класс <i>Betaproteobacteria</i>
Искривленные палочки	<i>Rubrivivax</i>	
Искривленные палочки	<i>Rhodoferax</i>	
Пурпурные серные бактерии:		
А. Откладывают серу снаружи		Филум <i>Proteobacteria</i> Класс <i>Gammaproteobacteria</i>
Спириллы с полярными жгутиками	<i>Ectothiorhodospira</i>	
Спириллы, экстремальные галофилы	<i>Halorhodospira</i>	
Б. Откладывают серу внутри клетки		
Овальные палочки с полярными жгутиками и без газовых вакуолей	<i>Chromatium</i>	
Диплококки и тетрады без газовых вакуолей, неподвижны	<i>Thiocapsa</i>	
Сферические или овальные клетки без газовых вакуолей с полярными жгутиками	<i>Thiocystis</i>	
Крупные спириллы без газовых вакуолей с полярными жгутиками	<i>Thiospirillum</i>	
Мелкие изогнутые клетки без газовых вакуолей	<i>Thiorhodovibrio</i>	
Крупные палочки-веретенца без газовых вакуолей (1,5—1,7 мкм × 16—32 мкм)	<i>Rhabdochromatium</i>	
Неправильные сферические или овальные клетки с газовыми вакуолями, неподвижны	<i>Amoebobacter</i>	
Палочки с газовыми вакуолями и полярными жгутиками	<i>Lamprobacter</i>	
Сферические или овальные клетки с газовыми вакуолями и полярными жгутиками	<i>Lamprocystis</i>	
Неподвижные палочки с газовыми вакуолями, образующие сетку	<i>Thiodiction</i>	
Неподвижные сферические клетки с газовыми вакуолями в плоских тетрадах	<i>Thiopedia</i>	

Пурпурные бактерии размножаются бинарным делением или почкованием. Некоторые виды могут образовывать цисты и экзоспоры. Клеточная стенка пурпурных бактерий граммотрицательного типа покрыта слизистым слоем или капсулой, у некоторых представителей имеется S-слой из гексагонально расположенных белков. В качестве запасных веществ у них обнаружены поли- β -гидроксиалканоаты и гликоген.

Данные бактерии формируют только ФС I, содержащую Бхл *a*, *b* и каротиноиды. Синтез бактериохлорофиллов подавляется кислородом, но может идти в темноте. Из переносчиков у пурпурных бактерий обнаружены цитохромы, FeS-белки и тиоредоксины, убихиноны и менахиноны. При циклическом фотофосфорилировании Бхл *a* реакционного центра возбуждается и передает электрон на бактериофеофитин (рис. 7.44). Электрон проходит через хинон и ряд переносчиков назад к P_{870} , восстанавливая его. При этом на уровне цитохромов образуется АТФ.

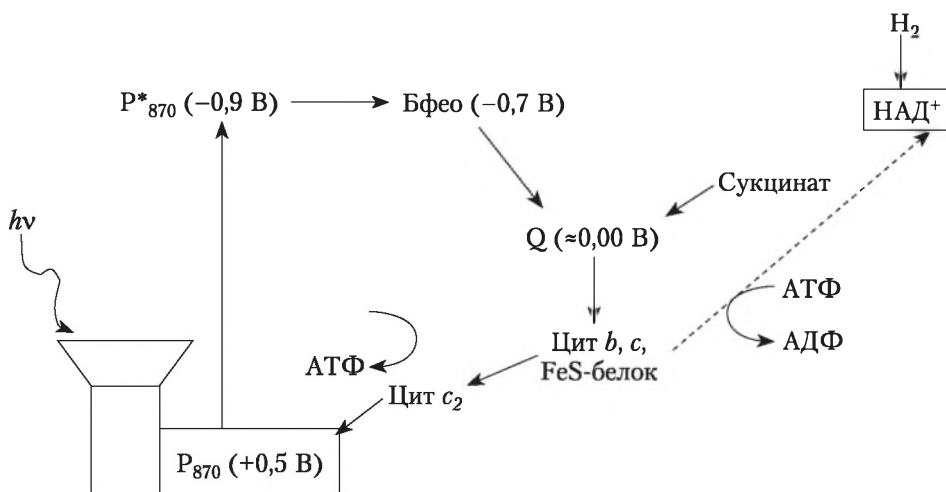


Рис. 7.44. Схема фотосинтеза у пурпурных несерных бактерий:

пунктирная линия — обратный перенос электронов; P_{870} — бактериохлорофилл *a*; Бфео — бактериофеофитин; Q — хинон

Из-за отсутствия ФС II эти микроорганизмы не могут использовать воду как донор электронов в нециклическом электронном транспорте и поэтому не выделяют кислород при фотосинтезе. Пурпурные бактерии не образуют НАДН непосредственно в световых реакциях фотосинтеза. Чтобы синтезировать восстановительные эквиваленты, им необходимо либо использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, который может напрямую восстановить $НАД^+$, либо осуществить обратный перенос электронов с затратой энергии. В этом случае электрон, потраченный на восстановление пиридиннуклеотида, может быть получен от доноров электронов с более отрицательным потенциалом, чем вода, и, таким образом, легче окисляемых. Для этих целей пурпурные бактерии обычно используют H_2S , S^0 и другие восстановленные соединения серы, а также простые органические вещества.

Пурпурные бактерии предпочитают расти на свету в анаэробных условиях. Некоторые представители пурпурных несерных бактерий способны к росту в темноте, в том числе в микроаэрофильных и аэробных условиях. Для большинства видов необходима высокая интенсивность света (≈ 500 люкс), только род *Amoebobacter* требует низкой освещенности (50–100 люкс) при пониженных температурах роста. Большинство пурпурных бактерий мезофилы, к психроактивным организмам относятся члены родов *Amoebobacter* и *Lamprocystis*, а термофильные виды входят в роды *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). Источниками углерода для пурпурных бактерий могут быть углекислый газ и органические вещества (в том числе C_1 -соединения). При автотрофном росте CO_2 фиксируется в цикле Кальвина, активность которого подавляется добавлением органики. В отсутствие света роль органических веществ как источника энергии увеличивается, происходят брожения разного типа. Сахара используются пурпурными бактериями через гликолиз или КДФГ-путь. У большинства из них имеется полный или незамкнутый ЦТК и глиоксилатный шунт. У ряда пурпурных несерных бактерий без глиоксилатного шунта (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*) обнаружен **цитрамалатный цикл**, в котором ацетил-КоА превращается в глиоксилат в цепи реакций: ацетил-КоА + пируват $\rightarrow$ цитрамалил-КоА $\rightarrow$ цитрамалат $\rightarrow$ мезаконат $\rightarrow$ мезаконил-КоА $\rightarrow$ 3-метилмалил-КоА $\rightarrow$ глиоксилат + пропионил-КоА. Далее глиоксилат включается в ЦТК при участии малатсинтазы, а пируват регенерирует из пропионил-КоА через карбоксилазную реакцию: пропионил-КоА $\rightarrow$ метилмалонил-КоА $\rightarrow$ сукцинил-КоА $\rightarrow$ сукцинат $\rightarrow$ $\rightarrow$ фумарат $\rightarrow$ малат $\rightarrow$ оксалоацетат $\rightarrow$ ФЕП $\rightarrow$ пируват. Некоторые пурпурные бактерии способны к анаэробному дыханию с сульфатом, нитратом, серой, Fe^{3+} , СО или органическими соединениями в качестве акцепторов электронов. Для бактерий родов *Thiocapsa* и *Chromatium* показан хемолютоавтотрофный рост с молекулярным водородом и сульфидом в качестве доноров электронов. Пурпурные бактерии используют широкий спектр соединений азота, многие из них способны к азотфиксации. Представители несерной группы нуждаются в витаминах.

Пурпурные бактерии — это, в основном, водные микроорганизмы, обычно живущие в бескислородных водах с сероводородом. Они развиваются на глубинах, куда проникает свет, в редких случаях обнаруживаются на больших глубинах. Бактерии несерной группы предпочитают богатые органикой пресные водоемы, болотистые почвы и прибрежные морские воды, при этом они редко образуют скопления, придающие воде окраску. Пурпурные серные бактерии, наоборот, образуют видимые скопления в прозрачных водоемах на границе анаэробной зоны. Такие слои лучше формируются в меромиктических (с более высокой придонной соленостью) или в голомиктических (с сезонной стратификацией) водо-

емах и по берегам морей в лиманных областях. В прибрежных зонах морей пурпурные бактерии ответственны за «красные приливы». Представители рода *Ectothiorhodospira* тяготеют к соленым и щелочным местообитаниям, морским эстуариям. В глобальном круговороте серы пурпурные бактерии функционально тесно связаны с сульфатредукторами. Характерно сосуществование аналогичных видов пурпурных бактерий в одном и том же слое водоема за счет «разобшения» их активностей во времени. Так, *Chromatium okenii* и *C. vinosum* различаются по константе сродства и скорости окисления сульфида. В периодической лабораторной 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 в течение дня, и вечером *C. vinosum* начинает медленно окислять оставшееся малое количество H_2S , а первый микроорганизм рост прекращает. Пурпурные бактерии обнаружены также в почве, но там их роль невелика.

7.5.3. Зеленые бактерии

Зеленые бактерии составляют две компактные систематические группы. Филум *Chlorobi*, или **зеленые серные бактерии**, — это филогенетически однородный кластер микроорганизмов:

Филум B11. *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*

Хлоробии — это грамотрицательные микроорганизмы, осуществляющие аноксигенный фотосинтез и откладывающие снаружи элементарную серу. Клетки зеленых серных бактерий представляют собой неподвижные или скользящие палочки, вибрионы или нити (рис. 7.45, табл. 7.8), не содержащие внутрицитоплазматических мембран. Часто они образуют различные выросты клетки (**простеки**), увеличивающие всасывающую и светособирающую поверхность. Некоторые представители образуют газовые вакуоли. В качестве запасного вещества хлоробии могут накапливать в клетках гликоген.

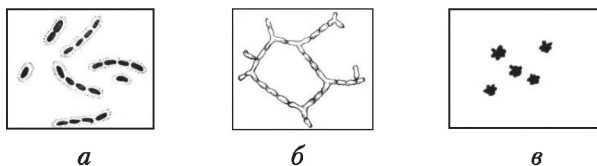


Рис. 7.45. Представители зеленых серных бактерий:

a — *Chlorobium limicola*; *б* — *Pelodictyon clatritiforme*; *в* — *Prosthecochloris aestuarii*

Краткая характеристика некоторых зеленых серных бактерий

Характеристика		Род
Без газовых вакуолей	Неподвижные прямые или изогнутые палочки	<i>Chlorobium</i>
	Сферические клетки с простеками	<i>Prosthecochloris</i>
С газовыми вакуолями	Ветвящиеся неподвижные палочки, образующие сеть	<i>Pelodictyon</i>
	Сферические клетки с простеками	<i>Ancalochloris</i>
	Скользющие палочки	<i>Chloroherpeton</i>

У хлоробий ФС I лежит в ЦПМ и содержит Бхл *a*, *c*, *d* или *e* и каротиноиды циклического типа. Светособирающие пигменты находятся в **хлоросомах (хлоробиум-везикулах)**, округлых тельцах, покрытых белковой оболочкой (рис. 7.46, *a*). Они прикреплены к внутренней стороне ЦПМ базальной пластинкой. Из переносчиков электронов у хлоробий обнаружены цитохромы *c* и *b*, а также менахины. Подавляющее большинство зеленых серных бактерий — фотоавтотрофы и облигатные анаэробы. Они способны как осуществлять циклическое фотофосфорилирование, так и синтезировать восстановительные эквиваленты во время световой стадии путем простого нециклического переноса электронов от ферредоксина, или с помощью обратного переноса электронов с затратой энергии (рис. 7.46, *б*). Для восстановления пигмента реакционного центра зеленые серные бактерии используют внешние доноры электронов (H_2S , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ и др.).

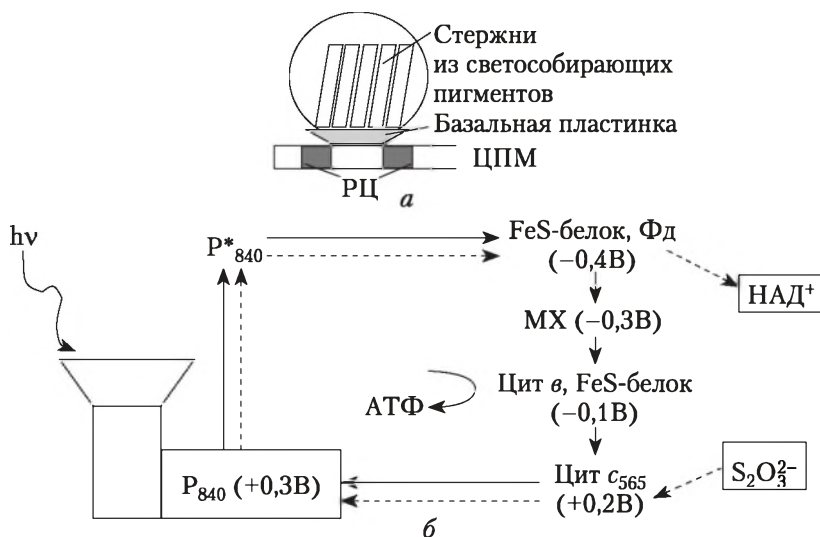


Рис. 7.46. Фотосинтез у зеленых серных бактерий:

a — структура фотосинтетического аппарата; *б* — схема фотосинтеза;
 МХ — менахинон; циклический путь обозначен сплошными стрелками;
 нециклический — пунктирными

Некоторые представители хлоробий требуют высокой освещенности, а другие способны существовать на глубинах до 80 м при очень слабом освещении. Большинство видов — мезофилы и нейтрофилы, ряд форм относится к галотолерантным.

Ассимиляция CO_2 происходит у хлоробий через **цикл Арнона**, или восстановительный ЦТК (рис. 7.47), с суммарной реакцией $3\text{CO}_2 + 12\text{H}^+ + 5\text{ATP} \rightarrow$ триозо-фосфат. Он считается анаэробным циклом, так как включает в себя ряд ферментов и восстановителей (**ферредоксинов**), чувствительных к O_2 (из аэробных бактерий подобный цикл обнаружен пока только у штаммов рода *Hydrogenobacter*). Ассимиляция углекислоты в этом цикле идет с большой затратой АТФ и восстановительных эквивалентов.

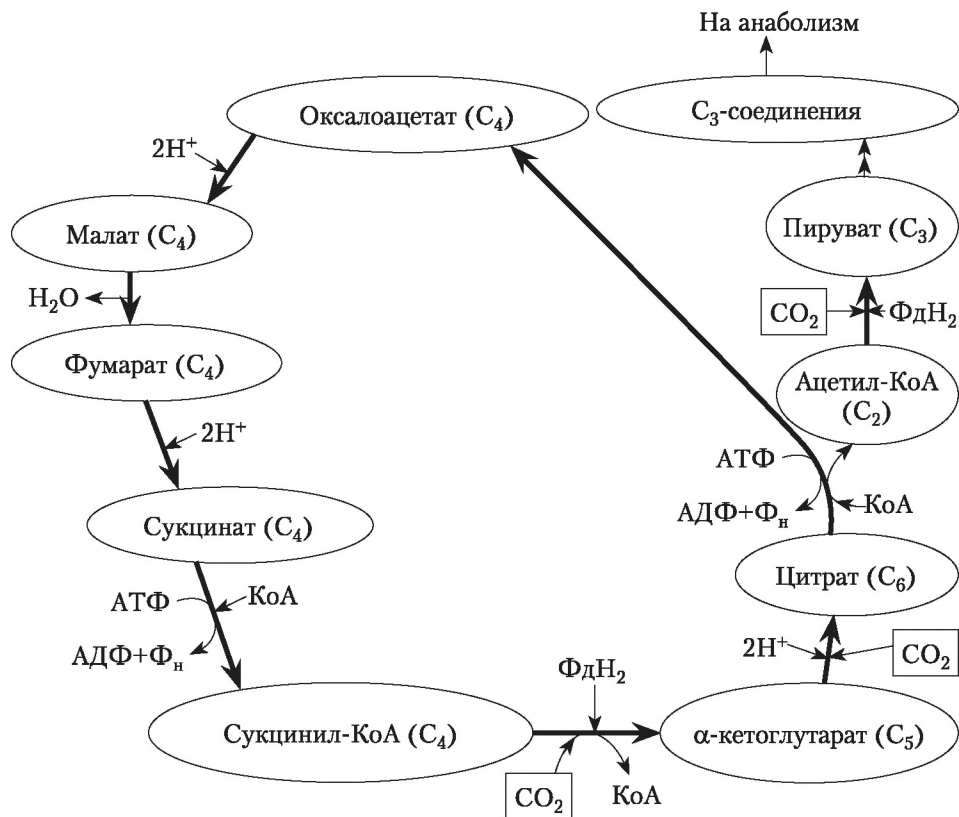


Рис. 7.47. Цикл Арнона у зеленых серных бактерий

Зеленые серные бактерии очень ограниченно используют органические вещества. Цикл Кребса у них незамкнутый, без глиоксилатного шунта. Анаплеротические функции выполняют многочисленные реакции карбоксилирования. Лишь у немногих представителей обнаружена способность к ассимиляционной нитратредукции, поэтому хлоробии предпочитают соли аммония в качестве источника азота. Ассимиляционная сульфатредукция у этих бактерий отсутствует, поэтому они нуждаются в восстановленных соединениях серы. Некоторым видам необходим витамин B₁₂.

Зеленые серные бактерии редко образуют скопления. Они растут в илах в зоне хемоклина под слоем пурпурных бактерий. С продвижением в глубину зеленые виды замещаются коричневыми. Для них характерно образование тесных ассоциаций с анаэробно дышащими микроорганизмами, восстанавливающими соединения серы, на основе синтрофии по сероводороду.

Зеленые нитчатые (несерные) бактерии филогенетически далеко отстоят от зеленых серных бактерий. Они входят в филум *Chloroflexi*, состоящий из одного класса *Chloroflexi*, и образуют порядок *Chloroflexales* из двух семейств:

Семейство 1. *Chloroflexaceae*

Род 1. *Chloroflexus*

Род 2. *Chloronema*

Род 3. *Heliothrix*

Семейство 2. *Oscillochloridaceae*

Род 1. *Oscillochloris*

Второй порядок *Herpetosiphonales* этого класса состоит из нитчатых микроорганизмов, не способных к фотосинтезу.

Зеленые несерные бактерии имеют палочковидные клетки, собранные в нити, с чехлами или без, передвигающиеся скольжением и обладающие рядом таксисов. У некоторых видов формируются газовые вакуоли (табл. 7.9). В качестве запасных веществ зеленые нитчатые бактерии могут накапливать поли-β-гидроксиполкианоаты и полиглюканы.

Таблица 7.9

Краткая характеристика некоторых зеленых серных бактерий

Характеристика		Род
Без газовых вакуолей	Нитчатые скользкие	<i>Chloroflexus</i>
	Нитчатые скользкие, оранжевого цвета	<i>Heliothrix</i>
	Нитчатые скользкие, имеют большой диаметр клетки (2–5 мкм)	<i>Oscillochloris</i>
С газовыми вакуолями	Нитчатые скользкие, имеют большой диаметр клетки (2–2,5 мкм)	<i>Chloronema</i>

Фотосинтетический аппарат зеленых несерных бактерий локализован в хлоросомах и ЦПМ и содержит Бхл *a*, *c*, *d* или *e* и каротиноиды. Синтез бактериохлорофиллов у них происходит на свету и в темноте, но в отсутствие кислорода. Вспомогательные пигменты представлены β-, γ-каротином или микобактином. Из переносчиков найдены цитохромы *b*, *c*, менахиноны и FeS-белки. Донорами электронов при фотосинтезе могут быть восстановленные соединения серы (чаще всего сероводород) и молекулярный водород. Представители этой группы требуют для фотосинтеза высокой интенсивности света.

Среди зеленых несерных бактерий есть мезофильные и термофильные формы. Рост происходит в интервале pH 7,0–9,0, некоторые виды требуют

повышенной концентрации NaCl (5–12%). Все зеленые несерные бактерии обладают значительной толерантностью к H_2S .

Представители этой группы способны к фотоавтотрофии, но предпочитают фотогетеротрофный образ жизни с использованием широкого набора органических веществ. У разных штаммов рода *Chloroflexus* обнаружен глиоксилатный цикл автотрофной фиксации CO_2 в двух модификациях — в виде гидроксипропионатного пути (рис. 7.48, а) и более простого восстановительного цикла дикарбоновых кислот (рис. 7.48, б).

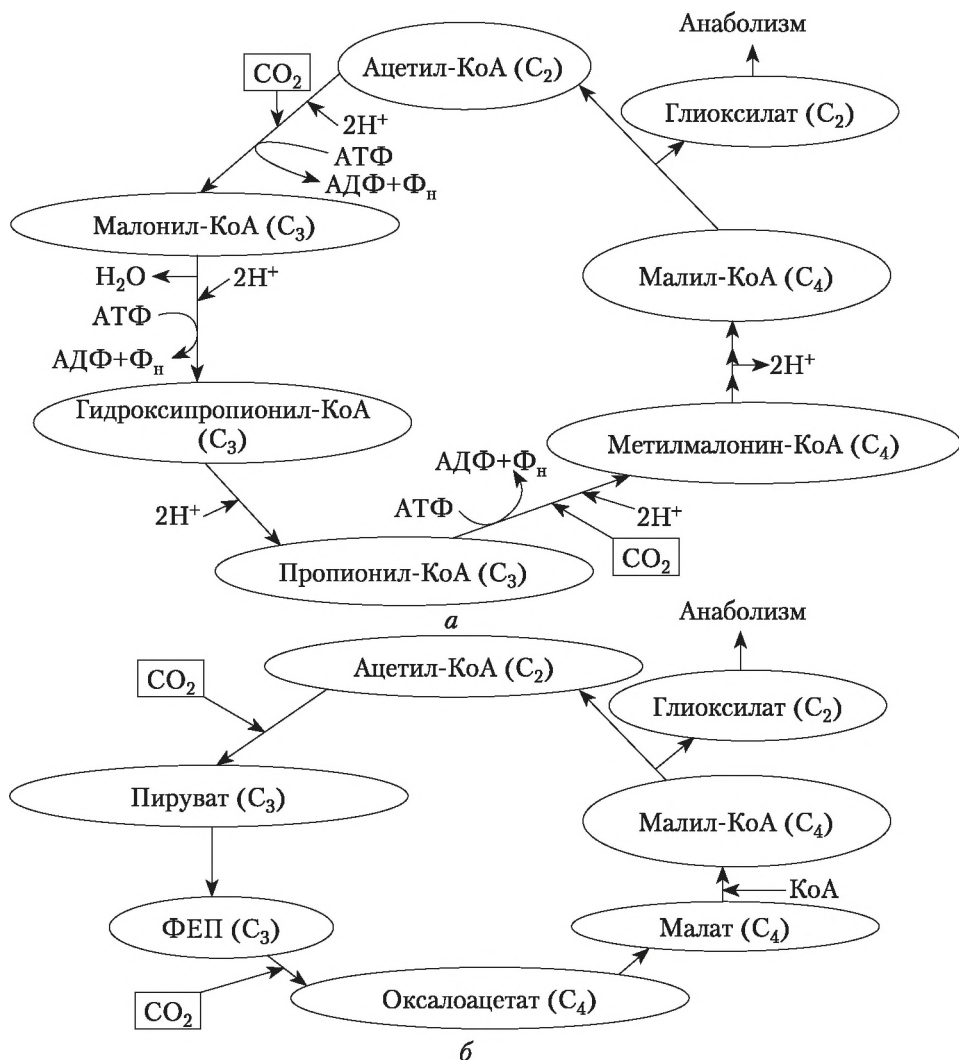


Рис. 7.48. Две модификации глиоксилатного цикла у штаммов рода *Chloroflexus*:

а — гидроксипропионатный путь; б — восстановительный цикл дикарбоновых кислот

Многие из зеленых несерных бактерий имеют полный ЦТК и глиоксилатный шунт и могут потреблять различные органические субстраты. Для

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. Большинство зеленых нитчатых бактерий потребляют азот в виде солей аммония и в составе органических соединений. Способность к ассимиляционной сульфатредукции показана для штаммов рода *Chloroflexus*. Отдельные представители зеленых несерных бактерий нуждаются в наборе витаминов. Следует заметить, что для целого ряда штаммов этого филума вопрос о способе питания и метаболических путях остается открытым, так как выделение нитчатых организмов в чистые культуры представляет значительную трудность из-за существования в их слизистых чехлах многочисленных микроорганизмов-спутников.

Зеленые несерные бактерии — это обитатели горячих серных и пресных вод.

7.5.4. Гелиобактерии

Гелиобактерии как фототрофная группа были описаны одними из последних, поэтому данных о них еще немного. Они относятся к грамположительным микроорганизмам с низким содержанием Г + Ц в ДНК и родственны клостридиям:

Филум *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, липополисахариды отсутствуют, наличие белкового слоя варьирует, а клетки красятся по Граму отрицательно. **Гелиобактерии** — это одноклеточные плеiomорфные палочковидные или спиральные организмы, передвигающиеся путем скольжения или с помощью жгутиков (табл. 7.10). В природных местообитаниях они способны образовывать эндоспоры, но в лабораторной культуре это свойство утрачивается.

Таблица 7.10

Краткая характеристика некоторых гелиобактерий

Характеристика	Род
Палочки, скользкие или с полярными жгутиками	<i>Heliobacterium</i>
Палочки-перитрихи	<i>Heliobacillus</i>
Палочки в агрегатах, обладающих общей подвижностью	<i>Heliophilum</i>

Фотосинтетический аппарат гелиобактерий локализован в ЦПМ и построен по принципу ФС I. Основным пигментом является Бхл g,

а вспомогательные представлены C_{30} -каротиноидами. Из переносчиков у них найдены цитохромы *c*, *bc₁* и менахиноны. Гелиобактерии на свету растут только в анаэробных условиях при высокой интенсивности света, осуществляя аноксигенный фотосинтез, схожий с процессом у зеленых серных бактерий. В качестве доноров электронов эти микроорганизмы используют восстановленные соединения серы и молекулярный водород. В темноте они могут существовать микроаэрофильно или за счет серного дыхания. Гелиобактерии предпочитают фотогетеротрофный образ жизни. Ассимиляция небольшого числа органических субстратов происходит у них в реакциях карбоксилирования. Автотрофная ассимиляция углекислого газа у гелиобактерий не обнаружена. В темноте они способны к сбраживанию пирувата с образованием ацетата. Некоторые представители обладают способностью к ассимиляционной сульфатредукции. Гелиобактерии активно фиксируют молекулярный азот.

Гелиобактерии широко распространены в почвах (часто сухих) и нередко связаны с растениями. За счет своей способности фиксировать атмосферный азот они обогащают почву его соединениями. Гелиобактерии живут также в зоне метаногенеза горячих источников и содовых озер и обнаруживаются в циано-бактериальных матах.

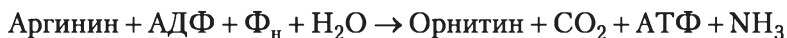
7.5.5. Цианобактерии

Одной из обширных и древних групп фотосинтезирующих организмов, способных к кислородному фотосинтезу, являются **цианобактерии**. Эта группа включает в себя как очень простых по строению, так и самых сложно организованных представителей прокариотических организмов. Цианобактерии бывают одноклеточные, колониальные и нитчатые, часто существующие в виде устойчивых агрегатов. Они имеют отдаленное родство с грамположительными бактериями. Их грамотрицательные клеточные стенки, как правило, состоят из четырех слоев (муреин и три прозрачных слоя). На поверхности может присутствовать также белковый S-слой. Многие представители имеют внешние оболочки (**чехлы**), способствующие агрегации клеток. Чехлы могут быть структурированными и инкрустированными различными веществами, поэтому часто сохраняются в виде окаменелостей и образуют **строматолиты**. В агрегатах поверхностные структуры могут быть общими для всех клеток. Каждая клетка сообщается с соседней при помощи специальных канальцев (плазмодесм). Через **плазмодесмы** передаются также соединения азота и регуляторные вещества (L-метионин). У цианобактерий наблюдается большое разнообразие внутриклеточных структур. Это газовые вакуоли у водных форм, способствующие их флотации, тилакоиды с фикобилисомами, карбокисомы, запасные вещества и включения.

Некоторые нитчатые цианобактерии образуют специализированные клетки с утолщенной клеточной стенкой (**гетероцисты**) — основное место фиксации азота. В них 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. Из гетероцист в другие клетки через плазмодесмы

поступают связанные формы азота. Чтобы переждать неблагоприятные условия, цианобактерии образуют **акинеты** — круглые толстостенные клетки, аналогичные спорам бактерий, имеющие зернистую структуру и содержащие в качестве запасных веществ цианофицин и глюкан.

Специфическим запасным азотсодержащим веществом цианобактерий является **цианофицин** — разветвленный сополимер аргинина и аспартата. Его масса может составлять до 10% от массы вегетативной клетки. В условиях голодания цианофицин может стать энергодающим веществом, участвуя в реакции



Реакция катализируется ферментом аргининдегидролазой, а АТФ синтезируется путем субстратного фосфорилирования. Фикобилины также могут накапливаться до 10% всего вещества и потребляться в условиях голодания. В отличие от акинет, вегетативные клетки могут запасать и полифосфаты.

Одноклеточные цианобактерии могут размножаться **множественным делением** с образованием из одной клетки большого количества мелких, часто подвижных клеток — **байоцитов**. Нитчатые формы образуют **гормогонии** — части нити, обладающие активным скользящим движением. Цианобактерии также размножаются бинарным делением и почкованием. У цианобактерий по мере усложнения строения увеличиваются объем и копияность генома, в клетках обнаружены плазмиды.

Фотосинтетический аппарат локализован в плоских мембранных мешочках (**тилакоидах**), собранных стопками и связанных с ЦПМ. Основными фотосинтетическими пигментами являются хлорофиллы: Хл *a* — у типичных цианобактерий и Хл *a* и *b* — у цианобактерий-прохлорофит. Светособирающие пигменты находятся в фикобилисомах (рис. 7.49, *a*). **Фикобилисомы**, имеющие полусферическую или полудисковидную форму, располагаются на наружной стороне тилакоидов и содержат фикоэритрин (пик поглощения при 565 нм), фикоцианин (600 нм), а также их модификации, каротиноиды разных типов и светособирающие формы хлорофиллов.

Цианобактерии имеют две фотосистемы (ФС I и ФС II) и два вида антенн. Кислородный фотосинтез осуществляется по **Z-схеме**, причем переносчики электронов в ЭТЦ похожи по составу на растительные (пластохинон и пластоцианин, НАД⁺ и НАДФ⁺, флавопротеиды, цитохромы, в том числе цит *f*).

Процесс фотосинтеза принципиально не отличается от фотосинтеза у эукариотических групп (водорослей, высших растений). ФС I адсорбирует более длинноволновый свет, чем ФС II. Когда антенны ФС I передают световую энергию к хлорофиллу реакционного центра I, он переходит в возбужденное состояние и передает высокоэнергетичный электрон специфическому акцептору (специальному Хл А или FeS-белку), а затем ферредоксину, который восстанавливает НАДФ⁺ до НАДФН. Так как электрон потрачен на восстановительный эквивалент, то для восстановле-

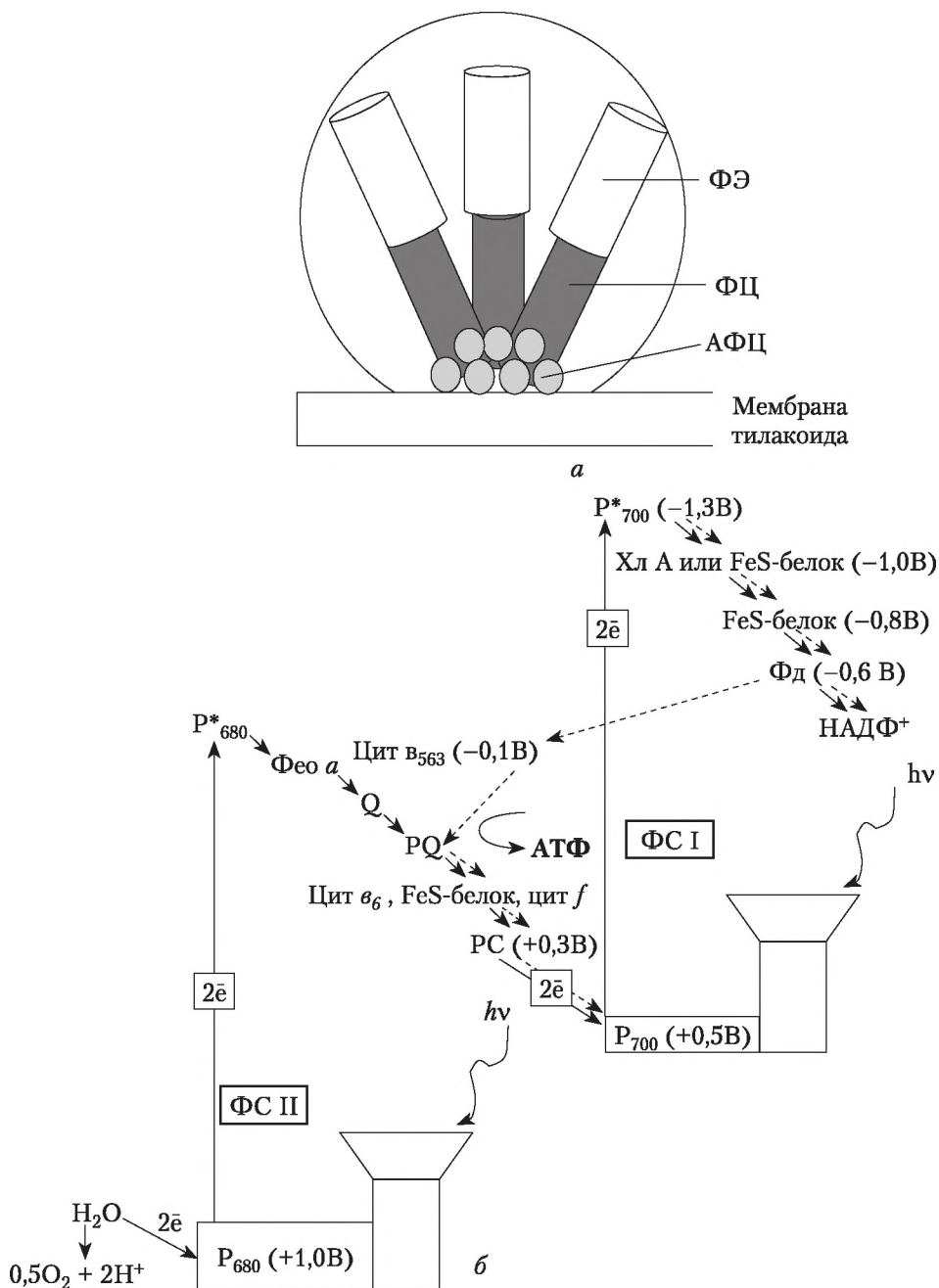


Рис. 7.49. Фотосинтез у цианобактерий:

а — строение фикобилисом; ФЭ — фикоэритрин; ФЦ — фикоцианин; АФЦ — аллофикоцианин; *б* — схема световых реакций фотосинтеза; сплошные стрелки — нециклический путь; пунктирные — циклический путь; ФС I — фотосистема I; ФС II — фотосистема II; P_{680} и P_{700} — хлорофиллы-пигменты фотосинтеза; Фео — феофитин; Q — хинон; PQ — пластохинон, PC — пластоцианин; Хл А — хлорофилл А, Фд — ферредоксин

ния окисленного хлорофилла ФС I необходимо участие ФС II (рис. 7.49, б). Антенны ФС II поглощают свет и передают энергию на хлорофилл реакционного центра II, который переходит в возбужденное состояние и восстанавливает феофитин *a* (Хл *a*, в котором центральный атом магния замещен двумя атомами водорода). Электроны последовательно передаются через хиноны (пластохинон) и ряд переносчиков к реакционному центру ФС I, при этом в пункте сопряжения ЭТЦ синтезируется АТФ. Основной пигмент ФС II получает электроны для своего восстановления при окислении воды с выделением O_2 . Таким образом, при движении двух электронов от воды до НАДФ⁺ путем нециклического фотофосфорилирования синтезируется одна молекула АТФ. Есть данные о том, что донором для ФС II может быть двухвалентное железо.

Цианобактерии способны осуществлять аноксигенный фотосинтез с сероводородом в качестве донора электронов, при этом в клетках не синтезируется ФС II и АТФ образуется путем циклического фотофосфорилирования. При циклическом пути электрон возбужденного светом хлорофилла реакционного центра ФС I движется через ряд переносчиков обратно к окисленному пигменту и восстанавливает его. При этом на участке цитохрома *b₆* синтезируется АТФ.

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 I, что позволяет получать АТФ путем циклического фотофосфорилирования и расти за счет ассимиляции органических веществ.

Из-за сложностей получения чистых культур цианобактерий переход к их бактериологической систематике еще не завершен и иерархия таксонов в филуме *Cyanobacteria* не определена. Поэтому пока их классификация базируется на традиционных «ботанических» принципах, а филум разделен на подсекции. Подсекция I объединяет одноклеточные или живущие в агрегатах организмы. Их скопления окружены чехлами или слизью (рода *Gloeotheca*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Microcystis*, *Chroococcus*). По современной классификации сюда же относят и роды *Prochloron*, *Prochlorococcus* (рис. 7.50, а). Подсекция II включает организмы, размножающиеся с помощью **байоцитов**, когда содержимое большой клетки претерпевает множественное деление на маленькие, часто подвижные клеточки, затем достигающие до размеров материнской клетки (рис. 7.50, б). Байоциты выполняют также функцию освоения жизненного пространства и расселения (роды *Pleurocapsa*, *Dermocarpella*, *Cyanocystis*, *Stanieria*). Подсекция III составлена из нитчатых организмов без специализированных клеток (роды *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Lyngbya*, *Trichodesmium*, *Prochlorothrix*, рис. 7.50, в). Подсекция IV объединяет неветвящиеся нити со специализированными клетками (роды *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema*, *Cylindrospermum*,

рис. 7.50, з). Подсекция V включает нити с истинным ветвлением и специализированными клетками, формирующие многорядные пучки (трихомы) (роды *Fischerella*, *Stigonema*, *Mastigocladus*, *Geitleria*, рис. 7.50, д).

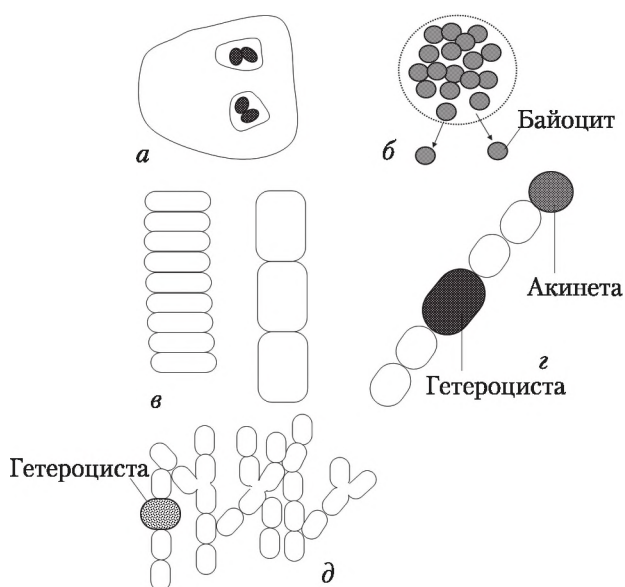


Рис. 7.50. Типичная морфология цианобактерий разных подсекций

До недавнего времени микроорганизмы родов *Prochloron*, *Prochlorothrix* и *Prochlorococcus* относили к отдельной группе **прохлорофит** (порядок *Prochlorales*), но теперь они причислены к цианобактериям. От традиционных цианобактерий прохлорофиты отличаются составом пигментов. Представители рода *Prochloron* являются симбионтами асцидий с диаметром клетки 10–30 мкм. Кокковидные клетки обладают развитой системой внутрицитоплазматических мембран. Фотосинтетический аппарат содержит Хл *a* и *b* в соотношении 4,7 : 1, не содержит фикобилинов и локализован в тилакоидах. Гены, кодирующие белки светособирающих комплексов, гомологичны цианобактериальным, а не хлоропластным. Эти микроорганизмы — мезофилы, имеющие карбоксисомы и фиксирующие углекислоту в цикле Кальвина, но способные использовать небольшие количества органики, как правило, в виде ацетата. Азот они потребляют в аммонийной форме, однако способны и к азотфиксации. Представители рода *Prochlorothrix* — это свободноживущие нитчатые неподвижные организмы, обитающие в мелких озерах. Нити состоят из 20–100 клеток. Система внутрицитоплазматических мембран менее развитая, микроорганизмы имеют Хл *a* и *b* в соотношении 8–9 : 1 и не содержат фикобилипротеинов. Фотосинтетический аппарат локализован в стопках тилакоидов. Фиксация CO_2 происходит в карбоксисомах через цикл Кальвина. В присутствии сероводорода микроорганизмы могут переключаться на анаэробный фотосинтез. Азотфиксация у них не обнаружена, азот потребляется в виде нитратов и солей аммония. Организмы рода *Prochlorococcus* — это очень мелкие

кокки диаметром 0,5—0,7 мкм, содержащие Хл *a* и *b*, а также дивинил-Хл *b* и *c* и фикоэритрин. Эти прохлорофиты являются первичными продуцентами в сумеречной зоне океанов. Подсчитано, что в 1 мл воды присутствует 10^4 — 10^5 клеток этих олиготрофных микроорганизмов с $g > 24$ ч. Они распределены от поверхности до 200 м глубины, где интенсивность света падает до 0,01%.

Ни у одного представителя филума *Cyanobacteria* 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).

Нитчатые формы цианобактерий способны расти в темноте, окисляя органические соединения. Цианобактерии обладают неполным ЦТК с или без глиоксилатного шунта. **Пентозофосфатный путь** является у них основным путем использования органики. В анаэробных условиях в темноте цианобактерии могут осуществлять гомо- и гетероферментативное молочнокислое брожение и ацетогенез. Возможность анаэробного дыхания у них не показана, однако, элементарная сера иногда используется как сток электронов.

Автотрофная ассимиляция CO_2 у цианобактерий происходит в **цикле Кальвина**. Отдельные представители способны ассимилировать на свету глюкозу или другие простые органические субстраты. Цианобактерии потребляют азот в аммонийной или нитратной форме, многие способны к фиксации молекулярного азота. Некоторые безгетероцистные цианобактерии осуществляют азотфиксацию в обычных клетках, но только в анаэробных условиях. У представителей рода *Gloeothese* азот фиксируют вегетативные клетки без ФС II. Большинство представителей способно к ассимиляционной сульфатредукции. Обычно цианобактериям для роста витамины не требуются.

Большинство цианобактерий является мезофилами (иногда термотолерантными), но есть психрофильные и психроактивные представители, живущие во льдах Арктики (например, *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 микроаэрофильные условия. Основная масса цианобактерий — алкалифилы (рН 8—9). В горячих источниках и болотах обитают ацидотолерантные (рН 4,5—5,0) штаммы родов *Fischerella* и *Synechococcus*. Солелюбивые формы, выдерживающие до 10—12% NaCl (например, *Spirulina subsalsa*), синтезируют **осмопротекторы**. При «распреснении» водоемов такие вещества выбрасываются из клетки и потребляются многочисленными микроорганизмами-спутниками.

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 клетки от переокисления.

Некоторые цианобактерии способны образовывать **нейротоксины** и **геосмин** (транс-1,10-диметил-транс-9-декалол), обуславливающий запах почвы. В период цианобактериального «цветения» воды ее земляной запах определяется этим соединением. Это сигнал опасности такой воды для животных и человека, так как при избыточном развитии цианобактерий повышается вероятность образования ими значительных количеств нейротоксинов.

Анализ последовательностей 16S рРНК хлоропластов и цианобактерий (в том числе, прохлорофит) показал, что они имеют одного общего предка. Поскольку фототрофы-эукариоты содержат Хл *b*, то в свете **теории симбиогенеза** симбионтом, превратившимся в хлоропласт, скорее всего, является древняя цианобактерия-прохлорофит, синтезирующая хлоропластный тип хлорофилла.

Цианобактерии распространены повсеместно. Водные цианобактерии могут активно плавать или парить в толще воды, а также формировать обрастания. Они могут быть как пресноводными, так и морскими, причем в морях представлено меньше видов. Цианобактерии являются структурообразующими элементами (**эдификаторами**) **циано-бактериальных матов** — сообществ цианобактерий и других микроорганизмов. В наземных условиях цианобактерии могут расти на поверхности коры деревьев, стен, асфальта, скал, в трещинах и внутренних полостях камней, а также в почве. Они играют большую роль в почвообразовании и обогащении почв азотом, за что и получили название «живых азотных удобрений». Высокая устойчивость цианобактерий к природным факторам позволяет им доминировать в экстремальных местообитаниях и первыми заселять пространство после различных катаклизмов. Так, после извержения вулкана цианобактерии первыми заселяют безжизненную лаву. Затем появляются водоросли и образуется плодородный слой, позволяющий развиваться травам. Привлеченные их семенами зерноядные птицы удобряют почву, что обеспечивает рост деревьев.

7.5.6. Эритробактерии

В конце 70-х гг. прошлого века у некоторых нефототрофных микроорганизмов были обнаружены пигменты фотосинтеза и реакции на свет. Данную сборную группу бактерий стали называть **аэробными аноксигенными бактериями**, или **эритробактериями** (табл. 7.11). Такие 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 и гетеротрофы, способные расти на сложных средах. Представители этой группы имеют различную морфологию клеток и разные особенности метаболизма. Большинство данных микроорганизмов — мезофилы и нейтрофилы. Среди них есть пресноводные и морские, галотолерантные и галофильные.

Краткая характеристика некоторых эритробактерий

Видовое или родовое название	Характеристика	Систематическое положение	Место обитания
<i>Methylobacterium</i>	Розовые метилотрофные бактерии, микроаэрофилы, синтезируют каротиноиды и небольшое количество Бхл <i>a</i>	Класс <i>Alphaproteobacteria</i>	Филлосфера растений и кишечник кольчатых червей
<i>Erythrobacter</i> и <i>Roseobacter</i>	Облигатные аэробы, имеющие фотосинтетические пигменты и обладающие реакциями на свет		Поверхность морских водорослей
<i>Photorhizobium</i>	Типичные азотфиксаторы, образующие клубеньки на стеблях и обладающие реакциями на свет		Стебли некоторых тропических высших растений
<i>Porphyrobacter</i> , <i>Erythromicrobium</i> , <i>Roseococcus</i> , <i>Sandaracinobacter</i> , <i>Rubrimonas</i>	Клетки разной морфологии, окраска — от оранжевой до пурпурной, аэробы, синтезируют компоненты фотосинтетического аппарата, в том числе Бхл <i>a</i>		Природные водоемы с разной температурой воды
<i>Acidiphillum rubrum</i>	Спутник тионовых бактерий, аэроб, способен синтезировать, кроме обычного Бхл, Zn^{2+} -содержащий Бхл, более устойчивый в кислой среде		Кислые водоемы
<i>Roseateles depolymerans</i>	Аэроб, синтезирует компоненты фотосинтетического аппарата, в том числе Бхл <i>a</i> , способен к разложению ксенобиотиков	Класс <i>Betaproteobacteria</i>	Одна из рек Индии

Фотосинтетический аппарат, в особенности Бхл *a*, синтезируется только в аэробных условиях, причем наличие света не обязательно, а сами микроорганизмы не могут расти при постоянном освещении. У эритробактерий представлено большое разнообразие каротиноидов, более 70% которых не участвуют в фотосинтезе и имеют защитную функцию, обнаружены также цитохромы и убихиноны. Установлено, что свет подавляет дыхание и «включает» фотосинтетические реакции. Так, у эритробактерий наблю-

дается светозависимое поглощение углекислоты, хотя цикл Кальвина не обнаружен. Однако при постоянном освещении происходят окисление цитохромов и фотовыцветание бактериохлорофиллов. Предполагают, что на свету хиноны легко «перевосстанавливаются», поэтому необходим сток электронов на дыхание (рис. 7.51).

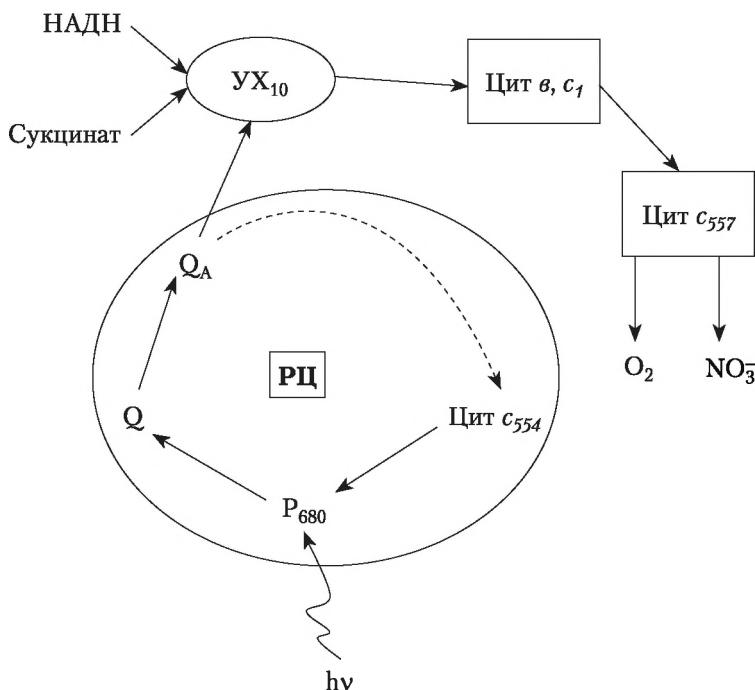


Рис. 7.51. Гипотетическая ЭТЦ эритробактерий:

РЦ — реакционный центр; УХ — убихинон

Эритробактерии — это облигатные гетеротрофы, растущие на сложных средах, которые имеют либо полный ЦТК, либо незамкнутый ЦТК с глиоксилатным шунтом. У некоторых из них обнаружен КДФГ-путь. Отдельные представители способны окислять восстановленные соединения серы для получения энергии (например, *Roseococcus thiosulfatophilus* является хемолитогетеротрофом). Представители группы *Photorhizobium* обычно образуют клубеньки ярко-зеленого цвета на стеблях тропических растений *Aeschynomene* и *Sesbania*, где происходит азотфиксация, а при росте на агаризованных средах формируют розовые колонии и обладают типичным дыхательным метаболизмом. Синтез пигментов происходит интенсивнее на более бедных субстратах, т.е. возможно, что фотосинтез помогает «добирать» энергию на обеспечение фиксации молекулярного азота.

В настоящее время метаболизм эритробактерий одни исследователи рассматривают как промежуточную (переходную) стадию между анаэробным фотосинтезом (фотолитоавтотрофией) и аэробной гетеротрофией (хемоорганогетеротрофией), а другие считают его результатом латерального переноса генов.

7.5.7. Бесхлорофильный фотосинтез галоархей

Уникальный бесхлорофильный тип фотосинтеза обнаружен у представителей домена *Archaea*, объединенных в класс *Halobacteria*. За этой группой сохранился старый термин «галобактерии», хотя с точки зрения систематики их правильнее было бы называть галоархеями:

Домен *Archaea*

Филум *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*

Галобактерии (галоархеи) — это одноклеточные микроорганизмы разной морфологии, часто плейоморфные, некоторые имеют газовые вакуоли. Клетки неподвижны или движутся с помощью лофотрихальных жгутиков. В качестве запасного вещества отмечено наличие поли- β -гидроксимасляной кислоты. Размножение происходит бинарным делением, отдельные представители могут образовывать «галоцисты». Пигментация галоархей часто бывает красно-желтой из-за большого количества каротиноидов, которые, возможно, используются микроорганизмами для защиты от излишней инсоляции. Основными каротиноидами у них являются бактериоруберин, ликопин, α - и β -каротины.

Галобактерии растут только в местообитаниях с высокой соленостью (соленые озера, соленые продукты). Характерной чертой этих микроорганизмов служит их абсолютная зависимость от высоких концентраций NaCl (до 20–30%). Галоархеи подразделяются на две группы:

- 1) нуждающиеся в высоких концентрациях соли и Mg^{2+} и растущие при $pH \approx 7,0$,
- 2) нуждающиеся в высоких концентрациях соли и OH^- и растущие при $pH \approx 8,0$.

Клетки синтезируют **осморегуляторы** — сахароспирты, гликозилглицериды, бетаины, глицерол, некоторые аминокислоты, а также активно выкачивают из клетки Na^+ , заменяя его на K^+ . Их белковые, полисахаридные

или сульфополисахаридные клеточные стенки стабилизируются ионами Na^+ . Гликопротеины, а также белки-ферменты галоархей содержат много «кислых» аминокислот.

Галобактерии — это аэробные хемотротрофы с дыхательным метаболизмом и сложными пищевыми потребностями (обычно для роста нужны белки и аминокислоты). Они образуют гидролитические ферменты, а сахара используют по КДФГ-пути. У отдельных представителей обнаружена азотфиксация. Ряд организмов способен к автотрофной ассимиляции углекислого газа через цикл Кальвина. Некоторые могут осуществлять анаэробное дыхание с нитратом, фумаратом и окисленными соединениями серы в качестве акцепторов электронов.

Способность к фотосинтезу реализуется у галобактерий в неблагоприятных условиях при недостатке кислорода. В концентрированных растворах соли кислород очень плохо растворим, что приводит к созданию почти анаэробных условий. В этом случае галоархеи на свету при низком содержании кислорода образуют модифицированные клеточные мембраны, содержащие несколько видов пигментов — бактериородопсин, галородопсин, слоуродопсин, фобородопсин и археродопсин. Бактериородопсин отвечает за транслокацию протонов, галородопсин закачивает K^+ в обмен на Na^+ , а слоу-, фобо- и археродопсины служат фоторецепторами на красный и синий свет, управляют активностью жгутиков для осуществления фототаксиса. **Бактериородопсин** (или ретиналь) синтезируется в присутствии небольшого количества O_2 из C_{40} -каротиноидов. Окисленный C_{20} -фрагмент присоединяется через лизин к белковой молекуле и мигрирует в ЦПМ, образуя агрегаты. Это соединение имеет темно-пурпурный цвет, поэтому агрегаты получили название «**пурпурных мембран**». При поглощении света бактериородопсин изменяет конформацию, что сопровождается выбросом протонов из клетки и наведением трансмембранного потенциала. Энергия $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ с помощью фермента АТФазы преобразуется в макроэргические связи. Таким образом, галобактерии используют световую энергию, чтобы синтезировать достаточное количество АТФ и пережить неблагоприятные условия. Клетки не могут постоянно расти в анаэробных условиях, поскольку кислород необходим им для синтеза бактериородопсина, но с помощью фотосинтеза галоархеи могут пережидать стресс, вызванный недостатком кислорода.

Интересной особенностью галоархей является высокая степень изменчивости (частота мутаций у них в 1000 раз больше обычной). У галоархей ДНК делится на основную и минорную, которая может составлять до одной трети от общего количества и отличаться по содержанию Г+Ц. Клетки содержат крупные плазмиды с высокоповторяющимися последовательностями.

Галоархеи обитают в засоленных и содовых водах и почвах, в солеварах, на соленых продуктах, являясь основными агентами их порчи. Они участвуют в пищевых цепях как деструкторы-гидролитики. Рядом с ними часто растут представители родов *Dunaliella* и *Ectothiorhodospira*.

7.5.8. Сравнительная характеристика групп фототрофных микроорганизмов

Наличие пигментов и способ их упаковки являются дифференцирующими признаками для фототрофных микроорганизмов (табл. 7.12). Эти структуры усложняются в ряду: гелиобактерии (ЦПМ) → пурпурные бактерии (внутриклеточные выросты ЦПМ различной формы) → зеленые бактерии (хлоросомы и ЦПМ) → цианобактерии (фикобилисомы и тилакоиды).

Таблица 7.12

Организация фотосинтетического аппарата у разных групп фототрофных прокариот

Группа	Основные фотосинтетические пигменты и их максимумы поглощения, нм	Организация фотосинтетического аппарата
Пурпурные бактерии	Бхл <i>a</i> – 800–810, 830–890 Бхл <i>b</i> – 835–850, 1020–1040	Ламеллы, трубочки или везикулы, связанные с ЦПМ
Зеленые бактерии	Бхл <i>c</i> – 745–755 Бхл <i>d</i> – 705–740 Бхл <i>e</i> – 719–726 Бхл <i>a</i> (минорный) – 807, 830–890	Хлоросомы и ЦПМ
Гелиобактерии	Бхл <i>g</i> – 670 и 788	ЦПМ
Цианобактерии	Хл <i>a</i> – 665 Хл <i>b</i> – 645 и 430	Тилакоиды с фикобилисомами или без них
Галоархеи	Бактериородопсин	Пурпурные мембраны в ЦПМ

Некоторые основополагающие свойства фототрофов приведены в табл. 7.13.

Таблица 7.13

Сравнительная характеристика групп фототрофных микроорганизмов и хлоропластов

Группа	Свойство				
	ФС I	ФС II	Доноры электронов	Источник углерода	Способ питания
Пурпурные бактерии	+	–	H ₂ S, H ₂ , органика	CO ₂ , органика	Авто- и гетеротрофия
Зеленые бактерии	+	–	H ₂ S, H ₂	CO ₂ , органика	Авто- и гетеротрофия
Цианобактерии	+	+	H ₂ O	CO ₂	Автотрофия
Гелиобактерии	+	–	H ₂ S, H ₂	CO ₂ , органика	Гетеро- и автотрофия
Галоархеи	–	–	Органика	Органика	Гетеротрофия
Хлоропласты	+	+	H ₂ O	CO ₂	Автотрофия

Окисление серных соединений у фототрофов может происходить согласно рис. 7.52 и следующей суммарной реакции фотосинтеза:

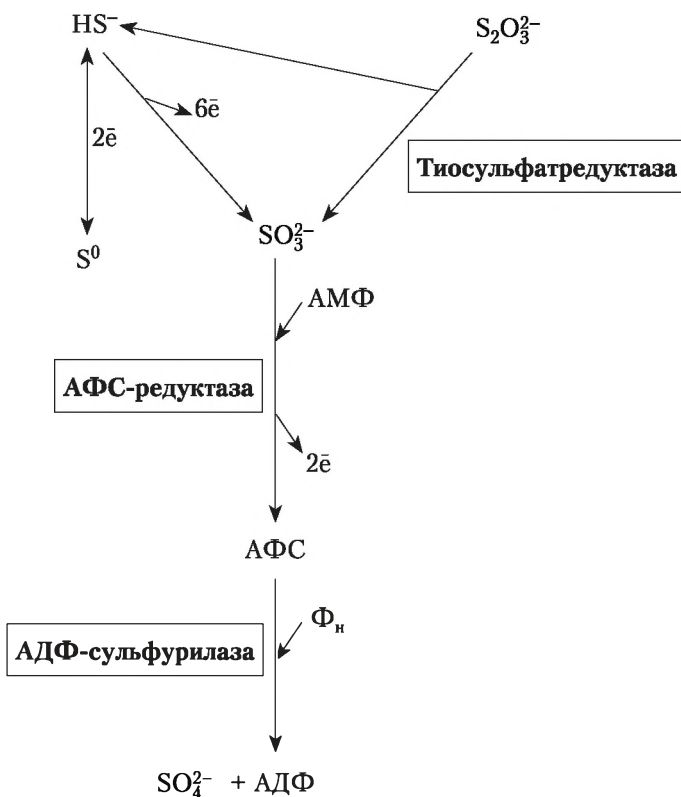
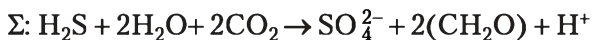
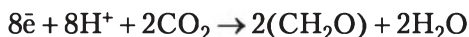


Рис. 7.52. Пути окисления соединений серы у фототрофных прокариот:

АФС — аденозинфосфосульфат

7.5.9. Симбиозы с участием фототрофных микроорганизмов

Фототрофные микроорганизмы часто образуют настолько устойчивые **симбиозы**, что их по-латыни называют как индивидуальный организм. Например, *Chlorochromatium aggregatum* состоит из одной большой клетки нефототрофной бактерии и 12–20 мелких палочек зеленых серных бактерий *Chlorobium limicola*. Симбионты в таких ассоциациях синхронно делятся и зачастую с трудом выделяются в чистую культуру. Некоторые устойчивые симбиозы с участием фототрофов представлены на рис. 7.53.

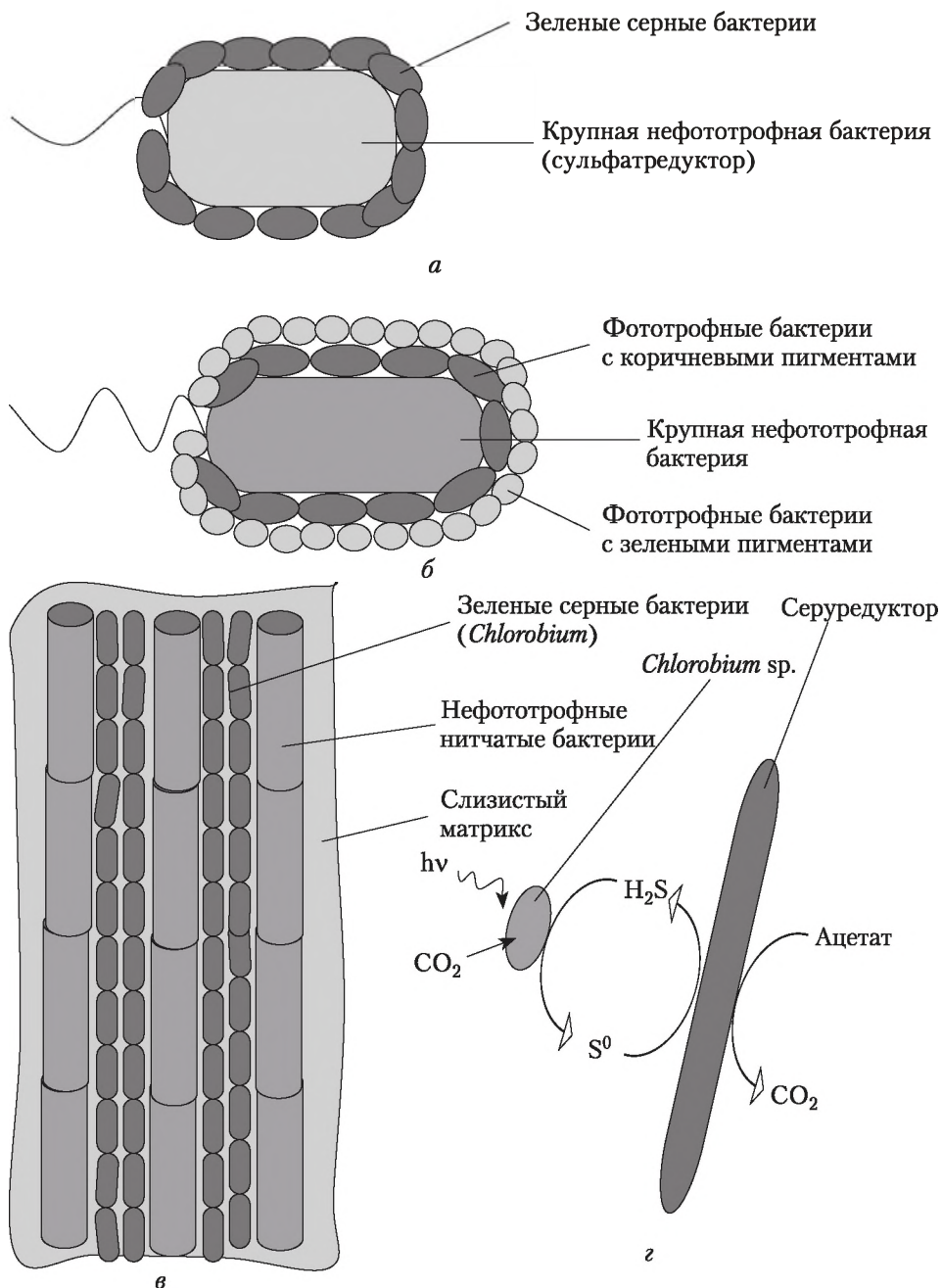


Рис. 7.53. Устойчивые симбиозы с участием фототрофных микроорганизмов:

a — *Chlorochromatium*; *б* — *Pelochromatium*; *в* — *Chloroplana*; *г* — синтрофная по H_2S ассоциация с серуредуктором

Цианобактерии рода *Anabaena* часто существуют в симбиозах с растениями (растут в пазухах листьев водного папоротника *Azolla*) и грибами

(являются фототрофным компонентом лишайников), а представители рода *Prochloron* являются симбионтами асцидий.

Несколько разных групп фототрофов входят в сложный симбиоз **циано-бактериального мата**. Это сообщество цианобактерий и других микроорганизмов, в том числе эукариотических. Маты, в составе которых не обнаружены эукариоты, считаются реликтовыми. Такие ассоциации обычно развиваются в горячих кислых источниках, гиперсоленых и содовых озерах и достигают толщины 4—5 см. Типичный циано-бактериальный мат состоит из нескольких слоев. Первый, верхний, обычно ярко-зеленый слой представлен цианобактериями, второй составляют пурпурные, а третий — зеленые бактерии. Между этими слоями могут находиться бесцветные слои из клеток родов *Beggiatoa* и *Flexibacter* с отложениями элементарной серы. Четвертый слой представлен сульфатредукторами, а ниже могут обитать метаногены. В качестве спутников всех групп микроорганизмов могут присутствовать тионовые бактерии и метилотрофы. Нижележащие слои, как правило, мертвые, литифицированные. Предполагают, что такие древние сообщества участвовали в формировании современной земной атмосферы, поскольку образованные на дне газы, поднимаясь к поверхности и проходя через мат, существенно меняли свой состав. В гиперсоленых сообществах циано-бактериальные маты образовывали слоистые осадочные породы (**строматолиты**), дошедшие до наших дней в виде окаменелостей. Их формирование происходило путем отложения нерастворимых веществ между слоями клеток.

Резюме

Микроорганизмы обладают существенно более широкими возможностями катаболизма по сравнению с высшими организмами, которые используют преимущественно аэробное дыхание. Глюкоза является центральным амфиболитом, так как первой из органических веществ образуется при автотрофной ассимиляции CO_2 и способна вступать в катаболизм для получения энергии. У микроорганизмов есть три пути окисления глюкозы (гликолиз, пентозофосфатный и КДФГ-путь). В мире микробов обнаружены все известные реакции преобразования пирувата в ацетил-КоА (с помощью пируватдегидрогеназного комплекса, пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы или пируват: формиат-лиазы). Дрожжи преобразуют пируват в ацетальдегид и CO_2 с помощью пируватдекарбоксилазы. «Активированная уксусная кислота» поступает в окислительные циклы или участвует в процессах брожений.

У аэробно и анаэробно дышащих микроорганизмов основным окислительным циклом является цикл трикарбоновых кислот. Для восполнения отведенных в биосинтетические реакции промежуточных продуктов служат короткие обходные пути (глиоксилатный шунт).

Большинство микроорганизмов, живущих без кислорода, получает энергию путем субстратного фосфорилирования при брожении. В брожении часть органического вещества окисляется, а часть — восстанавливается. Существует несколько видов брожений, характерных для тех или иных

групп микроорганизмов и приводящих к образованию различных конечных продуктов. В отсутствии кислорода дрожжи осуществляют спиртовое брожение, а в его присутствии переключаются на аэробное дыхание. Молочно-кислое брожение проводят грамположительные микроорганизмы нескольких групп, объединяемые по признаку образования молочной кислоты. Они являются обычными обитателями желудочно-кишечного тракта высших животных и человека. Их продукты подавляют развитие гнилостных микроорганизмов. Пропионовокислое брожение, включающее стадию гетеротрофной фиксации CO_2 , осуществляют пропионибактерии, обитающие в рубце и кишечнике жвачных животных. Смешанное (муравьинокислое) брожение с образованием характерного продукта (формиата) свойственно бактериям кишечной группы. Сложное двухстадийное маслянокислое и ацетонобутиловое брожение проводят образующие эндоспоры клостридии. Биологический смысл двухфазности заключается в более полном использовании питательных веществ за счет сброса избыточных восстановительных эквивалентов на образовавшиеся кислые продукты. Это приводит к «исправлению» pH и сохранению окислительно-восстановительного равновесия. При гомоацетатном брожении часть реакций происходит за счет анаэробного дыхания. Единственным продуктом гомоацетогенов является уксусная кислота. В гетеротрофных условиях благодаря двум молекулам ацетата происходит типичное брожение, а третья образуется за счет анаэробного дыхания с CO_2 в качестве конечного акцептора. При автотрофном росте органическое вещество синтезируется по ацетил-КоА-пути.

Энергодающий процесс на мембранах, в котором конечным акцептором электронов служит окисленное органическое или неорганическое вещество, отличное от кислорода, называют анаэробным дыханием. Его виды подразделяются по используемому конечному акцептору электронов. При нитратном дыхании восстановление нитрата может идти до уровня нитрита или газообразного азота. Донором электронов обычно служит органическое вещество. Нитратредукторы являются факультативными анаэробами. Донорами электронов при сульфатном дыхании могут служить молекулярный водород и различные органические соединения. Сульфатредукторы являются облигатными анаэробами, они способны расти гетеротрофно или осуществлять автотрофную ассимиляцию CO_2 по ацетил-КоА-пути. Серное дыхание распространено в местообитаниях, связанных с вулканической деятельностью, и осуществляется, в основном, археями-экстремофилами. Синтез АТФ, связанный с восстановлением Fe^{3+} , осуществляют геобактерии. К фумаратному дыханию способны практически все микроорганизмы, имеющие короткую ЭТЦ с сукцинатдегидрогеназой. Карбонатное дыхание осуществляют строго анаэробные гомоацетогены и метаногены. В автотрофных условиях органическое вещество у них синтезируется по ацетил-КоА-пути. В гетеротрофных условиях метаногены способны использовать только уксусную кислоту, осуществляя ацетокластический метаногенез. Метаногенам также свойственна метилотрофия, при которой потребляются одноуглеродные соединения.

Аэробное дыхание большинства микроорганизмов в принципе не отличается от митохондриального процесса. В большинстве случаев питатель-

ные субстраты окисляются при участии НАД⁺-зависимых дегидрогеназ. Микроорганизмы обладают более широкими возможностями в использовании различных доноров электронов, чем высшие организмы. Многоуглеродные питательные вещества могут при дыхании подвергаться полному или неполному окислению. При использовании биополимеров подготовительными реакциями будут реакции гидролиза с помощью выделяемых в среду ферментов. Особенностью факультативно анаэробных фотобактерий является способность к биолюминесценции в присутствии кислорода. Использование одноуглеродных соединений свойственно метилотрофным микроорганизмам. Формальдегид является у них центральным амфиболитом, используемым как в энергетическом, так и в пластическом обмене. Ассимиляция углерода у метилотрофов происходит путем фиксации формальдегида в особых циклах. Метилотрофные дрожжи формируют пероксисомы и существуют за счет метанола, образующегося при гидролизе пектина. К такому типу питания как хемолитоавтотрофия способны только прокариотические микроорганизмы. Хемолитоавтотрофы делятся на несколько групп. Преимущественно аэробные тионовые микроорганизмы окисляют восстановленные неорганические соединения серы. Металлоокисляющие микроорганизмы используют железо и другие металлы с переменной валентностью в качестве доноров электронов. Нитрифицирующие бактерии осуществляют двухстадийный процесс окисления аммиака в нитрит и затем в нитрат. Эти группы ассимилируют углекислоту в цикле Кальвина. У разных групп водородных микроорганизмов, окисляющих H₂, имеются различные пути автотрофной ассимиляции углекислого газа. Карбоксидобактерии, использующие СО как донор электронов, похожи по метаболизму на водородных.

Использование энергии света у микроорганизмов происходит многообразней, чем у высших растений. При фотосинтезе световая энергия поглощается и преобразовывается в химическую энергию АТФ и восстановительных эквивалентов. Фотосинтезирующие микроорганизмы-прокариоты относятся к цианобактериям, зеленым и пурпурным бактериям, гелиобактериям и галоархеям. Использование воды в качестве донора электронов предполагает ее окисление до молекулярного кислорода и требует участия дополнительной фотосистемы. Фотосинтез с выделением кислорода при участии ФС II называют оксигенным. Функционирование только ФС I и использование отличных от воды доноров электронов носит название аноксигенного фотосинтеза, так как в этом случае кислород не образуется. Иногда под фотосинтезом в широком смысле понимают не только образование АТФ и восстановителей под действием света (световую стадию), но и их дальнейшее использование для автотрофной ассимиляции СО₂ и синтеза клеточных компонентов (темновая стадия). Пурпурные бактерии осуществляют аноксигенный фотосинтез и автотрофно ассимилируют углекислый газ в цикле Кальвина. Они не образуют НАДН непосредственно в световых реакциях фотосинтеза. Фотосинтетический аппарат аноксигенных зеленых бактерий расположен в хлоросомах и ЦПМ. Восстановительные эквиваленты у них могут синтезироваться путем простого нециклического переноса от ферредоксина во время световой стадии. У зеленых серных бактерий автотрофная ассимиляция СО₂ происходит через цикл

Арнона, у зеленых нитчатых — через глиоксилатный цикл в двух модификациях (гидроксипропионатный путь или восстановительный цикл дикарбоновых кислот), а у штаммов рода *Oscillochloris* — через цикл Кальвина. Грамположительные гелиобактерии на свету растут только в анаэробных условиях, осуществляя аноксигенный фотосинтез, схожий с процессом у зеленых серных бактерий. Процесс оксигенного фотосинтеза у цианобактерий принципиально не отличается от фотосинтеза высших растений. Фотосинтетический аппарат представлен тилакоидами и фикобилисомами. Цианобактерии способны проводить и аноксигенный фотосинтез с сероводородом в качестве донора электронов. Автотрофная ассимиляция CO_2 у цианобактерий протекает в цикле Кальвина. Цианобактерии отличаются разнообразной и часто сложной морфологией. Галоархеи обладают уникальным типом фотосинтеза, не связанным с хлорофиллами или бактериохлорофиллами. Они растут только в местообитаниях с высокой соленостью и являются аэробными хемогетеротрофами с дыхательным метаболизмом и сложными пищевыми потребностями. В неблагоприятных условиях при недостатке кислорода галобактерии образуют модифицированные клеточные мембраны, содержащие пигмент бактериородопсин, и осуществляют особый, бесхлорофилльный тип фотосинтеза. При поглощении света бактериородопсин изменяет свою конформацию, что сопровождается наведением трансмембранного потенциала и синтезом АТФ.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Назовите основные функции ЦТК у микроорганизмов.
2. Перечислите основные стадии катаболизма прокариот.
3. Сравните по эффективности использования субстрата процессы брожения, анаэробного и аэробного дыхания.
4. Почему пекарские дрожжи не могут постоянно жить в анаэробных условиях?
5. В чем заключаются полезные свойства «живых» молочнокислых продуктов?
6. Почему некоторые представители энтеробактерий выбраны санитарно-показательными микроорганизмами?
7. Предложите способы управления двухстадийным брожением клостридий.
8. В чем особенность гомоацетатного брожения?
9. Перечислите группы микроорганизмов, осуществляющих разные виды анаэробного дыхания.
10. Проанализируйте экологическую роль метаногенов.
11. Сравните процессы аэробного дыхания у эукариот и прокариот. В чем сходство и различие?
12. В чем причина неполного окисления органического субстрата микроорганизмами?
13. Укажите особенности метаболизма фотобактерий и метилотрофов.
14. Сравните образ жизни микробов — представителей разных хемолитоавтотрофных групп.
15. Сравните процессы анаэробного окисления метана и аммиака. Какие микроорганизмы в них участвуют?
16. Сравните возможности разных фототрофных групп микроорганизмов в плане получения энергии и восстановленных пиридиннуклеотидов, использования доноров электронов, автотрофной ассимиляции углерода.

17. Опишите экологическую роль разных групп фототрофных микроорганизмов.
18. Почему фототрофы часто являются компонентами симбиозов?
19. Почему фотосинтез галобактерий можно рассматривать как SOS-реакцию?

Семинар 1

Типы питания микроорганизмов. Общая схема обмена веществ у микроорганизмов. Особенности метаболизма аэробов и анаэробов

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, дополненным конкретными примерами из монографий и оригинальных статей в научных микробиологических журналах, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Сидерофоры и бактериальная флуоресценция

Цель работы: освоить технику опытов, изучающих обмен веществ микроорганизмов, узнать, как наличие железа влияет на бактериальную флуоресценцию, проанализировать отличия разных видов псевдомонад в способности синтезировать сидерофоры.

Железо играет значительную роль в клеточном дыхании, синтезе ДНК и хлорофилла, а также во многих других жизненно важных функциях организмов. Многие микроорганизмы имеют сидерофоры для обеспечения железом. Сидерофоры связывают его в окружающей среде и переносят внутрь микробной клетки. Некоторые сидерофоры (и особенно пиовердин, образуемый некоторыми видами псевдомонад), флуоресцируют при облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм. Энергия УФ-лучей поглощается пиовердином и испускается в виде зелено-желтого света. Флуоресценция пропадает, если убрать источник УФ-света.

Если бактерии растут на среде, где железа недостаточно, то они выделяют большое количество пиовердина для того, чтобы связать и доставить железо в клетку. Напротив, если бактерии растут на среде, богатой железом, то им нет необходимости секретировать сидерофоры, и клетки не флуоресцируют. Избыток железа в среде также подавляет синтез специфического рецептора на поверхности мембраны.

Необходимые материалы (на 1 студента): 2 пробирки с 15 мл стерильного МПА в каждой, 2 пробирки с 15 мл стерильного МПА с добавлением железа (МПА + Fe) в каждой (выдаются лаборантом), штатив для пробирок, 4 стерильные чашки Петри, по одной пробирке с культурами *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas fragi* на скошенном агаре, микробиологическая петля, горелка, защитные очки для работы у УФ-лампы, маркер, раствор дезинфектанта, УФ-лампа (360–400 нм). Лаборант заранее готовит пробирки с МПА и МПА + Fe. Для приготовления второй среды в расплавленный МПА вносят 12 мл/л раствора железо-аммонийного цитрата (1 г вещества на 167 мл дистиллированной воды при интенсивном перемешивании). Раствор железо-аммонийного цитрата можно хранить в холодильнике в течение месяца. Расплавленные МПА и МПА + Fe раз-

ливают по 15 мл в широкие пробирки, закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при 1 ати.

Занятие 1

Студенты подписывают стерильные чашки Петри, не открывая их, следующим образом: 1) МПА / *P. fluorescens*, дата; 2) МПА / *P. fragi*, дата; 3) МПА+Fe / *P. fluorescens*, дата; 4) МПА+Fe / *P. fragi*, дата. Полученные у лаборанта две пробирки с МПА и две пробирки с МПА с железом помещают на кипящую водяную баню до расплавления агара. Около пламени горелки расплавленные среды разливают по соответствующим стерильным чашкам Петри. Оставляют закрытые чашки на горизонтальной поверхности до застывания агара. Засевают у пламени горелки полученные у преподавателя культуры *P. fluorescens* и *P. fragi* на соответствующие чашки петлей зигзагообразным штрихом. Перед каждым посевом петлю прожигают в пламени горелки и охлаждают о внутреннюю поверхность пробирки с культурами. Закрытые чашки ставят на инкубацию крышками вниз при 20—25°С на 24—48 ч.

Занятие 2

Через 24—48 ч просматривают чашки под УФ-светом. Не следует смотреть прямо на УФ-лампу. Перед подходом к источнику УФ-света необходимо надеть защитные очки. Свет должен быть направлен вниз от глаз на чашку Петри. Студентам необходимо отметить наличие или отсутствие мерцающего желто-зеленого ореола вокруг колоний или штрихов на чашках и занести данные в табл. 7.14 («+» — флуоресценция есть, «-» — флуоресценции нет).

Таблица 7.14

Флуоресценция псевдомонад в зависимости от присутствия железа в среде

Среда	Культура псевдомонад	
	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. fragi</i>
МПА		
МПА + Fe		

Если все сделано правильно, то флуоресценцию можно наблюдать на чашке с *P. fluorescens*, растущим на МПА без железа, поскольку эта культура способна образовывать пиовердин при нехватке железа в среде. *P. fragi* пиовердин не синтезирует, поэтому флуоресценции на обеих средах не наблюдается.

Семинар 2

Физиологические группы микроорганизмов. Виды брожений, анаэробного и аэробного дыханий

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, дополненным конкретными примерами из монографий и оригинальных статей в научных микробиологических журналах, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 2

Выделение накопительных культур микроорганизмов, получающих энергию различными способами

Цель работы: после выполнения работы студенты должны уметь поставить накопительную культуру требуемой группы микроорганизмов, знать элективные условия для микроорганизмов, получающих энергию различными способами, и проанализировать причины накопления клеток требуемой группы.

2.1. Получение накопительной культуры денитрифицирующих бактерий.

Готовят среду следующего состава (г/л): лимоннокислый калий или натрий (трехзамещенный) — 5,0; KNO_3 — 2,0; KH_2PO_4 — 2,0; MgSO_4 — 2,0; CaCO_3 — 0,2; аспарагин — 1,0; FeCl_3 — следы, вода водопроводная. Исходное значение pH среды: 6,8–7,2. Среду разливают в высокие пробирки, оставляя воздушное пространство в 1 см между пробкой и средой. В каждую пробирку помещают маленькую газособирающую пробирку («поплавок») открытым концом вниз (вверх дном) — в нее будет впоследствии собираться образующийся при анаэробном нитратном дыхании молекулярный азот. Поплавок осторожно заполняют той же средой доверху и, быстро перевернув его вверх дном, вталкивают в высокую пробирку. При этом в поплавке не должно оказаться газовых пузырей. Если воздух все-таки попал, то нужно заткнуть горлышко высокой пробирки резиновой пробкой, перевернуть ее и постучать по ней, чтобы воздух из маленькой пробирки вышел полностью. Затем осторожным движением перевернуть высокую пробирку обратно. В качестве посевного материала используют почву, помещая ее на дно высокой пробирки слоем в 0,5–1,0 см. Одну из высоких пробирок оставляют незасеянной для контроля. Пробирки помещают в термостат (30°C) на 1–2 недели. По окончании инкубации отмечают газовыделение по пузырьку газа в поплавке и подщелачивание среды (контролем служит незасеянная стерильная среда). Изменение pH среды определяют с помощью индикатора бромтимолблау, меняющего свой цвет с зеленого на синий при увеличении значения pH от нейтрального в щелочную область. О наличии или отсутствии нитратов судят по качественной реакции с дифениламином. На белой керамической пластинке несколько кристаллов дифениламина растворяют в капле концентрированной серной кислоты и к смеси добавляют каплю исследуемой жидкой культуры.

При наличии нитратов возникает синее окрашивание. Контролем служит исходная стерильная среда. Следует иметь в виду, что пробу на нитраты можно проводить только в отсутствие нитритов, так как последние тоже дают синее окрашивание с дифениламином. Для микроскопии готовят препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный фуксином препарат, просматривая которые, отмечают наличие подвижности и морфологические особенности выросших микроорганизмов.

2.2. Получение накопительной культуры сульфатредуцирующих бактерий.

Готовят среду следующего состава (г/л): K_2HPO_4 — 0,5; NH_4Cl — 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 7,0 или Na_2SO_4 — 4,5; CaCl_2 — 0,06; лактат натрия — 6,0; лимоннокислый натрий (трехзамещенный) — 0,3; NaCl — 5,0. Для удаления из среды растворенного кислорода колбу со средой кипятят в водяной бане в течение 5 мин, а затем осторожно охлаждают водой. После этого в среду вносят остальные компоненты в следующем порядке (мл/л): 0,1% раствор FeSO_4 в 1% HCl — 10,0; дрожжевой экстракт — 10,0; раствор микроэлементов (по Пфеннигу) — 1,0. Доводят значение pH до 7,0–7,5 с помощью 5% растворов NaHCO_3 и HCl и добавляют $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (5%-й раствор в 1%-м растворе NaHCO_3) по каплям до образования сероватого оттенка в среде. После этого в среду немедленно вносят посевной материал (почву), разливают доверху в пробирки и закрывают их резиновыми пробками. Пробирки помещают в термостат (30°C) на 7 сут. Через 7 сут. отмечают выделение сероводорода, который, связываясь с присутствующим в среде железом, вызывает почернение среды (контролем служит незасеянная стерильная среда). Морфологические особенности выросших бактерий, наличие спор и подвижность анализируют, просматривая приготовленные препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный фуксином препарат (можно выполнить дифференциальную окраску эндоспор).

2.3. Выделение накопительной культуры гомоацетогенных бактерий.

Для получения накопительных культур гомоацетогенов следует использовать минеральные среды с витаминами и микроэлементами на карбонатном буфере. Для выделения ряда культур необходимо добавлять дрожжевой экстракт. Поскольку в окислении H_2 и формиата гомоацетогены конкурируют с метаногенами и сульфатредукторами, то нужно создать условия, «отсекающие» обе эти группы. Гомоацетогены получают преимущества перед метаногенами в слабокислых условиях (pH $\approx$ 6,1) и при пониженных температурах (< 20°C). Для подавления метаногенеза добавляют соответствующие ингибиторы (бромэтансульфоновую кислоту, БЭСК). В средах для гомоацетогенов не используют сульфаты, чтобы не давать преимуществ для развития сульфатредукторов. Поскольку гомоацетогены могут потреблять широкий спектр органических субстратов, то в качестве селективного фактора можно применять их способность к деметилированию метоксилированных ароматических соединений. При этом следует учитывать, что использование таких субстратов может потребовать длительного периода адаптации. Источником биологического материала может служить образец любого анаэробного донного осадка или рубцо-

вой жидкости, отобранный без нарушения анаэробных условий. Для преимущественного развития гомоацетогенов используют среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 0,2; NH_4Cl — 0,5; NaCl — 1,0 (до 20,0 для образцов из соленых местообитаний); CaCl_2 — 0,15; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,4 (до 3,0 для образцов из минерализованных вод); KCl — 0,5; резазурин — 0,001 (индикатор восстановительных условий); раствор микроэлементов — 1,0 мл/л; раствор витаминов — 0,5 мл/л. Конечная концентрация микроэлементов в среде должна составить (мг/л): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,944; H_3BO_3 — 0,062; ZnCl_2 — 0,068; CuCl_2 — 0,013; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,061; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,066; NiCl_2 — 0,013; HCl — 0,002; NaOH — 0,400; Na_2SeO_3 — 0,017; Na_2WO_4 — 0,029; Na_2MoO_4 — 0,021. Конечная концентрация витаминов в среде составляет (мг/л): биотин — 0,01; фолиевая кислота — 0,01; никотинамид — 0,10; *p*-аминобензойная кислота — 0,05; тиамин (B_1) — 0,10; пантотеновая кислота — 0,05; пиридоксамин — 0,25; цианкобаламин (B_{12}) — 0,05; рибофлавин (B_2) — 0,05. Метоксилированные ароматические субстраты (ванилат, ферулат, сириглат и др.) вносят в концентрациях 5–10 мМ. В случае использования в качестве субстратов спиртов и органических кислот (метанола, этанола, *n*-бутанола, *n*-пропанола, метоксиэтанола, малата и т.д.) их добавляют в количестве 10–20 мМ. Минеральную среду кипятят для избавления от кислорода, затем охлаждают до комнатной температуры и разливают под током азота (свободного от кислорода) для предотвращения диффузии кислорода в среду. Среды разливают во флаконы, закрывают резиновыми пробками и зажимают алюминиевыми колпачками. Затем газовую фазу во флаконах дополнительно заменяют на требуемую — Ar , N_2 , H_2 , N_2/CO_2 (90/10) или H_2/CO_2 (80/20). Конечное давление во флаконах составляет $\approx 1,6$ ат. Среды стерилизуют автоклавированием (1 ат), а раствор витаминов — фильтрованием (бактериальный фильтр $d = 0,2$ мкм). После стерилизации в среды вносят витамины, 30 мл/л 1 М NaHCO_3 и добавляют раствор $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ до конечной концентрации 278 мг/л. В качестве ингибиторов метаногенеза вносят в среду 2 мМ БЭСК или 0,5% ацетилена в газовую фазу. Для образцов из желудочно-кишечного тракта в среду добавляют 1% рубцовой жидкости. После стерилизации pH среды устанавливают 7,1–7,3. Для получения накопительных культур в анаэробную стерильную среду вносят до 20% (об/об.) гомогенизированной пробы анаэробного осадка, используя стерильные шприцы и не нарушая условий анаэробноза. Культивирование проводят при 20–30°C. Инкубировать накопительные культуры рекомендуется в полузаполненных сывороточных бутылках, в горизонтальном положении. Для накопления гомоацетогенов, использующих водород, культивирование проводят на орбитальной качалке или шейкере для лучшего газообмена.

Развитие накопительной культуры контролируют после 1–2 пассажей путем микроскопирования и наиболее часто отмечают наличие палочковидных нефлуоресцирующих клеток, обладающих активной подвижностью. С помощью газожидкостной хроматографии определяют убыль молекулярного водорода и спиртов без существенного образования метана, а также накопление ацетата. Трансформацию метоксилированного ароматического субстрата регистрируют с помощью ВЭЖХ.

2.4. Выделение накопительной культуры метаногенных архей.

Для получения накопительных культур метаногенов следует использовать минеральные среды, содержащие азот в форме NH_4^+ и серу в форме S^{2-} . Необходимые микроэлементы добавляют в виде стерильного концентрированного раствора, а потребность в факторах роста удовлетворяется добавлением дрожжевого экстракта. При приготовлении сред и растворов добиваются условий строгого анаэробноза путем кипячения среды, замены газовой фазы на азот или аргон, добавления редуцирующих агентов и герметизации сосудов для культивирования. Поддержанию низкого окислительно-восстановительного потенциала способствуют дрожжевой экстракт, добавляемый в среду в качестве источника витаминов и других факторов роста, а также сульфид натрия и цистеин, являющиеся источниками серы.

В концентрациях до 100 мг S^{2-} /л сульфид не оказывает отрицательного влияния на рост метаногенных архей. Для избавления от бактерий в среду добавляют антибиотики широкого спектра действия (цикloserин, пенициллин, эритромицин, стрептомицин и др.) в количестве $\approx 0,2$ мг/мл. В качестве субстрата в зависимости от потребностей выделяемой группы метаногенных архей вносят ацетат, формиат, метанол и метиламин в концентрации ≈ 10 мМ. Для накопления и выделения метаногенов, использующих водород, газовую фазу в сосудах для культивирования заменяют на смесь $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80% + 20%).

Источником биологического материала может служить образец любого анаэробного донного осадка или рубцовой жидкости, отобранный без нарушения анаэробных условий, но предпочтительнее использовать анаэробные осадки, активно образующие биогаз (например, из метантенков). Для преимущественного развития метаногенов используют среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 0,38; Na_2HPO_4 — 0,53; NH_4Cl — 0,30; NaCl — 0,30; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,11; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,10; резазурин — 0,001 (индикатор восстановительных условий); раствор микроэлементов — 1,0 мл/л; раствор витаминов — 0,5 мл/л. Конечная концентрация микроэлементов в среде должна составить (мг/л): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,944; H_3BO_3 — 0,062; ZnCl_2 — 0,068; CuCl_2 — 0,013; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 0,061; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,066; NiCl_2 — 0,013; HCl — 0,002; NaOH — 0,400; Na_2SeO_3 — 0,017; Na_2WO_4 — 0,029; Na_2MoO_4 — 0,021. Конечная концентрация витаминов в среде составляет (мг/л): биотин — 0,01; фолиевая кислота — 0,01; никотинамид — 0,10; *p*-аминобензойная кислота — 0,05; тиамин (B_1) — 0,10; пантотеновая кислота — 0,05; пиридоксамин — 0,25; цианкобаламин (B_{12}) — 0,05; рибофлавин (B_2) — 0,05. Минеральную среду кипятят для избавления от кислорода, затем охлаждают до комнатной температуры и разливают под током азота (свободного от кислорода) для предотвращения диффузии кислорода в среду. Среды разливают во флаконы, закрывают резиновыми пробками и зажимают алюминиевыми колпачками. Затем газовую фазу во флаконах дополнительно заменяют на требуемую — Ar , N_2 , H_2 , N_2/CO_2 (80/20) или H_2/CO_2 (80/20). Конечное давление во флаконах составляет $\approx 1,6$ ат. Среды стерилизуют автоклавированием (1 ат), а раствор витаминов — фильтрованием (бактериальный фильтр $d = 0,2$ мкм). После стерилизации pH среды устанавливают 6,8–7,0. В среды добавляют стерильные растворы $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ до конечной концентрации

278 мг/л, витаминов, а также требуемое количество стерильного субстрата. Для получения накопительных культур в анаэробную стерильную среду вносят до 20% (об/об.) гомогенизированной пробы анаэробного осадка, используя стерильные шприцы и не нарушая условий анаэробноз.

Культивирование накопительных культур проводят при 30 или 37°C. Для накопления метаногенов всех групп, кроме *Methanosaeta*-подобных архей, в среду вносят 0,04% дрожжевого экстракта. Культивирование накопительных культур водородиспользующих метаногенов проводят на орбитальной качалке или шейкере для лучшего газообмена.

Развитие накопительной культуры контролируют путем микроскопирования в люминесцентном (отмечают флуоресценцию при 420 нм) и световом микроскопе (отмечают наличие клеток разной морфологии, преимущественно метаноккокков, обладающих наиболее быстрым ростом). С помощью газожидкостной хроматографии определяют убыль субстрата и появление метана. Описывают изменения культуральных признаков («вспухание» анаэробного осадка, появление пузырьков газа и др.).

2.5. Получение накопительной культуры аммонифицирующих бактерий.

Готовят МПБ и 30 мл среды наливают в колбу емкостью 100 мл, добавляют 0,3 г почвы и закрывают ватной пробкой. Для обнаружения аммиака между горлышком колбы и пробкой закрепляют длинную полоску красной лакмусовой бумаги (или полоску индикаторной бумаги на всю шкалу pH), смоченную дистиллированной водой (полоска не должна касаться среды). Сверху ватную пробку закрывают пергаментной бумагой или полиэтиленовой пленкой и колбу ставят в термостат (30°C) на 4–6 сут. После окончания инкубации проверяют получение накопительной культуры аммонифицирующих бактерий по посинению лакмусовой бумажки и запаху сероводорода. Отмечают морфологические особенности и подвижность выросших бактерий, микроскопируя накопительную культуру в препаратах «раздавленная капля» и фиксированных окрашенных (фуксином) клеток.

2.6. Получение накопительной культуры микроорганизмов, использующих углеводороды.

Готовят среду следующего состава (г/л): KNO_3 — 4,0; KH_2PO_4 — 0,6; Na_2HPO_4 — 1,4; MgSO_4 — 0,8; вода водопроводная. Исходное значение pH среды доводят до 6,8–7,2 растворами NaOH и HCl (проверяют по бромтимолблау, он должен давать ярко-зеленую окраску при смешивании с каплей среды). В две качалочные колбы объемом 750 мл помещают по 100 мл среды. В одну из колб вносят около 1 г почвы, отобранной у бензоколонки, и 2 мл одного углеводорода (например, керосина), а в другую — такое же количество почвы и 2 мл другого углеводорода (например, вазелинового масла). Колбы закрывают ватными пробками и помещают на качалку (220 об/мин) при 30°C на 5–7 сут. По окончании инкубации отмечают помутнение среды, наличие пленки или осадка. Также возможно окрашивание среды и появление запаха (контролем служит незасеянная стерильная среда). Накопительную культуру микроскопируют, изготовив препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный препарат. Описывают морфологические особенности и подвижность выросших микроорганизмов.

Отмечают различия культуральных признаков и микроскопической картины при развитии микроорганизмов на разных углеводородах.

2.7. Получение накопительной культуры метилотрофных микроорганизмов.

Метилотрофы, использующие метанол, легко выделяются из сточных вод и садовых почв, где этот субстрат часто присутствует как продукт неполного разложения пектина и лигнина. Для получения накопительной культуры метилотрофных бактерий используют синтетическую среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 — 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; NaCl — 0,5; MgSO_4 — 0,025; FeSO_4 — 0,01, вода водопроводная. В качалочную колбу объемом 750 мл помещают 100 мл среды, 4 капли 10%-го дрожжевого экстракта и 0,3% (по объему) метанола. С помощью 10%-х растворов NaOH и HCl доводят значение pH среды до 7,0. Затем в колбу вносят 3–4 мл сточной жидкости или другой образец природного материала. Колбу помещают на качалку (200 об/мин) и оставляют при 30°C на несколько суток. По окончании инкубации проверяют получение накопительной культуры метилотрофных бактерий по помутнению и часто появляющемуся розовому окрашиванию среды (контролем служит исходная стерильная среда). Готовят препарат «раздавленная капля» и фиксированный окрашенный фуксином препарат, при микроскопировании которых отмечают подвижность и морфологические особенности выросших бактерий.

2.8. Получение накопительной культуры нитрифицирующих бактерий.

Готовят среду Виноградского следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,0; K_2HPO_4 — 1,0; MgSO_4 — 0,5; FeSO_4 — 0,4; NaCl — 2,0, вода водопроводная. Среду разливают в колбы объемом 50 мл по 15 мл в каждую (высота слоя среды должна быть 1,0–1,5 см). В каждую колбу вносят на кончике шпателя небольшое количество CaCO_3 . Посевным материалом служит почва, которая должна тонким слоем закрывать доньшко колбы. Колбы помещают в термостат на 30°C. Через 1–3 нед. проверяют получение накопительной культуры нитрификаторов по появлению в среде нитритов и (или) нитратов. Для их обнаружения проводят качественные реакции на нитриты с реактивом Грисса или с помощью крахмал-йодной реакции. Для обнаружения нитритов к капле реактива Грисса на керамической пластинке добавляют каплю выросшей жидкой культуры. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии нитритов. Крахмал-йодная реакция основана на том, что нитриты в кислой среде окисляют йодистый цинк с выделением йода, который реагирует с крахмалом. Для проведения реакции к капле выросшей жидкой культуры на керамической пластинке добавляют каплю раствора, содержащего ZnCl_2 , KI , крахмал и каплю 5%-го раствора HCl . При наличии в среде нитритов появляется синее окрашивание. Для обнаружения нитратов проводят качественную реакцию с дифениламином. На белой керамической пластинке несколько кристаллов дифениламина растворяют в капле концентрированной серной кислоты и к смеси добавляют каплю исследуемой жидкой культуры. При наличии нитратов возникает синее окрашивание. Контролем служит исходная стерильная среда. Следует иметь в виду, что пробу на нитраты можно проводить только в отсутствие нитритов, так как последние тоже

дают синее окрашивание с дифениламином. Так как развитие нитрифицирующих бактерий приводит к подкислению среды, то изменение значения pH определяют с помощью бромтимолблау, который меняет цвет с зеленого на желтый (контролем служит незасеянная стерильная среда). Микроскопируя культуру в препарате «раздавленная капля» и фиксированном окрашенном препарате, отмечают морфологические особенности и подвижность выросших бактерий.

2.9. Получение накопительной культуры пурпурных бактерий.

Пурпурные бактерии являются фототрофами и могут быть выделены из различных пресных и соленых водоемов. Для выделения несерных пурпурных бактерий готовят среду следующего состава (г/л): NH_4Cl — 1,0; KH_2PO_4 — 0,5; MgCl_2 — 0,5; микроэлементы по Пфеннигу — 1 мл. К основному фону среды добавляют (г/л): NaHCO_3 — 2,0; Na_2S — 0,15; ацетат, лактат или малат натрия — 2,0; дрожжевой экстракт — 0,1. Исходное значение pH среды доводят до 7,0 с помощью 10%-х стерильных растворов NaOH и H_3PO_4 . В пробирку или колбу с притертой пробкой вносят 5–10% (по объему) посевного материала (воду или ил из различных водоемов) и доливают до пробки средой так, чтобы между средой и пробкой не оставалось воздушного пространства. Емкости помещают в люминостат (800–1000 люкс, 28–30°C) на 1–2 нед. После окончания инкубации проверяют получение накопительной культуры пурпурных бактерий по окрашиванию среды в розовый, красный или коричневатый цвет, благодаря наличию у клеток большого количества каротиноидов. Накопительную культуру микроскопируют в препарате «раздавленная капля» и в фиксированном окрашенном препарате, отмечая подвижность и морфологические особенности выросших бактерий.

Лабораторная работа 3

Выделение углекислого газа дрожжами

Цель работы: студенты после выполнения работы должны уметь поставить эксперимент, выявляющий возможность использования того или иного субстрата, а также проанализировать зависимость активности метаболизма от количества используемого субстрата.

Дрожжи — это факультативные анаэробы, способные в зависимости от условий переключаться с аэробного дыхания на брожение. Дрожжевые клетки очень быстро потребляют растворенный в воде кислород и после этого для получения энергии переходят на брожение. Поскольку и при дыхании, и при брожении образуется углекислый газ, то его количество и будет показывать уровень физиологической активности дрожжей. Любые клетки должны иметь источник энергии для жизни. В данном случае им является глюкоза. Многие думают, что чем больше сахара будет представлено дрожжам, тем больше будет скорость их дыхания или брожения. Измеряя количество образованного в течение ночи инкубации углекислого газа, вы убедитесь в правильности или ложности этой гипотезы. В этом эксперименте необходимо будет определить характер зависимости количества CO_2 , образуемого дрожжами, от концентрации глюкозы.

Необходимые материалы (количество зависит от числа студентов в группе): горелки, весы, пенициллиновые пузырьки с резиновыми пробками, алюминиевые колпачки к пенициллиновым флаконам, щипцы для зажима колпачков, поплавки (маленькие газособирующие пробирки), одноразовые шприцы на 1 мл, глюкоза, дистиллированная вода, суспензия дрожжей, спирт и ватные диски для протирания пробок, пипетки, линейки, маркеры, мерные цилиндры и стаканчики.

Занятие 1

Готовят растворы с 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 и 32%-м содержанием глюкозы в дистиллированной воде. Для этого на емкости для каждого раствора отмечают маркером требуемый уровень раствора, взвешивают необходимое количество порошка глюкозы, помещают его в емкость и добавляют небольшое количество дистиллированной воды, чтобы только образовалась густая суспензия. Затем все емкости помещают на водяную баню и подогревают до полного растворения глюкозы и образования густого сиропа. В каждую емкость добавляют горячую дистиллированную воду до метки и хорошо перемешивают. Каждый раствор разливают в необходимое число пенициллиновых флаконов по 10 мл (не менее чем в двух повторностях). Поплавки заполняют тем же раствором и помещают во флакон закрытым концом вверх так, чтобы в поплавок не попал воздух. Для того чтобы попавший воздух вышел из поплавка, нужно закрыть горлышко флакона резиновой пробкой, перевернуть и постучать по нему, чтобы воздух из маленькой пробирки вышел полностью. Затем осторожным движением переворачивают флакон обратно. Флаконы с поплавками закрывают резиновыми пробками, зажимают алюминиевыми колпачками и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 0,5 ати. Также необходимо простерилизовать при 1 ати необходимое количество закрытых резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками флаконов с дистиллированной водой и поплавками (для контрольного варианта эксперимента).

Занятие 2

Полученную у преподавателя суспензию *Sacchromyces cerevisiae* хорошо перемешивают и вносят стерильно у пламени горелки в пенициллиновые флаконы с водой и с растворами с разными концентрациями глюкозы. Для этого резиновую пробку на пенициллиновом флаконе протирают ватным диском со спиртом и обжигают в пламени горелки. Затем одноразовый шприц освобождают у огня от упаковки и набирают им 0,1 мл дрожжевой суспензии. Далее прокалывают иглой шприца резиновую пробку флакона и выпускают порцию суспензии в раствор глюкозы или в дистиллированную воду. Варианты опыта маркируют, и флаконы ставят для инкубации в жестяные банки или подносы на сутки при 28–30°C или на 2 сут. при комнатной температуре.

Занятие 3

Используя линейку, измеряют количество газа в поплавке, не вынимая его из флакона (рис. 7.54).

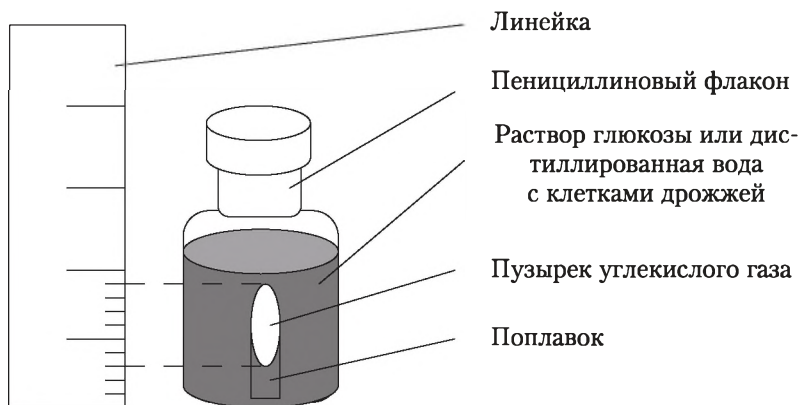


Рис. 7.54. Измерение количества углекислого газа в поплавке

Данные заносят в табл. 7.15.

Таблица 7.15

Влияние концентрации сахара в среде на образование углекислого газа дрожжами

Концентрация раствора глюкозы, %	Количество газа в поплавке, мм		
	I	II	Среднее
0			
0,5			
1			
2			
4			
8			
16			
32			

Откладывая по оси абсцисс концентрации растворов глюкозы, а по оси ординат — количество газа в поплавке в мм, строят график зависимости газообразования от концентрации глюкозы в среде. Делают вывод о влиянии содержания питательного субстрата на рост и жизнедеятельность дрожжей.

Семинар 3

Фотосинтез прокариот

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, дополненным конкретными примерами из монографий и ори-

гинальных статей в научных микробиологических журналах, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 4

Постановка колонки Виноградского

Цель работы: научиться ставить модельные опыты, имитирующие процессы в окружающей среде, анализировать влияние градиентов физико-химических факторов на развитие микроорганизмов.

В почве и водоемах обитают многие про- и эукариотические микроорганизмы. Некоторые из них являются фотосинтезирующими. Свет для них — источник энергии для роста. Различные фотосинтезирующие бактерии нуждаются в различных областях солнечного спектра, однако, для многих из них избыток света так же губителен, как и полное его отсутствие. Микроорганизмам также необходимо определенное количество кислорода для роста или его полное отсутствие. В речных и озерных осадках и в почве на поверхности создаются аэробные условия, однако в нижележащих участках (уже через несколько миллиметров вглубь) кислород может полностью отсутствовать. Аэробные микроорганизмы обитают ближе к поверхности донных осадков или почвы, а анаэробы живут в более глубоких слоях. Это только два из множества факторов, которые будут влиять на распределение микроорганизмов по глубине местообитания.

Необходимые материалы (на одного студента): 4 широкогорлые стеклянные емкости на 800–850 мл с крышками, маркер, липкая лента, ведро на 4–5 л, воронка с широким горлом, чашка или кружка на 150–200 мл, столовая ложка, палочка для перемешивания почвы, 300 г CaCO_3 , 100 г $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (гипса), 4 небольших ведерка (на 1 л) с различными почвами или осадками, собранными в разных местах (приусадебный участок, садовая почва, лесная почва, осадки рек, прудов, болот), 4 небольших ведерка с водой, набранной возле мест сбора образцов почвы, дистиллированная вода для увлажнения образцов почвы, собранных в сухих местах (приусадебный участок или лес), фильтровальная бумага, осветители с лампочками (40–60 Вт).

Занятие 1

Фильтровальную бумагу разрезают на кусочки примерно 1×1 см. Для одной емкости необходим примерно 1 лист А4 фильтровальной бумаги, разрезанной на кусочки. В пустое ведро на 4–5 л набирают 2–3 чашки почвы из первого ведерка с образцом почвы или осадка и вливают туда при постоянном перемешивании 1–2 чашки воды из соответствующего ведерка с водой. При перемешивании удаляют из почвы все палочки, листья, корни и посторонние предметы. Добавляют в смесь нарезанную фильтровальную бумагу и 1 столовую ложку CaCO_3 , смешанного с гипсом (3 : 1). Смесь должна иметь консистенцию жидкой сметаны и переливаться через воронку.

С помощью липкой ленты и маркера подписывают одну из емкостей, указав название пробы, свои инициалы и дату. В данную емкость переносят полученную смесь порциями по 2–3 см. После добавления каждой порции

ее утрамбовывают, постукивая дно емкости о твердую поверхность. Чтобы не было случайного расплескивания содержимого, на время постукивания прикрывают емкость крышкой. Когда до горлышка останется 4—5 см, крышку закрывают. Повторяют процедуру изготовления таких емкостей для каждого образца. Перед смешиванием каждого нового образца тщательно моют ведро. Помечают емкости с помощью липкой ленты и маркера, указав название пробы, свои инициалы и дату.

Емкости с образцами помещают в хорошо освещенное место, но не на прямой солнечный свет. По желанию можно также освещать образцы непрямым светом от настольных ламп. Емкости следует хранить вдали от нагревательных приборов при комнатной температуре. Помечают ту сторону банки, которая обращена к свету.

Необходимо всегда ориентировать емкость одинаково по отношению к источнику света.

Занятия 2—5

Наблюдают за развитием микроорганизмов в емкостях в течение 3—4 нед., отмечая появление на поверхности и внутри различно окрашенных пятен. Результаты наблюдений заносят в рабочую тетрадь, зарисовывая цветными карандашами вид емкостей каждую неделю. Готовят препараты «раздавленная капля» и фиксированные окрашенные препараты из материала, взятого в области цветных пятен образца. Описывают морфологические особенности и подвижность микроорганизмов на препаратах. Можно часть емкостей обернуть цветным прозрачным целлофаном и проследить изменения в расположении и цвете пятен в емкости.

Глава 8

КОНСТРУКТИВНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ У МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности конструктивного метаболизма различных микроорганизмов;

уметь

- объяснить особенности фиксации CO_2 с помощью различных циклов;

владеть

- навыками выделения культур микроорганизмов с различными типами анаболизма.
-

8.1. Связь анаболизма и катаболизма

Анаболизм (пластический обмен) — это совокупность реакций построения сложных молекул и структур из более простых предшественников с использованием метаболической энергии. Основными конечными продуктами пластического обмена являются биополимеры клетки (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды). Осуществление **анаболизма** требует постоянного притока энергоемких молекул, которые образуются при распаде (**катаболизме**) питательных веществ, поглощенных клеткой. Поэтому биосинтетические и энергетические процессы тесно связаны и взаимозависимы. Одни и те же питательные органические вещества могут использоваться и как строительные блоки для анаболизма, и как источники энергии в реакциях катаболизма. Многие промежуточные соединения катаболических путей отводятся в реакции биосинтеза. Катаболические и анаболические пути могут различаться набором ферментов, их регуляцией, внутриклеточной локализацией и использованием кофакторов и переносчиков. Например, жирные кислоты синтезируются из ацетил-КоА и малонил-КоА путем, совершенно отличным от реакций β -окисления. В то же время 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. В нормальных активно растущих клетках всегда поддерживается равновесие между процессами анаболизма и катаболизма. На рис. 8.1 показан пример регуляции работы амфиболических ферментов, позволяющей «перенаправлять» их активность либо в сторону биосинтеза («включая» E_2 -фермент), либо в сторону деградации («активируя» E_1 -фермент).

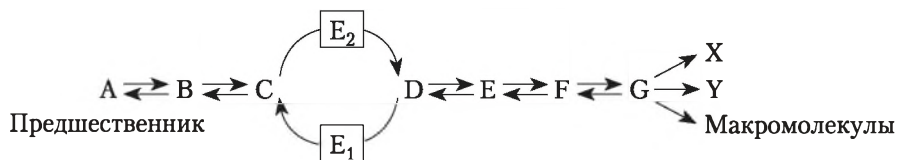


Рис. 8.1. Простейший путь регуляции амфиболических путей у микроорганизмов

8.2. Пути ассимиляции основных биогенных элементов

8.2.1. Ассимиляция углерода у микроорганизмов

Источником углерода для автотрофных организмов служит CO_2 , для гетеротрофов — органические соединения. У микроорганизмов возможности автотрофной ассимиляции углекислого газа значительно шире, чем у высших растений. У цианобактерий, пурпурных бактерий и многих хемолитоавтотрофов представлен **цикл Кальвина** (рибулозобисфосфатный цикл) с ключевым ферментом рибулзобисфосфаткарбоксилазой-оксигеназой (РубисКО) (рис. 8.2).

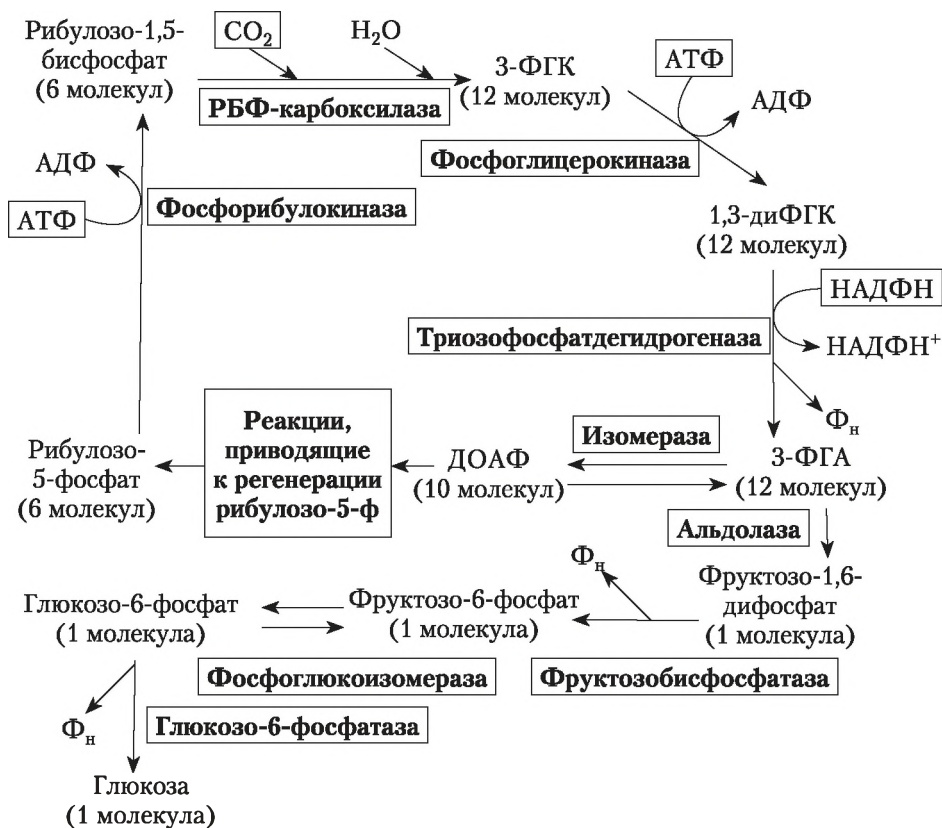


Рис. 8.2. Последовательность реакций цикла Кальвина

Восстановительный цикл трикарбоновых кислот (**цикл Арнона**) с ключевым ферментом цитратлиазой обнаружен у зеленых серных бактерий и у аэробных бактерий рода *Hydrogenobacter* (см. рис. 7.47). Зеленые несерные бактерии могут осуществлять автотрофную ассимиляцию углекислого газа с помощью реакций **глиоксилатного цикла** в двух модификациях (гидроксипропионатного пути или восстановительного цикла дикарбоновых кислот (см. рис. 7.48). Недавние исследования способов автотрофной ассимиляции углерода, проведенные сотрудником кафедры микробиологии МГУ им. Ломоносова И. А. Бергом на представителях домена *Archaea*, привели к открытию двух новых циклов фиксации CO_2 . Оказалось, что у морских архей-автотрофов *Metallosphaera sedula* из филума *Crenarchaeota*, семейства *Sulfolobaceae* фиксация CO_2 осуществляется через последовательность реакций **3-гидроксипропионатного/4-гидроксипропионатного цикла** (рис. 8.3).

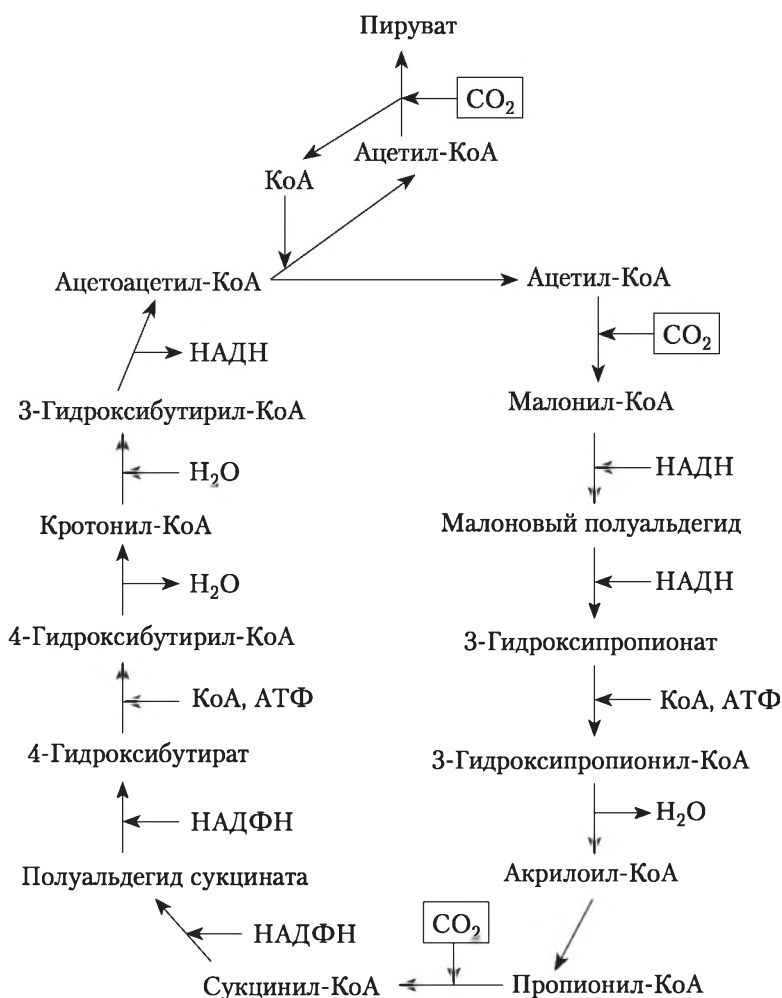


Рис. 8.3. Последовательность реакций 3-гидроксипропионатного/4-гидроксипропионатного цикла (1-го цикла Берга)

Судя по распространению генов, ответственных за синтез ключевых ферментов этого цикла, в пробах ДНК, выделенных из различных областей мирового океана, данный путь является довольно распространенным среди архей, обитающих в морях, и может вносить свой вклад в общую первичную продукцию органического вещества на Земле. У гипертермофильных анаэробов и автотрофов *Ignicoccus hospitalis* (семейство *Desulfurococcaceae*), *Thermoproteus neutrophilus* (семейство *Thermoproteaceae*), *Pyrolobus fumarii* (семейство *Pyrodictiaceae*) обнаружен еще один путь автотрофной ассимиляции углерода на Земле — **дикарбоксилатный/4-гидроксibuтиратный цикл** фиксации CO_2 (рис. 8.4).

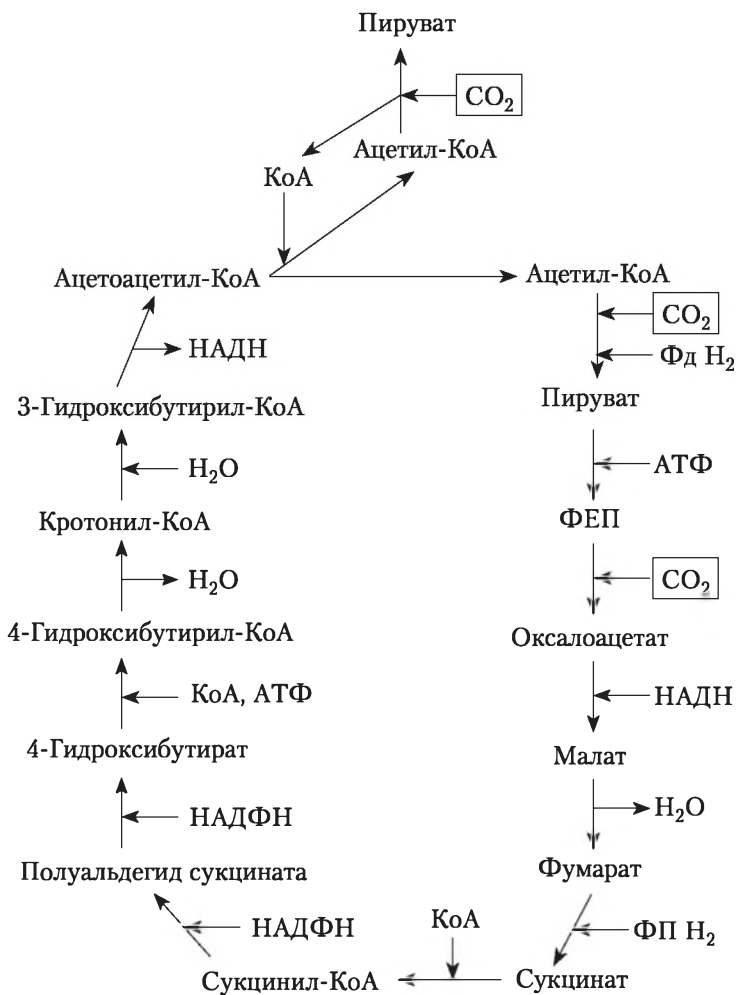


Рис. 8.4. Последовательность реакций дикарбоксилатного/4-гидроксibuтиратного цикла (2-го цикла Берга)

Этот цикл реализуют как археи, так и бактерии, он широко распространен на Земле. Эти пути имеют циклический характер. Первая стадия заключается в присоединении (фиксации) CO_2 к молекуле-акцептору.

Затем углерод углекислого газа восстанавливается до уровня органических веществ (как правило, образуется C_3 -соединение), которые отводятся в биосинтетические пути. Цикл замыкается с помощью реакций, приводящих к регенерации акцептора CO_2 . У метаногенов, гомоацетогенов и сульфатредукторов присутствует нециклический **ацетил-КоА-путь** (см. рис. 7.14) автотрофной ассимиляции CO_2 (путь Вуда — Льюнгдала), в котором из двух молекул углекислого газа образуется активированная молекула уксусной кислоты. Восстановление углерода углекислого газа происходит последовательно с участием ряда коферментов. Таким образом, с учетом вновь открытых циклов Берга в настоящее время известно шесть путей автотрофной фиксации CO_2 .

Гетеротрофы не способны осуществлять полное построение вещества клетки за счет CO_2 , однако и у них возможна **гетеротрофная фиксация углекислого газа**. Это, например, известная **реакция Вуда — Веркмана**, когда ФЕП или пируват путем карбоксилирования достраивается до C_4 -кислоты (оксалоацетата). Карбоксилированию могут подвергаться также ацетил-КоА, пропионил-КоА, сукцинил-КоА, α -кетоглутарат и соединения с большим числом атомов углерода, например, фенилацетат. Гетеротрофная фиксация CO_2 составляет 2—6% от общего потребления углерода клеткой, а на бедных средах может достигать уровня 30%. Чем проще среда культивирования, тем активнее этот процесс. Таким путем удлиняются углеродные скелеты, а также поддерживается окислительно-восстановительный потенциал среды.

CO_2 — соединение углерода в самой окисленной форме, и поэтому оно 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 ассимиляционных циклов (рибулозомонофосфатном, сериновом или диоксиацетоновом (см. рис. 7.30, 7.31, 7.34)).

Если микроорганизмы растут на более восстановленных, чем CO_2 , соединениях, но не сахарах, они должны сами синтезировать глюкозу путем **глюконеогенеза**. На первый взгляд, этот путь является как бы обращенным гликолитическим путем, однако на трех его стадиях работают совершенно другие ферменты. Пируват превращается в 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.

8.2.2. Пути ассимиляции азота

В конструктивных целях микроорганизмы способны использовать более обширный спектр соединений азота, чем животные и растения. Основные из них — это молекулярный азот, аммоний, нитрит, нитрат, гидроксиламин, метиламины, аминокислоты, мочевины, пурины, пиримидины, белки.

Использование молекулярного азота для синтеза собственных соединений присуще только прокариотическим микроорганизмам и носит название **азотфиксации**, под которой понимают способность некоторых групп бактерий и архей к энзиматическому восстановлению азота (составляющего в атмосфере $\approx 78\%$) до аммония (с обязательным образованием молекулярного водорода).

Аммоний 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. 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). Однако основное связывание азота происходит путем микробной азотфиксации. Именно микроорганизмы-азотфиксаторы замыкают глобальный цикл азота на Земле.

С давних пор было известно, что севооборот с бобовыми растениями повышает урожай злаков. Первые **азотфиксаторы (диазотрофы)** были описаны М. Бейеринком и С. Н. Виноградским в конце XIX в. В 1888 г. М. Бейеринк выделил 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*. В настоящее время показано, что способностью к азотфиксации обладают представители 80 родов из 27 семейств бактерий и по крайней мере три термофильных родов архей. Свободноживущие азотфиксаторы — хемотрофы встречаются среди анаэробных клостридий и сульфатредукторов, факультативно анаэробных бацилл и представителей семейства *Enterobacteriaceae*, аэробных метанотрофов и представителей семейства *Azotobacteriaceae*. Фототрофные свободноживущие азотфиксаторы обнаружены среди пурпурных, зеленых бактерий и цианобактерий. В настоящее время свободноживущих азотфиксаторов подразделяют на истинно свободноживущих и ассоциативных, т.е. предпочтительно встречающихся в ризосфере некоторых высших растений (злаков). К ассоциативным диазотрофам относятся представители семейств *Enterobacteriaceae* и *Azotobacteriaceae*.

Симбиотическими азотфиксаторами являются, прежде всего, клубеньковые бактерии семейства *Rhizobiaceae* и актинобактерии рода *Frankia*. Эти микроорганизмы фиксируют азот в стадии эндосимбионтов, обеспечивая растение связанными формами азота. Растение снабжает микроорганизм питательными веществами и энергией и защищает азотфиксирующий ферментный комплекс (**нитрогеназу**) от действия кислорода. **Клубеньковые бактерии** образуют особые разрастания (**клубеньки**) на корнях бобовых растений (рис. 8.5).

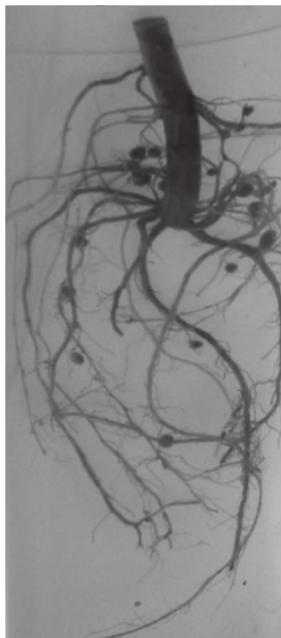


Рис. 8.5. Клубеньки на корнях растений

Корневые волоски бобовых растений выделяют специальные белковые аттрактанты-**лектины**, имеющие сродство к микробным полисахаридам, которые привлекают ризобий и индуцируют у них синтез соединений, способствующих прикреплению бактериальных клеток к поверхности корня. При взаимодействии с растением микроорганизмы образуют **стимуляторы роста** (гетероауксины, индолилуксусную кислоту), под действием которых разрастается часть поверхностных слоев клеток корневого волоска (рис. 8.6). Корневой волосок закручивается в спираль, внутри которой оказываются микробные клетки. С помощью специальных экзоферментов бактериальные клетки размягчают оболочки поверхностных структур корня и проникают внутрь тканей растения. Там они принимают вид длинных и тонких инфекционных нитей, достигающих клеток кортекса корня. Внутри этих клеток инфекционная нить распадается на удлиненные клетки неправильной формы (**бактероиды**). Вокруг бактериоидов клетки корня интенсивно делятся и образуют клубеньки.

Процесс симбиотической азотфиксации внутри клубеньков сопровождается совместным синтезом особого вещества **леггемоглобина**, белковую часть которого образует растение, а гемовую — бактерия. Родственные стрептомицетам франкии, проникая в клетки корней и листьев некоторых покрытосеменных кустарников (ольха, облепиха), стимулируют местное разрастание тканей с образованием клубеньков. Гифы этих мицелиальных микроорганизмов внутри корней или листьев образуют разветвления и раздуваются на концах, формируя **везикулы**. В них и осуществляется фиксация молекулярного азота. Таким образом, при симбиотической азотфиксации изменяется как растение (происходит разрастание тканей), так

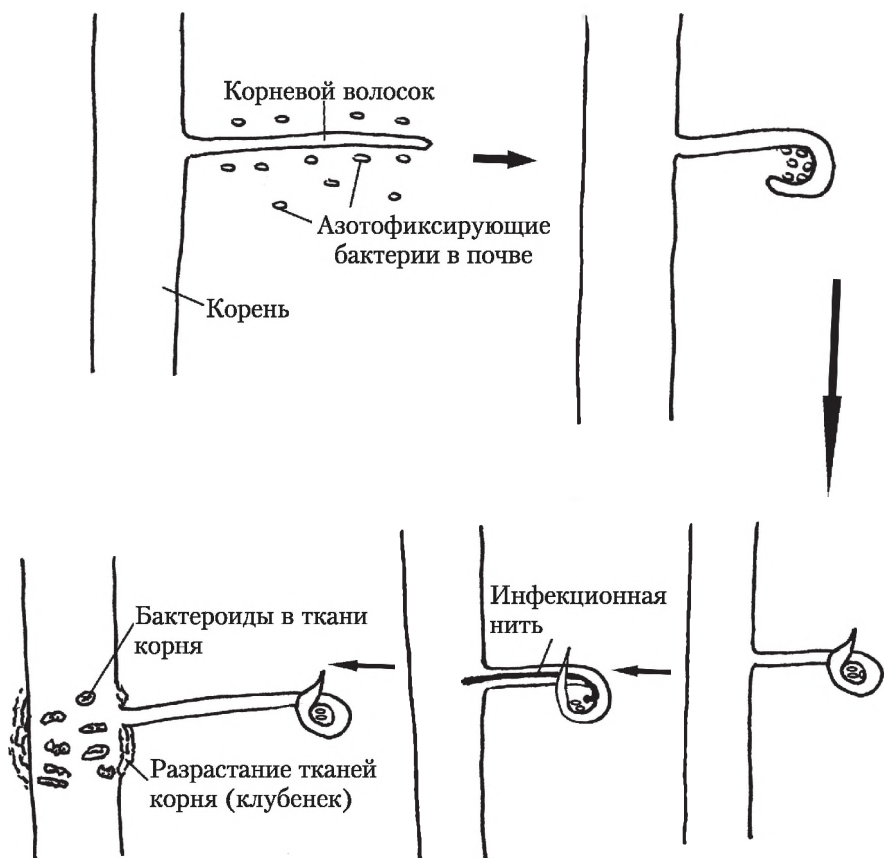


Рис. 8.6. Образование клубенька на корне

и микроорганизм (меняется морфология клетки). Возможно, мы наблюдаем, как путем симбиоза формируется новая эукариотическая органелла. Ранее считали, что диазотрофы фиксируют азот только в симбиозе. Сейчас показано, что если снизить парциальное давление кислорода, то симбионты смогут фиксировать азот и в чистой культуре, без растения-хозяина. Однако симбиотическая азотфиксация значительно эффективней. К симбиотическим азотфиксаторам также относятся некоторые цианобактерии в лишайниках (*Anabaena*, *Nostoc*) и симбионты водного папоротника *Azolla* (*A. azollae*), растущие в пазухах листьев.

Азотфиксирующие микроорганизмы выделяют на средах без связанных форм азота. В настоящее время наиболее распространенными методами изучения азотфиксации являются изотопный и ацетиленовый. Первый основан на включении нерадиоактивного, стабильного N^{15} или радиоактивного, с периодом полужизни $\approx 0,5$ ч, N^{13} -изотопов в клетку, а второй — на способности азотфиксирующих микроорганизмов осуществлять реакцию ацетиленредукции ($C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$).

Несмотря на разнообразие микроорганизмов, осуществляющих азотфиксацию, ферментный нитрогеназный комплекс имеет принципиальное сходство в строении и свойствах и у анаэробов, и у аэробов. Один из его

отличительных признаков — чрезвычайная чувствительность к наличию кислорода. Поэтому аэробные микроорганизмы сталкиваются с проблемой защиты нитрогеназы от кислорода. Разные микроорганизмы «решают» ее разными путями. У нитчатых цианобактерий имеются специализированные клетки-гетероцисты, в которых отсутствует ФС II, и поэтому при фотосинтезе не образуется кислород, а толстая клеточная стенка препятствует его проникновению снаружи. Активная оксидазная система тут же восстанавливает проникший кислород. У азотобактера сильно развита слизистая капсула, препятствующая проникновению кислорода, и имеется 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 эффективная защита нитрогеназы обнаружена у клубеньковых бактерий. Для защиты от кислорода в клубеньках синтезируется самый высокочувствительный к кислороду белок-оксидаза — **леггемоглобин**. Он реагирует с наномолярными концентрациями кислорода. На срезах клубеньков леггемоглобин дает красное окрашивание.

Фиксация азота жестко регулируется наличием его связанных форм. Нитрогеназная активность подавляется, если в среде есть NH_4^+ (рис. 8.7).

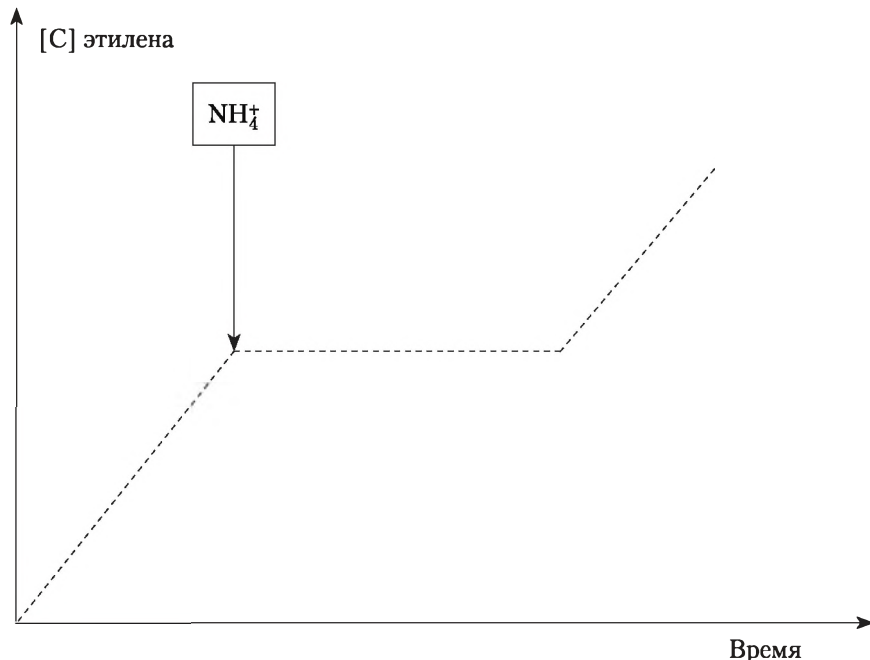


Рис. 8.7. Ингибирование активности нитрогеназного комплекса при внесении в среду ионов аммония

Газообразный азот — это химически инертное и очень стабильное вещество. Реакция $3\text{H}_2 + \text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$ — эндотермическая, поэтому чтобы разорвать тройную связь в молекуле азота необходимо по крайней мере 8 электронов и 16 молекул АТФ. В действительности АТФ затрачивается больше, так как часть ее необходима для поддержания анаэробных условий. Нитрогеназный ферментный комплекс состоит из двух белковых компонентов разной молекулярной массы (рис. 8.8).

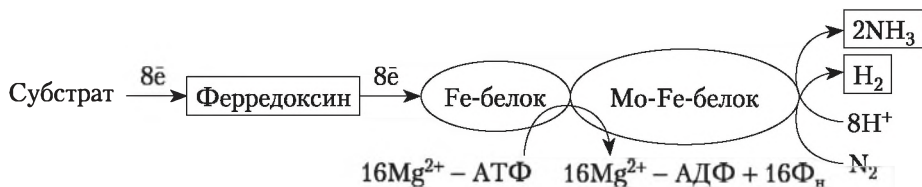
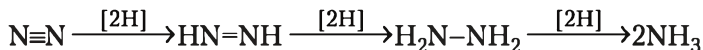
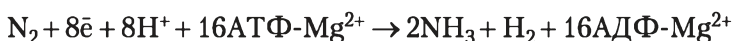


Рис. 8.8. Работа нитрогеназного комплекса

Более тяжелый Мо-Fe-белок (220 кДа) содержит два атома молибдена и 28–32 атома железа, в легком Fe-белке (64 кДа) — 4 атома железа. Для проявления нитрогеназной активности необходимы оба компонента, но *in vitro* они взаимозаменяемы и могут быть взяты у разных микроорганизмов. **Нитрогеназа** получает электроны и протоны непосредственно от низкопотенциального переносчика ферредоксина, который восстанавливается в реакциях фотосинтеза у фототрофов, при дыхании у аэробных diaзотрофов или при брожении у анаэробов. Реакция проходит в несколько стадий:



Первым свободным продуктом является аммиак, все промежуточные продукты связаны с ферментным комплексом. При фиксации азота всегда выделяется молекулярный водород:



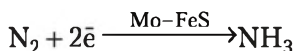
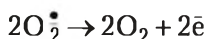
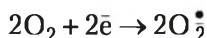
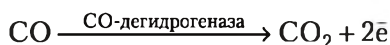
У *Bradyrhizobium japonicum* при пониженном содержании кислорода наряду с нитрогеназой, выделяющей H_2 , образуется также гидрогеназа. Возможность использования молекулярного водорода в качестве дополнительного источника энергии дает этим микроорганизмам преимущество в росте по сравнению с другими азотфиксаторами. Несмотря на высокое сродство нитрогеназы к N_2 , она не очень специфична и может восстанавливать и другие соединения:



Нитрогеназный комплекс азотфиксаторов кодируется кластером *nif*-генов, которые в настоящее время успешно «пересажены» в *E. coli*, но, к сожалению, азотфиксации не происходит, так как у организма-реципиента нет стратегии защиты нитрогеназы от кислорода.

В 1997 г. появилось сообщение немецких ученых о нечувствительной к кислороду нитрогеназе, выделенной при изучении карбоксидотрофных

микроорганизмов. Для выделения карбоксидобактерий-аэробов, окисляющих СО и имеющих устойчивую к угарному газу оксидазу, пробы почвы отбирали из верхней части дерна ямы (получение древесного угля из березовых поленьев в результате медленного тления). В процессе работы был выделен мицелиальный микроорганизм *Streptomyces thermoautotrophicus* — автотрофная, аэробная, термофильная (температура роста — до 70°C) актинобактерия, оказавшаяся способной к азотфиксации. При этом активность необычного нитрогеназного комплекса этого микроорганизма не только не подавлялась кислородом, но и зависела от O₂, СО и супероксидрадикала:



Эта нитрогеназа по строению и действию не была похожа ни на один известный фермент. Так, она не восстанавливала ацетилен в этилен и была менее требовательна к количеству АТФ (4—12 молекул), хотя также содержала Mo²⁺.

Практическое применение diaзотрофов в настоящее время заключается в их использовании в качестве «бактериальных азотных удобрений». Клетки свободноживущих азотфиксаторов вносят непосредственно в почву, а симбиотических — на корни или семена растений. На рисовых полях азотфиксация происходит благодаря развивающимся в воде цианобактериям. В качестве «зеленого удобрения» используют водный папоротник *Azolla* в симбиозе с *Anabaena*, который закапывают прямо в почву. Продолжаются работы по внедрению *nif*-генов в другие практически значимые микроорганизмы.

Нитрат и нитрит микроорганизмы, как и растения, потребляют в процессе **ассимиляционной нитратредукции**, состоящем из двух стадий (рис. 8.9):



На первом этапе нитрат восстанавливается до нитрита с участием ассимиляционной нитратредуктазы (E₁), которая переносит два электрона. Это растворимый фермент, содержащий ионы молибдена и ФАД. Реакция происходит в цитоплазме. Второй этап катализирует ферментный комплекс нитритредуктазы (E₂), по строению схожий с диссимиляционным ферментом и включающий гем и железосерный кластер. Восстановление нитрита до аммония осуществляется последовательно, через ряд промежуточных

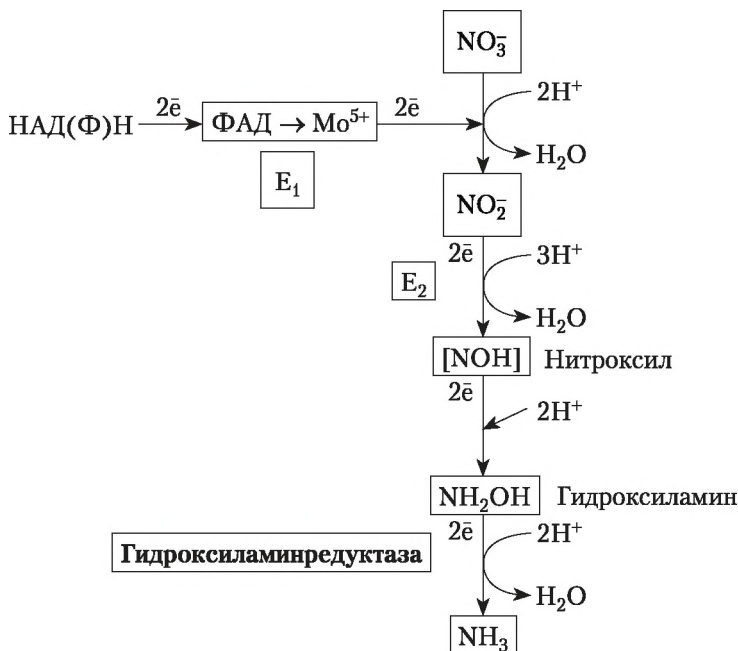
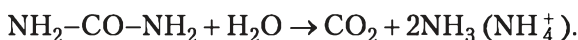


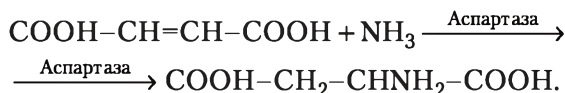
Рис. 8.9. Последовательность реакций при ассимиляционной нитратредукции:

E_1 — ассимиляционная нитратредуктаза; E_2 — ассимиляционная нитритредуктаза продуктов, остающихся связанными с ферментным комплексом. При этом переносится шесть электронов. Возможно, также присутствует и другой фермент, восстанавливающий гидроксиламин. Продукт восстановления нитрата, аммоний, встраивается в органические молекулы при пластическом обмене.

Источником аммония для микроорганизмов может служить также мочеви́на, разлагаемая ферментом **уреазой** на углекислый газ и аммиак:



Микроорганизмы имеют несколько **систем ассимиляции аммония**. У факультативных анаэробов семейства *Enterobacteriaceae* и некоторых клостридий аммоний присоединяется по двойной связи к непредельным жирным кислотам с образованием аминокислот. Так, при аминировании фумарата под действием фермента аспартазы образуется аспарагиновая кислота:



Значительно чаще происходит присоединение аминогруппы и одновременное восстановление кетокислот (α -кетоглутарата, пирувата, оксалоацетата и др.). Например, при восстановительном аминировании α -кетоглутаровой кислоты с помощью фермента глутаматдегидрогеназы образуется глутаминовая кислота:



Аммоний может также реагировать с карбоксильной группой аминокислот с образованием амидов. Наиболее часто так осуществляется синтез глутамина под действием фермента глутаминсинтетазы:

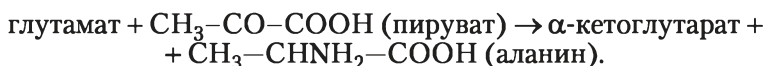


Важной реакцией ассимиляции аммония является его взаимодействие с CO_2 и АТФ с образованием карбамоилфосфата:



Это соединение участвует в синтезе цитруллина, орнитина и нуклеотидов у пурпурных бактерий и некоторых стрептококков.

Для образования других типов аминокислот микроорганизмы осуществляют **переаминирование**, когда аминогруппа глутаминовой кислоты или глутамина передается на кетокислоту (например, на пируват с получением аланина:



В реакции переаминирования участвует фермент трансаминаза с пиридоксинфосфатом (B_1) в качестве кофермента и глутаминовая кислота как донор 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. сочетают реакции образования амида и переаминирования его с α -кетоглутаратом. При избытке аммония работает глутаматдегидрогеназа и происходит восстановительное аминирование кетокислот.

8.2.3. Микробная ассимиляция серы

Сера входит в состав метионина, цистеина, глутатиона, кофермента А, сульфоллипидов и сульфополисахаридов. В составе таких веществ сера находится в восстановленной форме (S^{2-}), поэтому некоторые из них могут использоваться и в катаболизме. Большинство микроорганизмов способно восстанавливать окисленные соединения серы до этого уровня с помощью **ассимиляционной сульфатредукции**. У микроорганизмов первая реакция этого процесса, заключающаяся в активировании сульфата за счет его присоединения к АМФ, совпадает с начальной стадией диссимиляционного восстановления сульфата. Далее этот комплекс фосфорилируется и про-

исходит восстановление сульфата в сульфит. Отделившись от молекулы-переносчика, сульфит восстанавливается ферментом сульфитредуктазой до уровня S^{2-} и включается в серосодержащие аминокислоты (цистеин). Процесс ассимиляционной сульфатредукции может проходить в двух вариантах, различающихся конечными стадиями у бактерий и грибов (рис. 8.10).

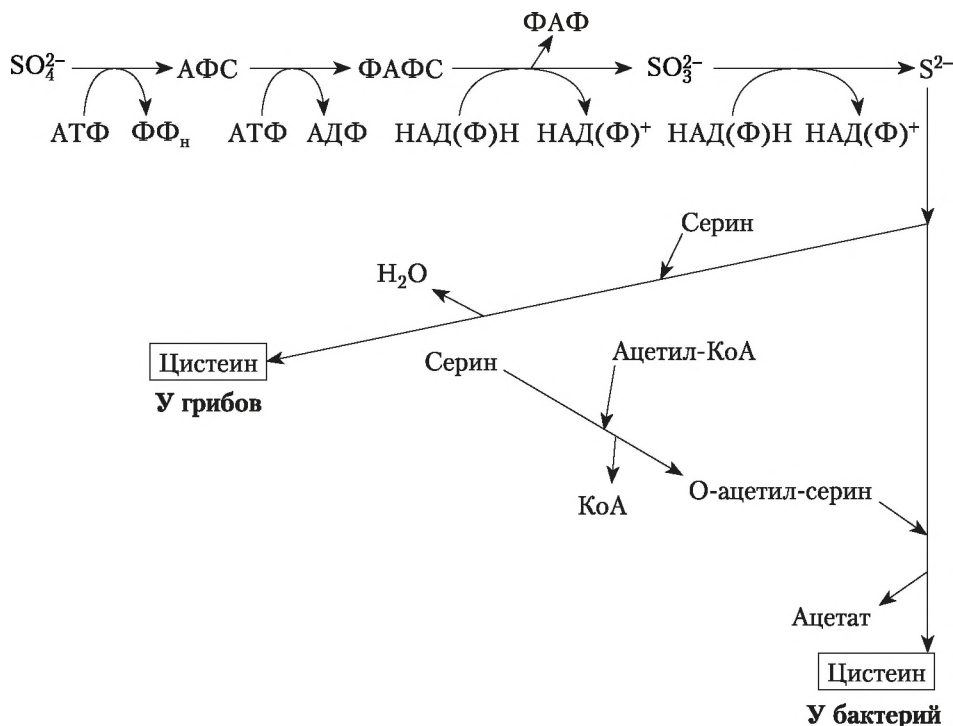


Рис. 8.10. Процесс ассимиляционной сульфатредукции:

АФС — аденозинфосфосульфат; ФАФС — фосфоаденозинфосфосульфат;
ФАФ — фосфоаденозинфосфат

Сложные серосодержащие соединения (сульфолипиды и сульфополисахариды) образуются при участии фосфорилированного комплекса сульфата с АМФ (ФАФС). Микроорганизмы, не способные осуществлять ассимиляционную сульфатредукцию, могут расти только при наличии S^{2-} в среде.

8.2.4. Ассимиляция фосфора микроорганизмами

Фосфор — второй после азота по важности неорганический питательный компонент для роста живых организмов. Он входит в состав ДНК, РНК, АТФ и фосфолипидов. Фосфор присутствует в окружающей среде в растворимой форме (PO_4^{3-}), а также в виде нерастворимых органических и минеральных соединений фосфора. Микробные превращения фосфоросодержащих веществ обычно не приводят к изменению его валентности (фосфор почти всегда находится в пятивалентном состоянии, за исключением сильно восстановленных условий). Микроорганизмы не восстанавливают фосфор при включении его в органический материал. Процесс восстано-

ния фосфора возможен в цепи окислительно-восстановительных реакций в соответствии со схемой: $\text{H}_3\text{P}^{+5}\text{O}_4$ (фосфат) $\rightarrow$ $\text{H}_3\text{P}^{+3}\text{O}_3$ (фосфит) $\rightarrow$ $\text{H}_3\text{P}^{+1}\text{O}_2$ (гипофосфит) $\rightarrow$ P^{-3}H_3 (фосфин), но обычно этот процесс не имеет особого значения и роль микроорганизмов в нем не ясна.

8.2.5. Микробная ассимиляция железа

Железо присутствует в природных местообитаниях неравномерно. Для осуществления реакций ассимиляции микроорганизмы вынуждены активно «добывать» его с помощью сидерофоров или получать из готовых железосодержащих органических соединений. Так, некоторые патогенные микроорганизмы родов *Escherichia*, *Neisseria*, *Hemophylus* способны извлекать железо из гемоглобинов и других гем-белковых комплексов. Наличие запасов железа в клетках стабилизирует его ассимиляцию при истощении внешних источников. Запасание этого элемента в форме Fe^{3+} -соединений осуществляется в виде отложений нерастворимых гидрооксидов железа в слизистых внеклеточных структурах (чехлах и стебельках), а также внутриклеточно в виде магнетосом и в составе ферритин-подобных белков.

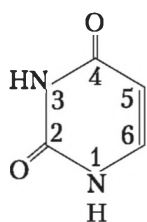
Ассимиляционное восстановление железа осуществляют флаavin-зависимые Fe^{3+} -редуктазы двух типов. Ферменты первого типа связаны с ЦПМ, второго — растворены в цитоплазме или периплазматическом пространстве. Избыток двухвалентного железа в клетке приводит к образованию токсичных активных форм кислорода. Поэтому катионы Fe^{2+} , не идущие непосредственно на синтезы, в физиологически активных микробных клетках немедленно окисляются до Fe^{3+} .

8.3. Основные стадии синтеза сложных органических веществ, биополимеров и запасных веществ у микроорганизмов

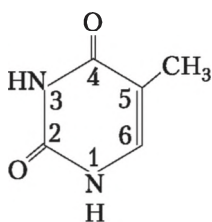
К основным сложным соединениям клетки относятся четыре класса макромолекул: нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды и липиды. Они состоят из низкомолекулярных органических веществ, соединенных в цепь или в сеть. Нуклеиновые кислоты строятся из нуклеотидов, белки — из аминокислот, полисахариды — из простых сахаров, а сложные липиды могут содержать как простые липиды, так и предшественники другой химической природы. Образование биополимера начинается с синтеза активированных предшественников (мономеров), чаще всего присоединенных к молекулам-переносчикам. При активации расходуется энергия АТФ. Молекулы-переносчики доставляют мономеры к растущей полимерной цепи.

8.3.1. Синтез нуклеиновых кислот

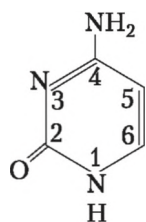
Нуклеиновые кислоты синтезируются из пурин- и пиримидиннуклеозидтрифосфатов, которые имеют в целом сходное строение (рис. 8.11). В них пуриновое (аденин — А, гуанин — Г) или пиримидиновое (урацил — У, цитозин — Ц, тимин — Т) основание соединено с пентозой через атом азота (образуя нуклеозид), а фосфатные группы находятся в 5'-положении (образуя нуклеотид).



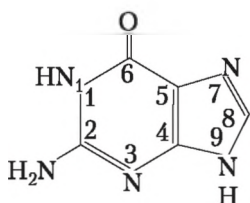
Урацил У



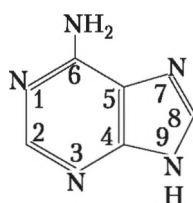
Тимин Т



Цитозин Ц



Гуанин Г



Аденин А

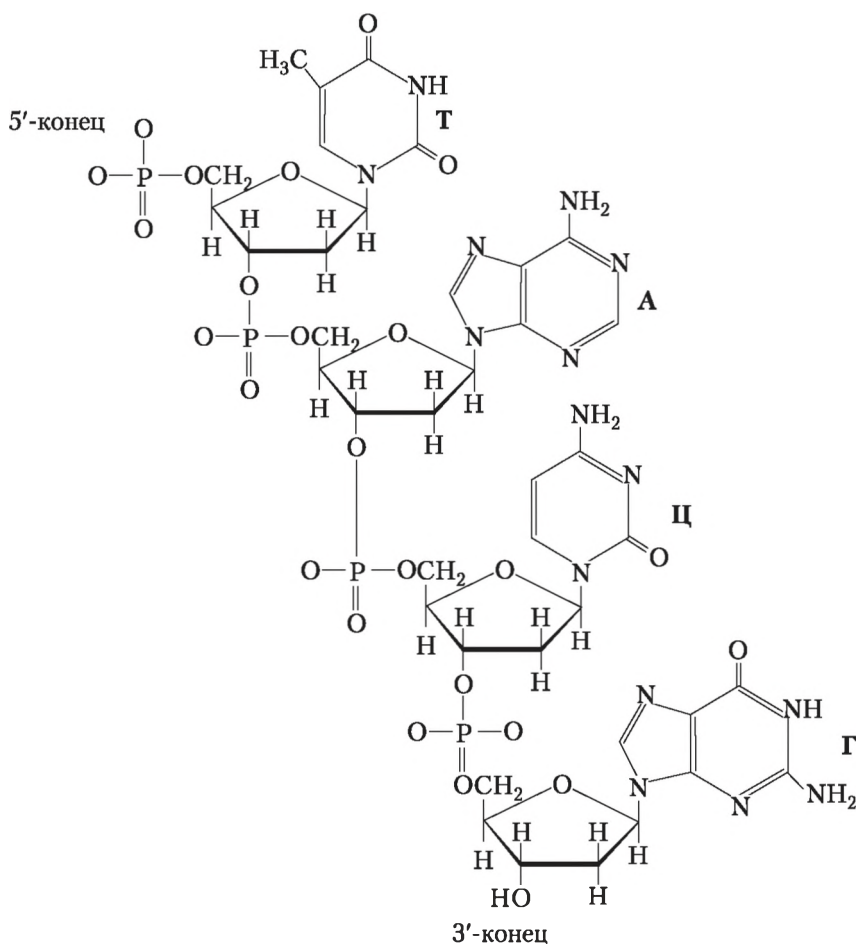


Рис. 8.11. Азотистые основания и цепь нуклеиновой кислоты из нуклеотидов

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. В случае пиримидиновых рибонуклеотидов сначала происходит конденсация аспарагиновой кислоты и карбамоилфосфата с образованием шестичленного пиримидинового кольца, а затем присоединение рибозофосфатного остатка. Дезоксирибонуклеотиды образуются из рибонуклеотидов путем восстановления.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) состоит из двух спирально закрученных цепей (рис. 8.12). Каждая цепь образована дезоксирибонуклеотидами четырех видов (А, Т, Г, Ц), соединенными в различной последовательности с помощью фосфодиэфирных связей.

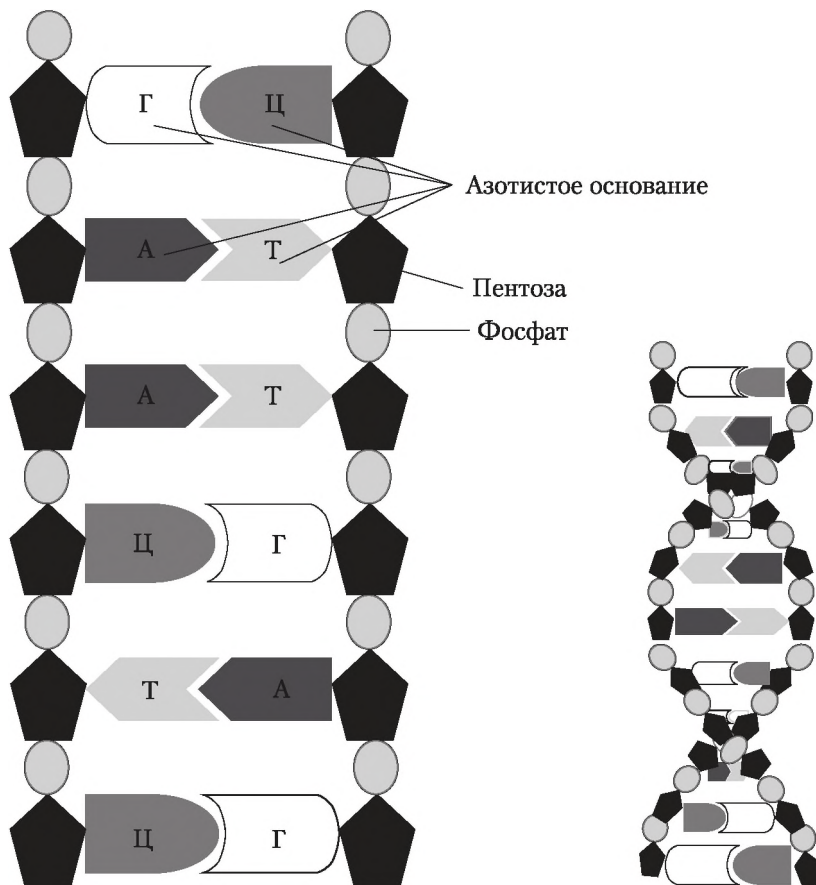


Рис. 8.12. Строение ДНК

Поскольку каждый предшественник ДНК имеет 5'-(фосфатный) и 3'-(гидроксильный) конец, то и синтезированная из них цепь тоже будет обладать 5'- и 3'-концами. Двойная спираль ДНК содержит разнонаправленные цепи, которые связаны поперечными водородными связями: А с Т и Г с Ц. Генетическая информация определяется последовательностью расположения нуклеотидов, которая уникальна для каждого организма. Образование ДНК осуществляется путем **матричного синтеза** в процессе репликации. **Репликация** ДНК происходит на каждой цепи двунитевой материнской ДНК в качестве матрицы (рис. 8.13, *а*) при участии ферментов ДНК-полимераз с дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатами в качестве субстратов. У прокариот репликация начинается в определенном участке кольцевой двухцепочечной молекулы.

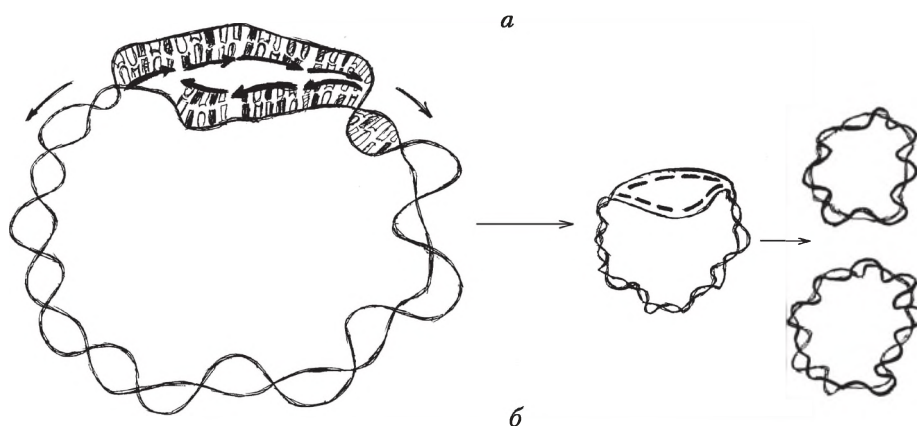


Рис. 8.13. Репликация ДНК:

а — достраивание новой цепи (показана черным) на каждой цепи двунитевой материнской ДНК в качестве матрицы;

б — образование репликативных вилок на кольцевой ДНК прокариот

В этом месте двойная спираль расплетается под действием сложного комплекса ферментов и образуются две репликативные вилки (рис. 8.13, б). Репликация ДНК происходит от 5'- к 3'-концу, т.е. в противоположном направлении на каждой цепи, и завершается «встречей» репликативных вилок на стороне кольцевой молекулы, противолежащей началу расплетания. Новые цепи ДНК синтезируются в виде коротких фрагментов, затем соединяемых между собой. Результатом репликации являются две кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК, в каждой из которых одна цепь материнская, а одна — вновь синтезированная.

Молекулы рибонуклеиновых кислот (РНК) бывают трех типов. **Информационные (матричные) РНК (иРНК, мРНК)** служат матрицами синтеза белков, **рибосомальные РНК (рРНК)** входят в состав рибосом, а **транспортные РНК (тРНК)** осуществляют перенос аминокислот. Образование рибонуклеиновых кислот осуществляется в процессе **транскрипции** при помощи ферментов РНК-полимераз (рис. 8.14). Матрицей для транскрипции служит одна из цепей ДНК, а предшественниками — рибонуклеотиды (А, У, Г, Ц). Присоединение определенного σ -фактора (специальной белковой молекулы) к РНК-полимеразе служит для узнавания транскрибируемого участка ДНК и позволяет ферменту связаться с промотором, где ДНК расплетается и начинается синтез РНК. Промотор может задавать как транскрипцию одного гена, так и считывание группы генов (оперона).

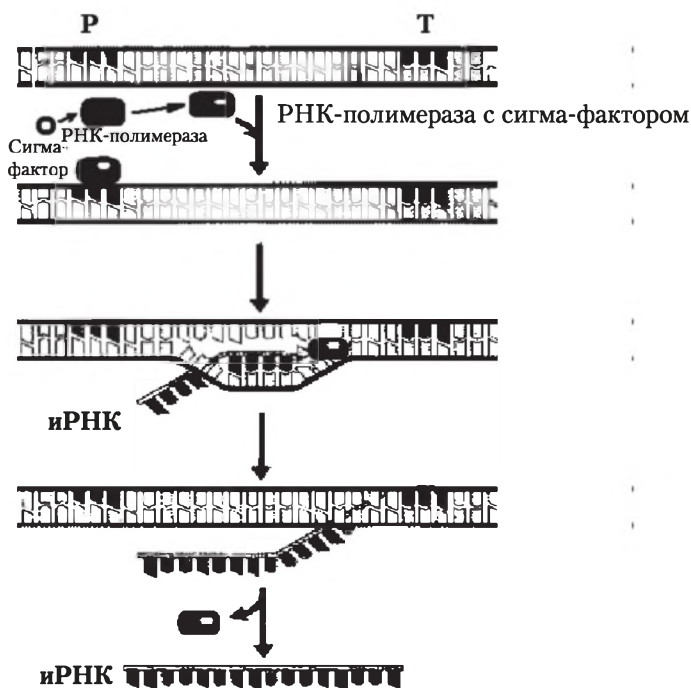


Рис. 8.14. Транскрипция:

Р — промотор; Т — терминирующий участок

При прохождении по одной из цепей ДНК РНК-полимераза формирует нить из рибонуклеотидов, «подбирая» их по принципу комплементарности. Напротив А всегда оказывается У, напротив Г — Ц, напротив У — А и напротив Ц — Г. Таким образом, информация, заложенная в последовательности дезоксирибонуклеотидов, «переписывается» в виде цепочки рибонуклеотидов (одноцепочечной молекулы РНК). По достижении РНК-полимеразой определенного (терминального) участка ДНК, вызывающего отделение фермента от матрицы, транскрипция завершается.

8.3.2. Синтез белков

Белки синтезируются из двадцати аминокислот, предшественниками которых являются различные интермедиаты катаболизма, дающие их углеродные скелеты. Все аминокислоты (рис. 8.15, а) делятся на группы в соответствии со своим биосинтетическим происхождением. Синтез аминокислот группы глутаминовой кислоты (глутаминовая кислота, глутамин, аргинин, пролин) берет начало от α -кетоглутарата, 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 аспарагиновой кислоты, пантотеновая кислота — группы пировиноградной кислоты, а пурины и порфирины — группы серина.

Биосинтез белков (рис. 8.15, б) происходит в процессе **трансляции** и для своего осуществления требует присутствия 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). **Генетический код** универсален для всех живых организмов, в нем каждая тройка нуклеотидов обозначает определенную аминокислоту. Активирование аминокислоты осуществляется путем ее присоединения к «своей» тРНК с затратой энергии АТФ. Молекула тРНК имеет область, связывающую аминокислоту, петлю,

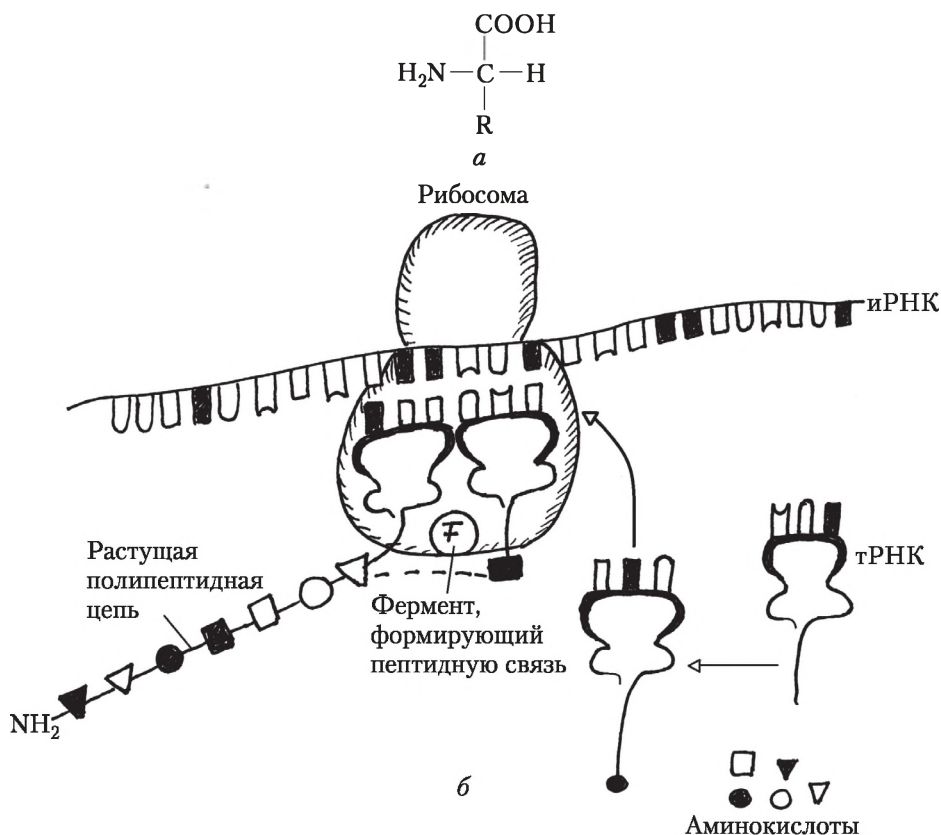


Рис. 8.15. Синтез белка:

a — обобщенная формула аминокислот; *б* — процесс трансляции

распознающую тройку нуклеотидов на иРНК, и участки присоединения к рибосоме и ферменту. «Перевод» знаков генетического кода последовательности нуклеотидов иРНК в буквы цепочки аминокислот белка (трансляцию) осуществляет рибосома. **Рибосома** обеспечивает взаимодействие тройки нуклеотидов иРНК, тРНК, нагруженной соответствующей аминокислотой, и фермента пептидилтрансферазы, образующего пептидные связи между последней аминокислотой растущего полипептида и вновь поступившей аминокислотой. Освобожденная тРНК выбрасывается из рибосомы, а иРНК «продергивается» через рибосому, так что внутри оказывается следующая тройка нуклеотидов. Трансляция продолжается, пока рибосома не достигнет специального участка терминации на молекуле иРНК, где полипептидная цепь отделяется от рибосомы, а сама рибосома распадается на субъединицы. Обычно к одной молекуле иРНК прикрепляется большое количество рибосом, образуя **полисому** (рис. 8.16).

Полипептидная цепочка, растущая от N-конца (аминогруппы) к С-концу (карбоксильной группе), выходя из рибосомы, определенным образом сворачивается. За счет образования водородных связей между разными аминокислотными остатками участки полипептида приобретают вторичную структуру в виде спирали или плоскости. Эти участки складываются

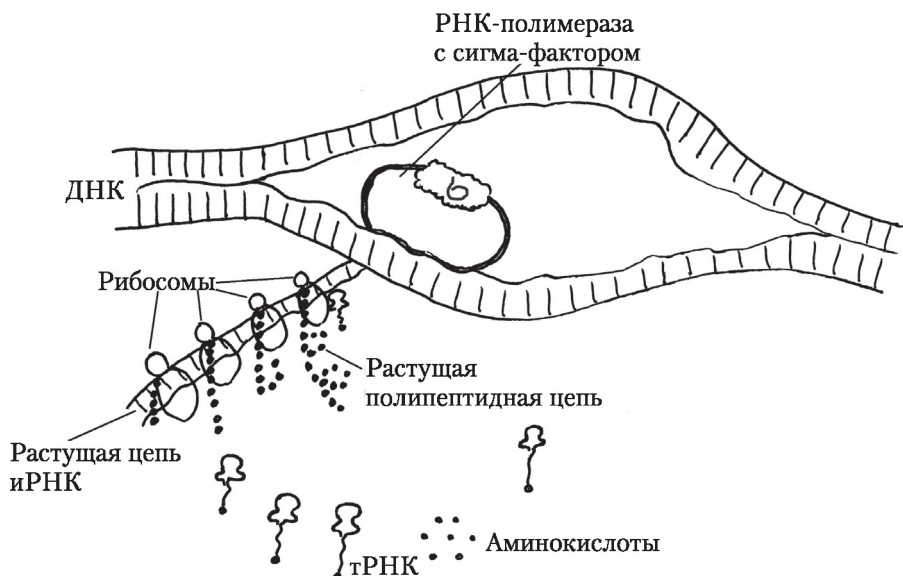
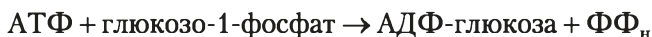


Рис. 8.16. Полисома

в трехмерное образование (третичную структуру), поддерживаемое дисульфидными и гидрофобными взаимодействиями. Объединение нескольких таких молекул приводит к образованию четвертичной структуры. Многие белки проявляют ферментативную активность только при формировании третичной и четвертичной структуры. Трансляция прокариот может начинаться еще до завершения процесса транскрипции.

8.3.3. Синтез полисахаридов

Полисахариды синтезируются из фосфорилированных моносахаров с участием АТФ. При этом в роли переносчика мономера к растущей полисахаридной цепи выступает АДФ:



Для бактерий важным гетерополисахаридом является **пептидогликан (муреин)**, входящий в состав их клеточных стенок. Он состоит из линейных молекул гликана, соединенных между собой поперечно пептидами, содержащими 3–6 аминокислотных остатков (рис. 8.17). Гликан муреина образован остатками N-ацетил-N-глюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты, соединенных β -1,4-связями.

Пептиды содержат чередующиеся L- и D-аминокислоты и часто — мезодиаминопимелиновую 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

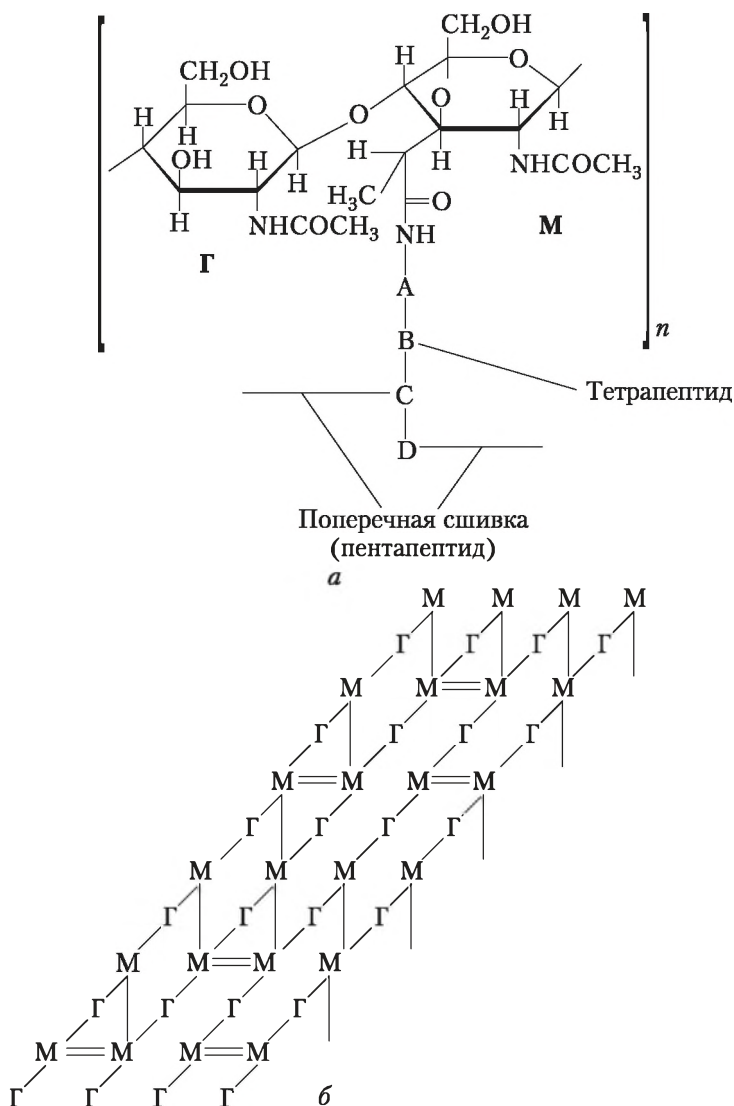


Рис. 8.17. Пептидогликан:

а — структурная единица; б — сеть гетерополисахарида;
Г—N-ацетилглюкозамин; М—N-ацетилмурамовая кислота

синтеза пептидогликана происходят в цитоплазме, где N-ацетилглюкозамин присоединяется к уридиндифосфату (УДФ). В таком 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 уже в цитоплазматической мембране при участии промежуточного гидро-

фобного переносчика — специфического фосфолипида. В ЦПМ 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 клеточной стенке цепь муреина и присоединяется к ней путем трансгликозилирования и транспептидирования. В процессе созревания вновь синтезированного муреина увеличивается число пептидных сшивок. При нарастании клеточной стенки в процессе роста и деления распределение вновь образованного пептидогликана происходит с участием гидролаз муреина.

8.3.4. Биосинтез липидов

Липиды — это группа соединений, разнообразных по химическому составу, но нерастворимых в воде.

Их можно условно разделить на вещества, содержащие жирные кислоты, связанные эфирной связью (нейтральные жиры, фосфолипиды, гликолипиды, липополисахариды, полиалканоаты и т.д.), и вещества, содержащие изопреновые фрагменты (полиизопрены, каротиноиды, стеролы, хлорофиллы, хиноны и т.д.) (рис. 8.18).

Наращивание углеродной цепи синтезируемой жирной кислоты происходит на ацилпереносящем белке (АПБ). Синтез жирных кислот с четным числом атомов углерода начинается с образования ацетил-АПБ и малонил-АПБ и их последующей конденсации. При этом получается ацетоацетил-АПБ, выделяется CO_2 и освобождается одна молекула 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. В аэробных условиях двойные связи образуются в молекуле жирной кислоты путем десатурации уже полностью синтезированных насыщенных жирных кислот, в анаэробных — с помощью реакции дегидратации во время роста цепи жирной кислоты. 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 различные заместители (серин, α -глицерофосфат, инозит и др.), образуя головные группы фосфолипидов. Первые стадии образования **изопреноидных липидов** связаны с последовательной конденсацией трех молекул ацетил-КоА в разных положениях и перегруппировкой полученного соединения. В результате синтезируется разветвленная мевалоновая кислота, которая претерпевает два последовательных фосфорилирования и декарбоксилирование с образованием активированного C_5 -соединения, являющегося предшественником сложных изопреноидных веществ. В основе таких синтезов лежат реакции элонгации линейных изопренов и конденсация их

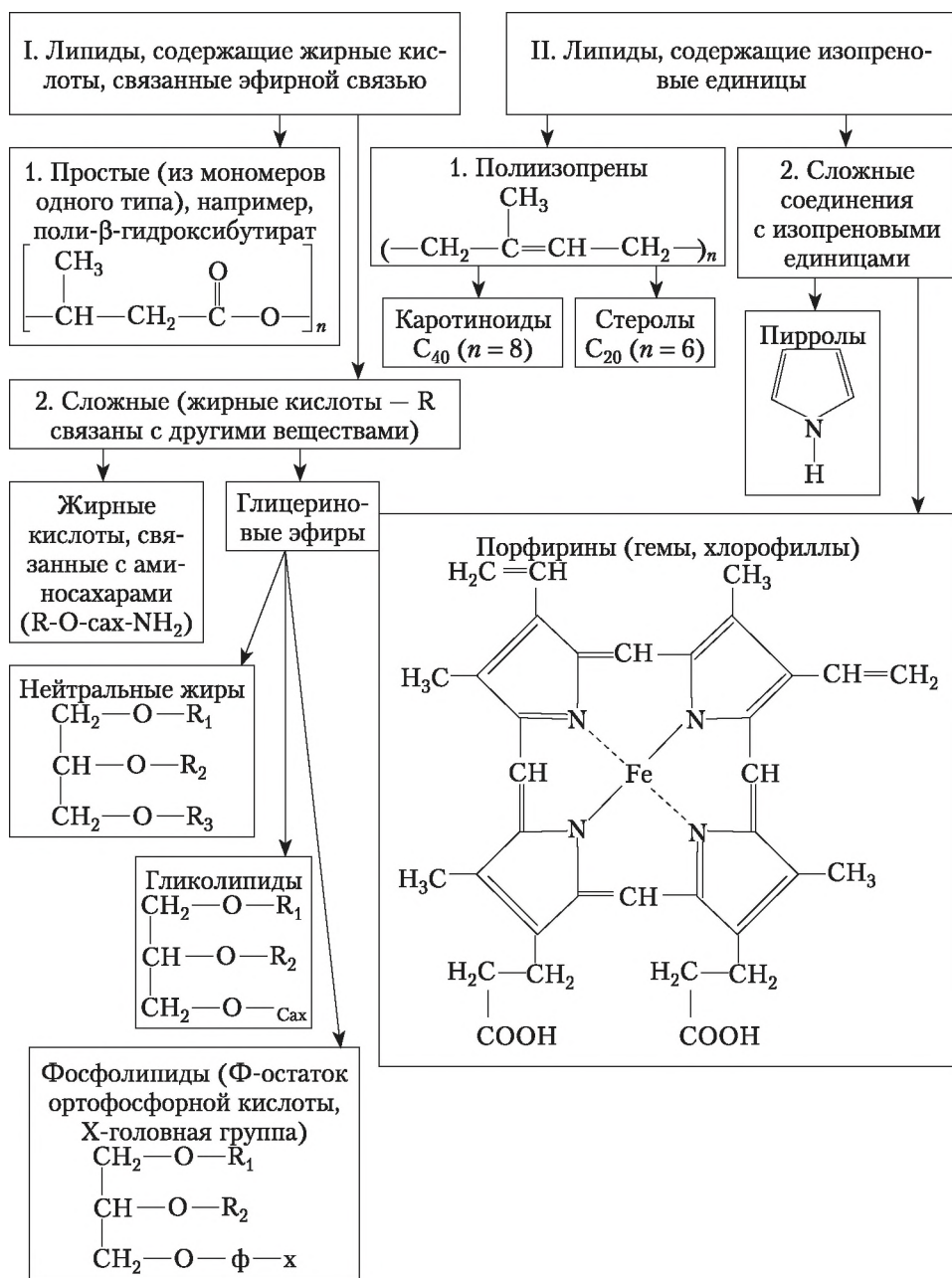


Рис. 8.18. Классификация липидов

молекул с разным числом углеродных атомов в различных положениях («голова к хвосту», «хвост к хвосту» и т.д.). Сложные липиды могут строиться из разнообразных предшественников — жирных кислот, многоатомных спиртов, изопренов, а также моносахаров, аминокислот и аминов. Высшие жирные кислоты синтезируются из активированной уксусной кислоты, предшественником других липидных макромолекул может быть изопреновый фрагмент.

Важной группой изопреноидных соединений являются **порфирины** — 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.

8.3.5. Образование запасных веществ

Запасные вещества — это продукты клеточного метаболизма, как правило, 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 способствуют сохранению осмостаза клеточного содержимого. Наиболее распространенными запасными веществами у микроорганизмов являются полисахариды, липиды (полиалканоаты), волютин.

Запасные липиды прокариот чаще всего представлены поли- β -гидроксимасляной кислотой (**поли- β -гидроксibuтиратом**, ПГБ), которая откладывается при избытке углеродных энергетических субстратов и недостатке азота. В клетках ПГБ присутствует в виде округлых гранул, окруженных белковой мембраной. Запасание ПГБ характерно для микроорганизмов родов *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Zooglea*, *Rhodospirillum* и др. В условиях голодания распад гранул ПГБ происходит за счет их гидролиза при участии специфической деполимеразы.

Микроорганизмы запасают гликогено- или крахмалоподобные полисахариды при избытке источника углерода и энергии, а также недостатке азота в виде сферических или неправильной формы гранул. Полисахариды построены из остатков D-глюкозы, соединенных разными связями. **Гликогеноподобные** запасные **полисахариды** характерны для дрожжей, бактерий кишечной группы, стрептококков и др., широко распространены. **Крахмалоподобный** полисахарид **гранулеза** присущ более узкой группе микроорганизмов (например, клостридиям).

Накопление **волютина** широко распространено среди разных групп микроорганизмов (например, *Spirillum*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*) и происходит в среде, богатой фосфатами. Волютиновые 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 аноксигенные 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.

8.3.6. 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. В отличие от синтеза первичного метаболита, который происходит одновременно с ростом и размножением культуры, для продуцента вторичных метаболитов (рис. 8.19) принято говорить о **трофофазе** (когда культура растет и размножается) и **идиофазе** (когда рост замедляется или останавливается и начинается синтез продукта).

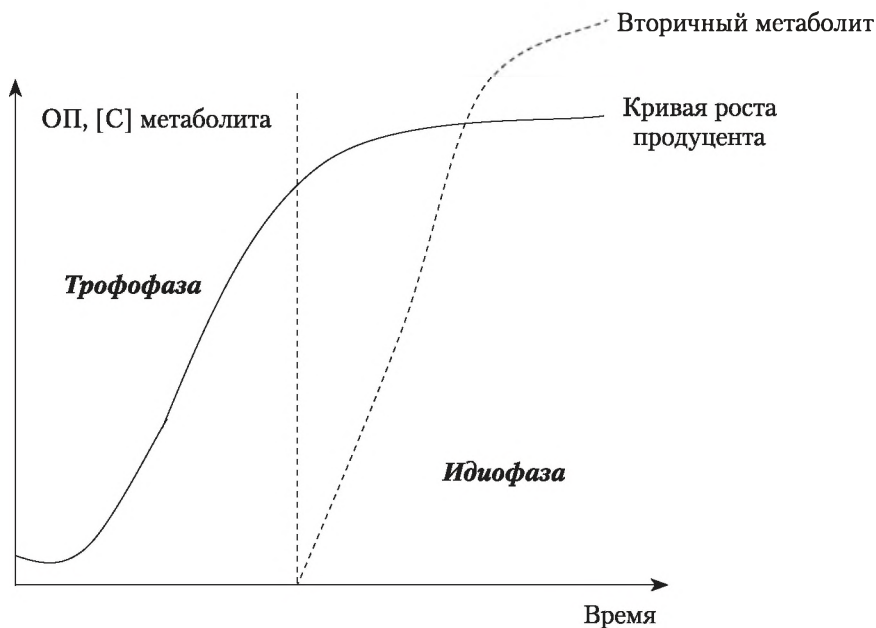


Рис. 8.19. Рост культуры и образование ею вторичного метаболита

Механизмы переключения путей метаболизма с первичного на вторичный не ясны. Многие вторичные метаболиты имеют химическую структуру, необычную для биологической материи, однако их образование берет начало от интермедиатов первичного метаболизма (рис. 8.20).

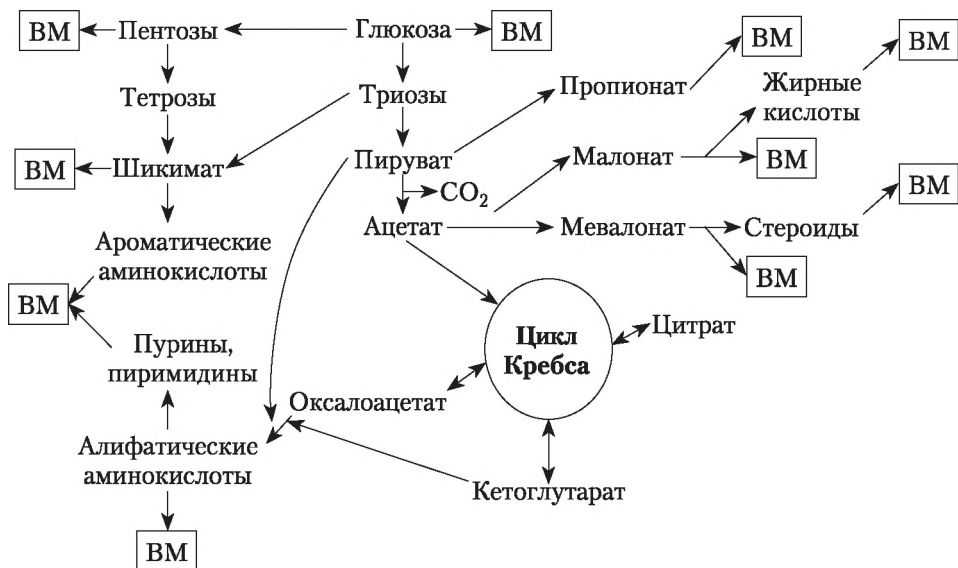


Рис. 8.20. Связь первичного и вторичного метаболизма

Известны четыре класса биосинтетических реакций, «уводящих» интермедиат на путь вторичного метаболизма:

- 1) преобразование первичного метаболита в специфический предшественник;
- 2) реакции модификации или активации;
- 3) полимеризация и конденсация;
- 4) поздние реакции модификации.

К вторичным метаболитам причисляют антибиотики, токсины, иммунодепрессанты и стимуляторы, а также некоторые запасные вещества (поли- β -алканоаты). Эти соединения относятся к разнообразным классам органических веществ (аминоциклитолы, кумарины, эпоксиды, нерибосомальные пептиды, полиены, пирролы, терпеноиды, тетрациклины, поликетиды, изопреноиды, стероиды, гиббереллины, фитоалексины и т.д.). 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.

Резюме

Осуществление реакций построения сложных молекул невозможно без постоянного притока энергоемких молекул, которые образуются при распаде питательных веществ, поглощенных клеткой. Одни и те же питательные органические вещества могут использоваться как строительные блоки и как источники энергии. Многие интермедиаты катаболизма отводятся в реакции биосинтеза. В нормальных активно растущих клетках процессы анаболизма и катаболизма находятся в равновесии.

Источником углерода для автотрофов служит CO_2 , для гетеротрофов — органические соединения. У микроорганизмов возможности автотрофной ассимиляции углекислого газа значительно шире, чем у высших растений. Наряду с циклом Кальвина микроорганизмы имеют ряд специфических циклических путей (цикл Арнона, глиоксилатный цикл, I и II циклы Берга), а также нециклический ацетил-КоА-путь. Гетеротрофы фиксируют углекислый газ как дополнительный источник углерода. Другие одноуглеродные соединения могут быть амфиболитами и используются метилотрофами. При росте микроорганизмов на субстратах, отличных от сахаров, они сами синтезируют глюкозу путем глюконеогенеза.

В конструктивных целях микроорганизмы способны использовать молекулярный азот, аммоний, нитрит, нитрат, гидроксилламин, метиламины, аминокислоты, мочевины, пурины, пиримидины, белки. Переводить молекулярный азот в его восстановленную форму способны только прокариоты. Под азотфиксацией понимается способность ряда бактерий и архей ферментативно восстанавливать атмосферный N_2 до аммония (с обязательным образованием водорода). Полученный аммоний направляется на биосинтез азотсодержащих веществ. Азотфиксаторы бывают симбиотические и свободноживущие. Нитрогеназа у разных микроорганизмов имеет одинаковое строение и чрезвычайно чувствительна к молекулярному кислороду. Аэробы сталкиваются с проблемой защиты нитрогеназы от кислорода. Если в среде есть NH_4^+ , синтез нитрогеназы репрессируется. Восстановление N_2 требует значительных затрат энергии и восстановительных эквивалентов. Нитрогеназа получает электроны и протоны непосредственно от низкопотенциального переносчика ферредоксина. Первым свободным продуктом является аммиак. При фиксации азота всегда выделяется молекулярный водород. Микроорганизмы, как и растения, потребляют нитрат и нитрит в процессе ассимиляционной нитратредукции. Источником аммония для микроорганизмов может служить мочевина, разлагаемая ферментом уреазой на углекислый газ и аммиак. У микроорганизмов обнаружено несколько систем ассимиляции NH_4^+ . Это аминирование непредельных жирных кислот, восстановительное аминирование кетокислот, образование амидов и карбомилофосфата и переаминирование.

Большинство микроорганизмов способно к восстановлению окисленных соединений серы путем ассимиляционной сульфатредукции. Сложные соединения образуются при участии фосфорилированного комплекса сульфата с АМФ.

Микробные превращения фосфоросодержащих веществ и включение фосфора в собственные вещества клеток обычно не приводят к изменению его валентности.

Для осуществления реакций ассимиляции микроорганизмы вынуждены активно «добывать» железо с помощью сидерофоров или извлекать из готовых железосодержащих органических соединений. Запасание соединений железа осуществляется путем откладывания нерастворимых гидрооксидов железа (III). Избыточное накопление двухвалентного железа в клетке приводит к образованию токсичных активных форм кислорода.

Предшественниками основных органических соединений являются промежуточные продукты катаболизма, дающие их углеродные скелеты. Биополимеры клетки относятся к четырем классам макромолекул: нуклеиновым кислотам, белкам, полисахаридам и липидам. Они образуются из низкомолекулярных органических веществ, соединяемых в цепь или сеть. Образование биополимера начинается с синтеза активированных предшественников (мономеров), присоединенных к молекулам-переносчикам. При активации расходуется энергия АТФ. Молекулы-переносчики доставляют мономеры к растущей полимерной цепи. Образование ДНК осуществляется путем матричного синтеза в процессе репликации. Биосинтез РНК происходит в процессе транскрипции при помощи ферментов РНК-полимераз. Матрицей для транскрипции служит одна из цепей ДНК, а предшественниками — рибонуклеотиды. Биосинтез белков осуществляется в процессе трансляции на рибосомах и требует присутствия предшественников (аминокислот), матрицы (молекулы иРНК), ферментов и специфического переносчика (тРНК). Полисахариды синтезируются из моносахаров с участием АТФ в роли переносчика мономера. Синтез пептидогликана начинается в цитоплазме, продолжается внутри ЦПМ и заканчивается присоединением к растущей цепи муреина вне клетки.

Запасные вещества образуются, как правило, при избытке питательных веществ в среде и используются в условиях голодания или в период привыкания к новой среде для обеспечения клеток энергией и необходимыми элементами. Наиболее распространенными запасными веществами у микроорганизмов являются полисахариды, липиды (полиалканоаты), волютин.

Каждый вторичный метаболит производится относительно ограниченным числом видов при определенных условиях роста и часто его образование зависит от состава питательной среды. Все вторичные метаболиты получают из первичных продуктов обмена. У продуцента вторичных метаболитов рост и синтез разнесены во времени.

Практикум

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Проанализируйте распространенность в мире микробов разных путей ассимиляции CO_2 .
2. Зачем гетеротрофы фиксируют углекислый газ?
3. Назовите основные пути ассимиляции углекислоты микроорганизмами. Какое значение в метаболизме микроорганизмов имеет реакция Вуда — Веркмана?
4. В чем особенность ассимиляции углерода у метилотрофов?
5. В каких формах у микроорганизмов присутствуют такие элементы, как азот, фосфор, сера, железо?
6. Какое значение имеет процесс азотфиксации?
7. Как функционирует нитрогеназный комплекс и насколько универсально его строение?
8. Перечислите известные способы защиты нитрогеназного комплекса от кислорода.
9. Сравните возможности использования соединений азота прокариотами и эукариотами.

10. В чем специфика использования микроорганизмами соединений железа для биосинтезов?
11. Какие промежуточные продукты путей катаболизма служат предшественниками для синтеза основных органических соединений у микроорганизмов?
12. Какие биополимеры образуются путем матричного синтеза?
13. Каковы основные этапы синтеза биологических полимеров у микроорганизмов?
14. Когда и как в клетках микроорганизмов образуются и расходуются запасные вещества?
15. Назовите особенности вторичного метаболизма и перечислите наиболее известные вторичные метаболиты микроорганизмов.

Семинар 1

Хемосинтез и фотосинтез прокариот

Семинар рекомендуется проводить в форме докладов и презентаций студентов и последующего их обсуждения. При подготовке материала студенты должны руководствоваться соответствующим разделом учебника как планом, дополненным конкретными примерами из монографий и оригинальных статей в научных микробиологических журналах, найденных по ключевым словам, а также из рекомендованной литературы.

Лабораторная работа 1

Получение накопительных культур микроорганизмов с разными способами анаболизма

Цель работы: освоить технику постановки накопительных культур анаболически различных групп микроорганизмов, определить для них элективные условия и проанализировать различия в их конструктивном метаболизме.

1.1. Получение накопительной культуры свободноживущих аэробных азотфиксаторов.

Для накопления аэробных азотфиксирующих бактерий (обычно представителей родов *Azotobacter* и *Beijerinckia*) применяют среду Эшби, не содержащую связанного азота, следующего состава (г/л): маннит — 20,0; K_2HPO_4 — 0,2; $MgSO_4$ — 0,2; $NaCl$ — 0,2; K_2SO_4 — 0,1; $CaCO_3$ — 5,0, агар — 20,0, вода дистиллированная. Среду выдерживают на кипящей водяной бане до расплавления агара и разливают в стерильные чашки Петри. После застывания среды стеклянным капилляром, смоченным в воде, раскладывают на поверхность среды в чашке 15–25 комочков почвы величиной с булавочную головку на расстоянии 1,5–2,0 см друг от друга (под дно чашки для удобства можно подложить трафарет). Чашку Петри закрывают и ставят во «влажную камеру» (например, в эксикатор, на дне которого налита вода слоем 1–2 см). «Влажную камеру» помещают в термостат (30°C) на 3–5 сут. Вместо агара в качестве уплотнителя среды можно использовать силикагель. В этом случае готовят 10-кратно концентрированную среду Эшби. Этой средой (2–3 мл на чашку) пропитывают пластинки силикагеля, подсушивают их 10–15 мин при приоткрытых крышках в сушильном шкафу (при 60°C), остужают и затем раскладывают комочки почвы. По окончании инкубации проверяют наличие слизистых

(при длительном росте часто окрашенных в коричневый цвет) полупрозрачных колоний неправильной формы вокруг комочков почвы на чашках. Накопительную культуру микроскопируют методом негативного контрастирования с тушью и отмечают наличие толстых ватообразных слизистых капсул у мелких палочковидных клеток бактерий.

1.2. Получение накопительной культуры свободноживущих анаэробных азотфиксирующих бактерий.

Для накопления бактерий этой группы используют среду Виноградского следующего состава (г/л): глюкоза — 20,0; K_2HPO_4 — 1,0; $MgSO_4$ — 0,5; $NaCl$ — 0,5; $MnSO_4$ и $FeSO_4$ следы; $CaCO_3$ — 20,0, вода водопроводная. В высокие пробирки вносят небольшое (0,5–1,0 г) количество почвы, наливают среду Виноградского, оставляя воздушное пространство в 1 см между пробкой и средой, и пастеризуют в течение 10 мин при 80°C в водяной бане. Затем пробирки помещают в термостат (30°C) на 7 сут. Как правило, в таких условиях вырастают клостридии, в основном, *Clostridium pasteurianum*. О получении накопительной культуры азотфиксирующих клостридий свидетельствуют газовыделение и запах масляной кислоты (контролем служит исходная стерильная среда). При микроскопировании (пробу следует отбирать из нижней части пробирки) препарата «раздавленная капля» и фиксированного окрашенного препарата обнаруживают подвижные палочки, образующие эндоспоры, и отмечают тип спорообразования. В клетках бактерий выявляют характерные гранулы крахмалоподобного вещества (гранулезы). Для этого к капле суспензии клеток на предметном стекле добавляют каплю раствора Люголя. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют с объективом 40X. Включения гранулезы окрашиваются в синий цвет.

1.3. Получение накопительной культуры уробактерий.

Для накопления бактерий, способных разлагать мочевины с помощью уреазы согласно уравнению



используют мясо-пептонный бульон (МПБ) с 10%-й мочевиной. Данную среду разливают в обычные пробирки (по 5–6 мл) и инокулируют небольшим количеством навоза. Пробирки помещают в термостат (30°C) на 7 сут. Развитие уробактерий (обычно *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae* или *Proteus vulgaris*) приводит к повышению значений pH среды до 9–10, при которых большинство других бактерий, изначально содержащихся в навозе, не растет. После инкубации проверяют рост накопительной культуры уробактерий по выделению аммиака и подщелачиванию среды (контролем служит исходная стерильная среда). При микроскопировании накопительной культуры с фазово-контрастным устройством в препарате «раздавленная капля» отмечают морфологические особенности выросших бактерий, их подвижность и наличие в клетках эндоспор.

Глава 9

РЕГУЛЯЦИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У МИКРООРГАНИЗМОВ

После изучения данной главы студент должен:

знать

- особенности регуляции метаболизма у различных микроорганизмов;

уметь

- объяснить различия разных уровней регуляции;

владеть

- навыками контроля активности ферментов микроорганизмов.
-

9.1. Способы регуляции микробного метаболизма

9.1.1. Основные уровни регулирования

Для существования и функционирования живых клеток важна не только регуляция активности отдельных путей метаболизма, но и координация деятельности этих путей. Без адекватного контроля происходит дезорганизация метаболизма и, в конечном итоге, гибель клетки. Задача регуляторных механизмов необычайно сложна. Все пути метаболизма должны регулироваться и координироваться так эффективно, чтобы все 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 непрерывно меняется, то регуляторные процессы должны постоянно соответствовать новым условиям. Регуляция важна для поддержания баланса между энергодающими и синтетическими реакциями в клетке.

Поток углерода и энергии через тот или иной путь может регулироваться тремя основными способами:

- 1) локализацией метаболитов и ферментов в разных частях клетки;
- 2) стимуляцией или ингибированием активности определенных ферментов, позволяющей быстро менять путь метаболизма;
- 3) контролем количества молекул фермента у микроорганизмов (обычно на уровне транскрипции). Этот способ более медленный, поскольку ферменты синтезируются только тогда, когда в них есть необходимость.

9.1.2. Пространственное и временное разделение ферментов и метаболитов

Такой способ регуляции достигается, в основном, за счет создания внутри клетки замкнутых участков, ограниченных мембранами, или компарт-

ментализации, т.е. распределения ферментов и метаболитов в разных клеточных структурах или органеллах. Компарментализация особенно распространена у эукариотических микроорганизмов, у которых имеется значительное число органелл с собственными мембранами. Например, окисление жирных кислот локализовано в митохондриях, тогда как синтез жирных кислот происходит в цитоплазматическом матриксе. Компарментализация делает возможным одновременное протекание разнонаправленных процессов и отдельное управление каждым процессом, например, катаболических и анаболических путей. Активность конкретного 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.

9.1.3. Контроль активности ферментов

Второй способ регуляции осуществляется путем увеличения (**стимуляции**) или подавления (**ингибирования**) активности ферментов. Это быстрый путь изменения метаболизма клетки. Для контроля активности уже имеющихся ферментов существует несколько основных механизмов. **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. 9.1).

Каталитический и регуляторный сайты

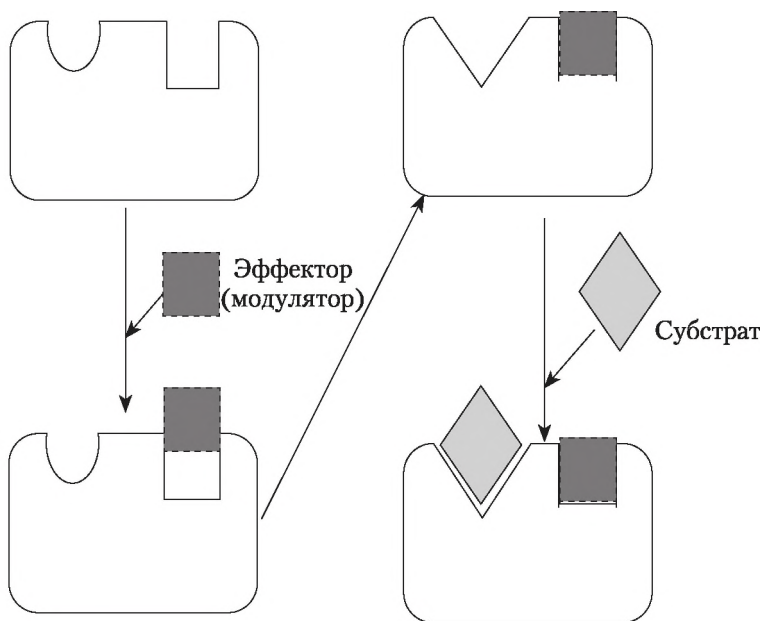


Рис. 9.1. Аллостерическая регуляция активности фермента

Так, для аспартаткарбоамилтрансферазы из *E. coli* ЦТФ (конечный продукт биосинтеза пиримидинов) является негативным эффектором, а АТФ — позитивным эффектором. Эффекторы изменяют K_m , но не максимальную скорость реакции (рис. 9.2).

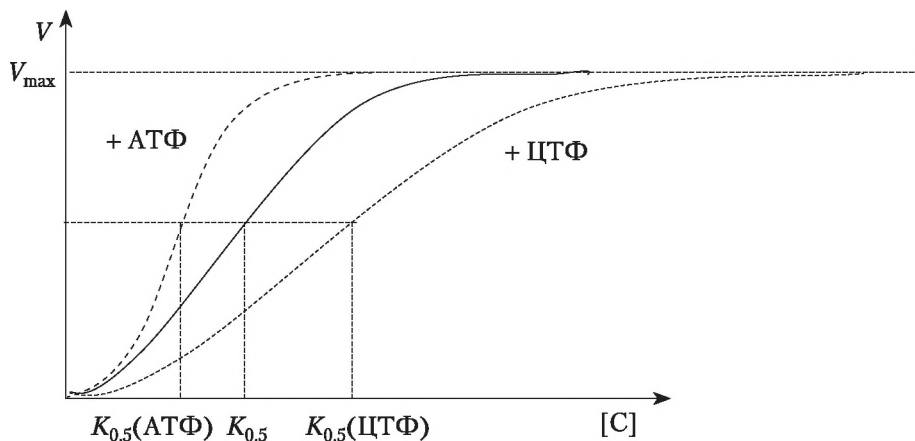


Рис. 9.2. Влияние негативного (ЦТФ) и позитивного (АТФ) эффекторов на кинетические характеристики ($V_{\max}$ и K_m) аспартаткарбоамилтрансферазы из *E. coli*

Ковалентная модификация ферментов — это обратимый процесс, заключающийся в ковалентном связывании или удалении определенной группы, что изменяет активность фермента. Например, для активирования гликогенфосфорилазы из *Neurospora crassa* необходима ковалентная модификация молекулы фермента (рис. 9.3).

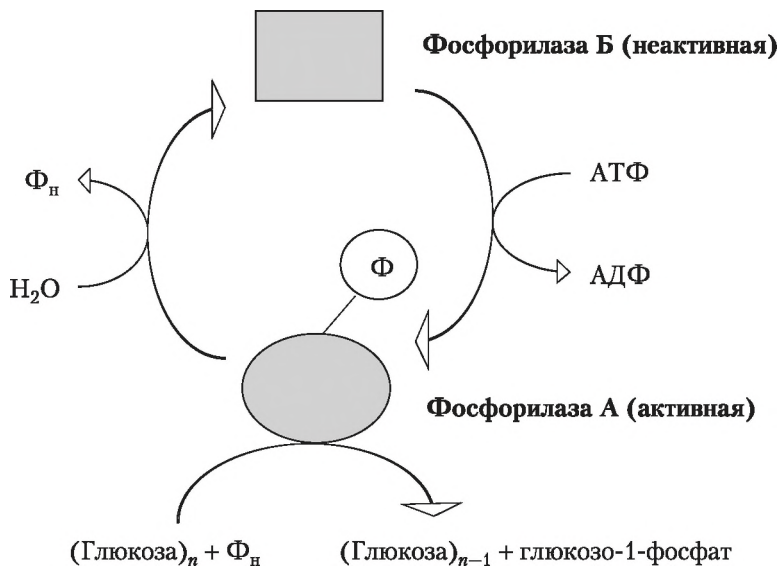


Рис. 9.3. Ковалентная модификация гликогенфосфорилазы из *Neurospora crassa*

У *E. coli*, наоборот, модифицированная форма глутаминсинтетазы менее активна.

Каждый биохимический 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.

9.1.4. Управление синтезом ферментов

Ферменты, синтезирующиеся независимо от условий выращивания микроорганизма и наличия субстрата в среде, называются **конститутивными** (например, ферменты утилизации глюкозы), а те, которые синтезируются при наличии определенного доступного субстрата, называются **индуцибельными** (например, ферменты утилизации лактозы у *E. coli*, ферменты деградации аминокислотных соединений у *Pseudomonas*). Этот способ управления метаболизмом более медленный: индуцибельные ферменты синтезируются только тогда, когда в них есть необходимость.

Широко известный механизм управления синтезом нужного фермента — это **индукция и репрессия** (рис. 9.4). 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.

Для связывания промотора и инициации транскрипции РНК-полимераза нуждается в **сигма (σ)-факторе** (небольшой молекуле белка). 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 ферменту узнавать специфическую последовательность и транскрибировать именно эти гены. Замена сигма-фактора немедленно изменяет экспрессию генов. Бактериофаги часто используют сигма-факторы для контроля синтеза иРНК в своем жизненном цикле. Этот регуляторный механизм распространен как среди грам-отрицательных, 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.

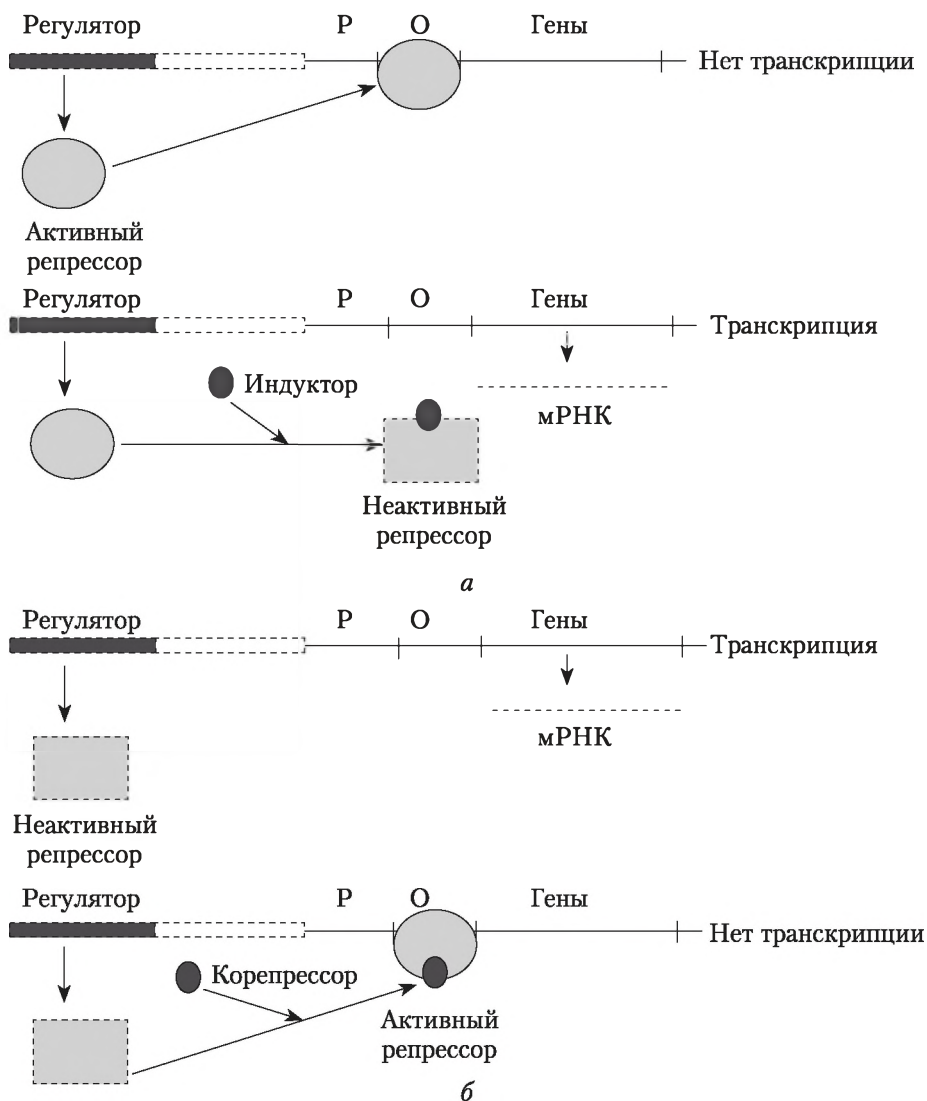


Рис. 9.4. Способы управления синтезом фермента:

a — индукция; *б* — репрессия; Р — промотор; О — оператор

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*) и цАМФ (рис. 9.5). Если *E. coli* растет в среде с глюкозой и лактозой, то наблюдается явление **диауксии**: сначала используется вся глюкоза, а затем после короткого лаг-периода начинает потребляться лактоза. Ферменты катаболизма глюкозы конститутивны, поэтому CAP-белок на них не влияет. Когда бактерии растут на глюкозе, уровень цАМФ падает, что приводит к дезактивации CAP-белка и *lac*-оперон не экспрессируется (**катаболитная репрессия**).

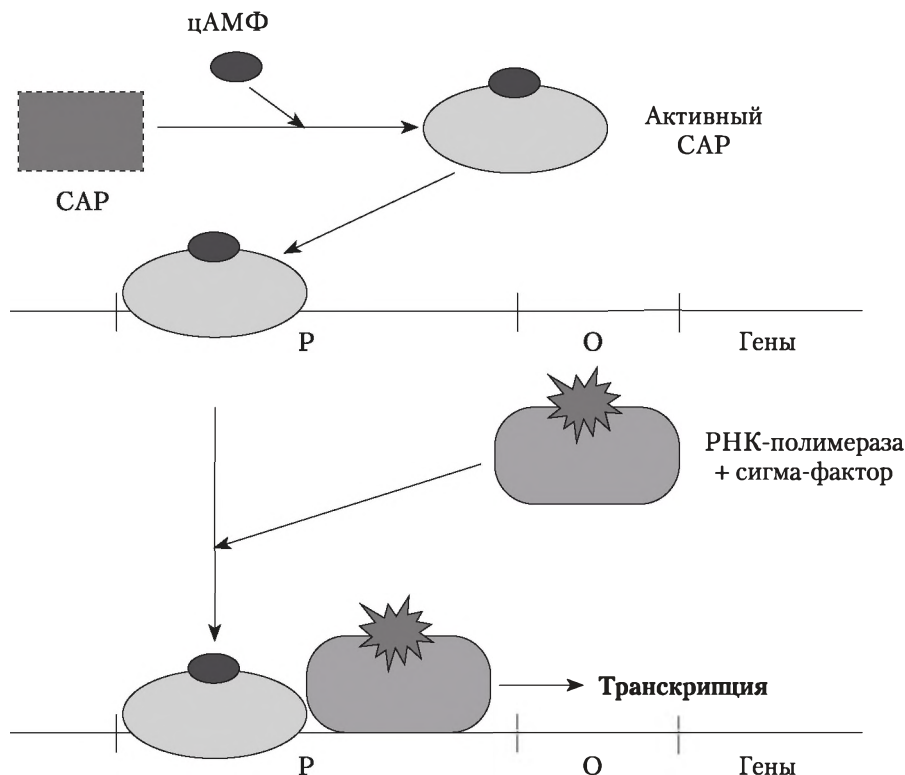


Рис. 9.5. Регуляция *lac*-оперона *E. coli* CAP-белком и цАМФ:

Р — промотор; О — оператор

Уменьшение количества цАМФ может быть следствием влияния ФЭП-фосфотрансферазной системы (см. рис. 6.3) на активность аденилатциклазы. Фосфорилированная форма фермента ЕЗ 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 ЕЗ мало, аденилатциклаза неактивна и уровень цАМФ падает. К тому же преобладающая нефосфорилированная форма ЕЗ 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.

Бактерии также могут регулировать транскрипцию с помощью механизма **аттенуации** (рис. 9.6). 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». РНК-полимераза диссоциирует с ДНК и транскрипция прекращается. Если триптофана и, соответственно, 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 и «терминаторная шпилька» не образуется. Транскрипция продолжается, и транскрибируется триптофановый оперон, содержащий структурные гены пяти ферментов биосинтетического пути триптофана.

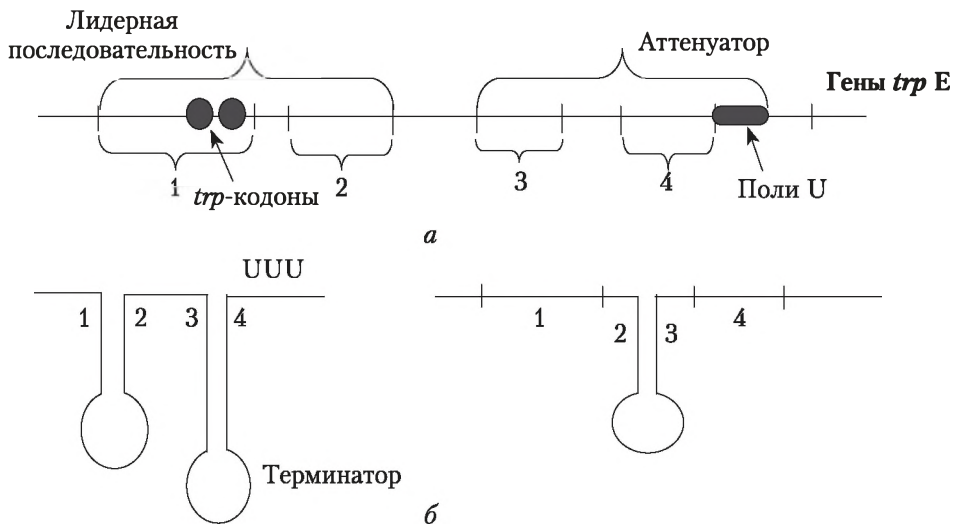


Рис. 9.6. Аттенуация:

а — расположение групп нуклеотидов в ДНК;
б — варианты образования «шпилек» при аттенуации

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 одним механизмом регуляции является контроль 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. Такого рода РНК кодируются антисмысловыми генами (*antisense genes*). Оказалось, что данный способ регуляции широко распространен среди бактерий и вирусов. Такой регуляции могут подвергаться репликация плазмид, синтез белков-поринов, репродукция фага λ .

9.2. Регуляция клеточного цикла

Одной из интегральных характеристик клеточного метаболизма является **энергетический заряд клетки**. Он рассчитывается по формуле

$$\frac{[\text{АТФ}] + [1/2\text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

и теоретически может колебаться от 1 (когда пул аденозинфосфатов представлен только АТФ) до 0 (когда в клетке имеется только АМФ). В растущей культуре значение энергетического заряда составляет около 0,8. При значении энергетического заряда < 0,5 клетки погибают. АТФ является отрицательным, а АМФ и АДФ — положительными эффекторами энергозатрачиваемых процессов. Можно сказать, что интенсивность катаболических процессов регулируется внутриклеточным содержанием АТФ.

Клеточным циклом называют промежуток времени от момента образования новой клетки до следующего деления.

События, составляющие клеточный цикл, наиболее изучены у *E. coli*. Молодая клетка, растущая с постоянной скоростью, удваивает свою длину, не изменяясь в диаметре, а затем делится на две клетки равного размера путем поперечного деления. Так как каждая дочерняя клетка должна обладать хотя бы одной копией генетического материала, репликация ДНК и клеточное деление тесно скоординированы. Если ингибировать репликацию ДНК токсинами или с помощью мутаций, то клеточное деление тоже блокируется, при этом клетки продолжают удлиняться, образуя филаменты. У *E. coli* при 37°C деление обычно происходит примерно 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. Репликация ДНК и клеточное деление вместе занимают приблизительно 40 мин.

Таким образом, 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.

Следующий цикл репликации начинается не сразу, так как родительская нить ДНК метилируется и становится неактивной. Для запуска репликации ДНК бактерия должна достигнуть определенного порогового размера или начальной массы. 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.

Таким образом, регуляция бактериального клеточного цикла очень сложна и включает в себя несколько взаимодействующих регуляторных механизмов.

Резюме

Для существования и функционирования живых клеток важна не только регуляция активности отдельных путей метаболизма, но и координация деятельности этих путей. Микроорганизмам необходима эффективная регуляция обмена для быстрого подстраивания жизнедеятельности к новым условиям. Регуляция важна для поддержания баланса между энергодающими и синтетическими реакциями в клетке.

Поток углерода и энергии через тот или иной путь может регулироваться путем компартментализации, управления активностью уже готовых ферментов и контролирования уровня их синтеза. Распределение ферментов и метаболитов в разных клеточных структурах или органеллах делает возможным одновременное протекание разнонаправленных процессов и отдельное управление каждым процессом. Быстрым способом изменения метаболизма клетки является контроль активности ферментов (стимуляция или ингибирование) в виде аллостерической регуляции или ковалентной модификации. Фермент «узкого места» биохимического пути обычно подвергается ингибированию конечным продуктом. Регуляция сильно разветвленных путей основана на наличии изоферментов. Ферменты, образующиеся независимо от условий выращивания микроорганизма и наличия субстрата в среде, называются конститутивными, а те, что синтезируются при наличии определенного доступного субстрата, называются индуцибельными. Управление синтезом нужного фермента является более медленным процессом и происходит в разнообразных формах (индукция-репрессия, синтез сигма-факторов, аттенуация, образование антисмысловых РНК).

Одной из интегральных характеристик клеточного метаболизма является энергетический заряд клетки, значение которого в растущих клетках составляет около 0,8. АТФ является отрицательным, а АМФ и АДФ — положительными эффекторами энергодающих процессов.

Репликация ДНК и клеточное деление тесно скоординированы. После завершения репликации генетический материал должен быть распределен между дочерними клетками. Для разделения копий ДНК необходимо участие белков ParA, ParB, MukB и некоторых других. 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 инициации образования перегородки важно наличие FtsZ-белка и формирование им z-кольца. Следующий цикл репликации начинается после достижения клеткой определенного порогового размера, деметилирования ДНК и присоединения белка DnaA к сайту начала репликации.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Каково значение процессов регуляции в жизни микробной клетки?
2. Перечислите основные способы регуляции микробного метаболизма.
3. Какой способ регуляции позволяет быстро менять путь метаболизма?
4. Какие события должны быть скоординированы для правильного прохождения клеточного цикла?

Список литературы

1. Брюханов, А. Л. Молекулярная микробиология : учебник для вузов / А. Л. Брюханов, К. В. Рыбак, А. И. Нетрусов. — М. : Издательство Московского университета, 2012.
2. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках : учебник для вузов. 6-е изд. — М. : Изд-во МГУ ; Наука, 2004.
3. Кондратьева, Е. Н. Автотрофные прокариоты. — М. : Изд-во МГУ, 1996.
4. Плакунов, В. Г. Основы энзимологии. — М. : Логос, 2002.
5. Прист, Ф. Внеклеточные ферменты микроорганизмов. — М. : Мир, 1987.
6. Протисты: Руководство по зоологии Т. 1 / под ред. А. Ф. Алимова. — СПб. : Наука, 2000.
7. Современная микробиология. Прокариоты. В 2 т. / под ред. Дж. Ленгелер [и др.]. В — М. : Мир, 2005.
8. Умаров, М. М. Ассоциативная азотфиксация. — М. : Изд-во МГУ, 1986.
9. Brock's Biology of Microorganisms. — 12th ed. — 2011. URL: <http://www.aw-bc.com/brock>.
10. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria / M. Dworkin, Ed.-in-Chief. — 3rd ed. — New York: Springer, V. 1—7, 2007. URL: <http://www.springerlink.com>.

Интернет-ресурсы

1. Microbial images. URL: <http://www.sciencephoto.com>, <http://www.bioscience.heacademy.ac.uk/imagebank>, http://www.itameriportaali.fi/en/galleria/galleriakuvat/en_GB/algae
2. Michigan State University (MSU), Microbiology Department. URL: <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zoutline.html>
3. Microbe's news ASM. URL: <http://www.microbemagazine.org>, <http://www.microbeworld.org>

Предметный указатель

Автоклавирование.....	46
Автотрофы	134
Агар.....	38
Адаптация.....	92
Адгезины.....	77
Азотфиксаторы (дiazотрофы).....	20, 266
Азотфиксация	266
Акинеты	83, 231
Аксиальная нить	86
Акцептор электронов	141
Аллостерическая регуляция	294
Аммонификация	185
Амфиболизм.....	133
Анаболизм.....	133, 261
Антибиотики	21, 125
стратегического запаса.....	125
Антимикробные агенты.....	123
бактериостатические	123
бактерицидные	123
Антипорт.....	140
Антисептика	19
Антисептики.....	22
Асептика	20
Антисмысловые РНК.....	299
Ассимиляционная нитритредукция (аммонификация нитрата)	172
Ассимиляция аммония	272
Аттенуация	298
Ауксотрофы.....	36
Ацетил-КоА-путь (Вуда – Льюнгдала)	169, 265
Аэробные аноксигенные бактерии (эритробактерии).....	236
Аэробы облигатные.....	16
Байоциты.....	90, 231, 233
Бактериальный газовый фильтр.....	199, 200
Бактериолизины	24
Бактериородопсин (ретиаль).....	240
Бактериофаги.....	62
Бактериофагия	24

Бактериохлорофилы (Бхл).....	215
Бактероиды.....	267
Белковая оболочка споры.....	103
Бинарное деление.....	90
Биогаз	183
Биогенные элементы.....	35
Биогидрометаллургия	206
Биолюминесценция	187
Биопленка.....	78
Биохимическое единство жизни	23, 141
Бифидобактерии.....	161, 162
Ботулин.....	168
Брожение.....	156
бутандиоловое.....	164, 165
гомоацетатное	168
маслянокислое и ацетонобутиловое	165
молочнокислое.....	159, 183
гетероферментативное	160
гомоферментативное.....	159
пропионовокислое.....	162
смешанное (муравьинокислое).....	164
спиртовое.....	157
Бульон-сусло-агар (БСА).....	38
Вакцина.....	18
Вакцинация	18
Везикулы	267
Вибрионы	81
Вирусология.....	21
Вирусы.....	21, 62
«Висячая капля»	34
Включения	68
Внешняя (наружная) мембрана	75
Волютиновые гранулы (волютин, полифосфаты).....	55, 69, 286
Восстановительные эквиваленты	144
Время генерации.....	116
Вторичные метаболиты.....	287
Вынос азота из почвы.....	172
Выщелачивание металлов	206
Газовая гангрена.....	168
Газовые вакуоли (аэросомы).....	69
Галоархеи (галобактерии).....	239
Гелиобактерии	229
Генетический код.....	280
Генетически модифицированные организмы (ГМО)	106
Генетически модифицированные микроорганизмы (ГЕМОМ).....	106

Генные острова (ГО)	67
Генотип	91
Геосмин	236
Гетеротрофы	134
Гетероцисты	83, 230
Гидрогеназа	154, 155, 210
Гидрогенлиаза	155
Гидроксипропионатный путь	228
Гидролитики	134, 168
Гликокаликс	80
Гликолиз	151, 183
Глиоксилатный шунт	154
Глюконеогенез	265
Гомоацетогены	168, 178
Гонидии	90
Гормогонии	90, 231
Гранулеза	286
Гуморальная теория иммунитета	24
Двухфазность	166
Дегидрогеназы	149
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)	64, 277
Денатурация	148
Денитрификация	172
Диауксия	119, 297
Диссипотрофы	134
Диссоциация	96
Дифференциация	83, 100
Диффузия	138
облегченная	138
пассивная	138
Донор электронов	141
Дыхание	148
аэробное	183
анаэробное	148, 170
«железное»	176
карбонатное	178
нитратное	171
серное	175
сульфатное	172
фумаратное	178
Жгутики	84
Желатин	38
Запасные вещества	69, 286
Зеленые бактерии	224
нитчатые (несерные)	227
серные	224

Идиофаза.....	287
Изоферменты.....	296
Иммерсия	31
Ингибирование.....	294
Индукция	296
Инсерционные последовательности (IS-элементы).....	67
Информационные (матричные) РНК (иРНК, или мРНК).....	279
Капсид	62
Капсулы	54, 79
Карбоксисомы	69, 207
Каротиноиды.....	216
Катаболизм	133, 261
Кетодезоксифосфоглюконатный (КДФГ) путь	153
Клеточная стенка.....	73
Клеточный цикл.....	100, 300
Клостридии.....	165
Клубеньки	266
Клубеньковые бактерии.....	266
Ковалентная модификация.....	295
Кокки	81
Коли-индекс	165
Коли-титр.....	165
Колониеобразующие единицы (КОЕ).....	115
Колонии	42
глубинные.....	43
поверхностные	43
Комаммокс	209
Компартментализация.....	293
Компетентность	92
Константа скорости деления	116
Константа скорости роста (удельная скорость роста)	116
Конъюгация.....	91, 94
Копиотрофы	133
Кортекс.....	103
Коферменты	143
Кривая роста	114
Ксенобиотики	136
Культивирование.....	30
непрерывное (проточное).....	119
периодическое.....	116, 118
Культура	30
смешанная	30
чистая.....	30
Культуральные свойства	43
Лаг-фаза.....	119

Латентное состояние (латентные вирусы).....	62
Леггемоглобин.....	267, 269
Лектины.....	267
Лизис.....	62
Лизогенная культура.....	63
Лизогенное состояние.....	62
Лизоцим.....	22, 25
Лиофилизация.....	44
Липиды.....	284
изопреноидные.....	284
Липополисахариды (ЛПС).....	75
Липопротеин (ЛП).....	76
Литический цикл.....	62
Литотрофы.....	134
Люцифераза.....	188
Магнетосомы.....	88
«Магнитная ориентация».....	88
Макроэлементы.....	35
Матричный синтез.....	278
Мезосома.....	65
Мембранный бислой.....	71
Метаболизм.....	60, 133
Метанмонооксигеназа (ММО).....	192
Метаногенез.....	179, 180
ацетокластический.....	180
водородотрофный (гидрогенотрофный).....	179
Метаногены.....	178
Метанотрофы.....	190
Метилотрофия.....	181, 189
Метод накопительных культур.....	21
Микробиологическая петля.....	39
Микробиологическая пипетка.....	39
Микробиология.....	13
ветеринарная.....	14
космическая.....	14
медицинская.....	14
морская.....	14
общая.....	14
почвенная.....	14
природоведческая.....	14
промышленная.....	14
сельскохозяйственная.....	14
частная.....	14
Микробиота.....	161
Микробная биотехнология.....	14

«Микрокультура».....	34
Микроорганизмы.....	13
анаэробные.....	16
аэробные	16
болезнетворные (патогенные)	17
водородные	210
грамотрицательные.....	75
грамположительные	75
карбоксидотрофные.....	212
металлоокисляющие.....	203
метилотрофные	189
нитрифицирующие	206
тионовые	200
Микроскопия.....	32
атомно-силовая.....	33
конфокальная лазерная сканирующая.....	33
люминесцентная	32
темнопольная	32
электронная	32
Микроскопы.....	14, 30
простые.....	14
сложные.....	14
Микроэлементы	35
Миксобактерии	100
Миксотрофия.....	136
Множественная лекарственная устойчивость	125
Множественное деление	90, 231
Молочнокислые бактерии (МКБ).....	158
Мутагены.....	92
Мутации.....	92
Мясо-пептонный бульон (МПБ).....	37
Наследственная изменчивость	92
Негативные красители.....	35
Нейротоксины	236
Некультивируемые формы бактерий.....	123
Несбалансированный рост	122
Нитратредукция	171
ассимиляционная	172, 271
диссимиляционная.....	171
Нитрогеназа.....	266, 270
Нуклеоид.....	59
Обжигание	45
Общее увеличение.....	31
Окисление:	
гетеротрофное аммиака	210

неполное.....	187
полное	186
анаэробное:	
метана	189
аммония (анаммокс)	209
Окислительно-восстановительные реакции.....	141
Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП, Rh).....	143
Окрашивание:	
дифференциальное.....	34, 52
простое.....	34, 52
Оксигеназы	149
Оксидазы	149
Олиготрофы	133
Оперон:	
lux-.....	188
репортерный.....	188
Органеллы.....	59
Органотрофы	134
Осмопротекторы (осмолиты, совместимые растворители)	223, 235, 239
«Отпечаток»	34
Палочки.....	81
Параспоральные тельца	69
Пастеризация	16
Пенициллин	23, 26
Пентозофосфатный путь	151, 235
Пептидогликан (муреин).....	59, 73, 282
Переаминирование	273
Периплазматическое пространство (периплазма)	76
Периодический пересев	44
Пермеазы	138
Пероксисома.....	197
Пили	77
Пиридиннуклеотиды.....	144
Пируватдегидрогеназный комплекс.....	154
Пируватдекарбоксилаза	154
Пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза	154
Пируват:формиат-лиаза	154
Плазмодесмы	230
Плазмолиз/деплазмолиз	72
Планктомидеты.....	209
Плейоморфизм	82, 100
Покровное стекло.....	33
Поли-β-гидроксibuтират (поли-β-гидроксимасляная кислота).....	286
Полисахариды	55, 282
гликогенopodobные.....	55, 286
крахмалopodobные	286

Полисома.....	281
Популяция	30
Порины.....	76, 138
Порфирины	286
Посев.....	39
Правила техники безопасности.....	50
Предметное стекло.....	33
Препараты живых микроорганизмов.....	33
Преспора.....	105
Приготовление мазка	34
Природные термопластики.....	212
Пробиотики	107
Прокаливание	45
Простеки.....	224
Протестические группы	143
Прототрофы	36, 164
Профаг.....	63
Прохлорофиты	231, 234
Псевдомуреин.....	73
Пункт сопряжения	146
Пурпурные бактерии.....	220
несерные.....	220
серные	220
«Пурпурные мембраны»	240
«Раздавленная капля»	33
Реакция Вуда — Веркмана	163, 265
Редукция.....	171
ассимиляционная	171
диссимиляционная.....	171
Репарационные системы	92
Репликация.....	278
Репрессия	296
катаболитная	297
Рибосомальные РНК (рРНК)	279
Рибосомы.....	59, 64, 68, 281
Санитарно-показательные (микро)организмы (СПМ).....	165
Сбалансированный рост	122
Свящиеся бактерии	187
Связывающие белки.....	77, 140
Сигма-фактор.....	296
Сидерофоры	138
Силикагель	38
Симбиоз	242
Симпорт	140
Синтрофы.....	174

Синхронные культуры.....	122
Скольжение	87
Солодовое сусло.....	37
Специфичность	148
Спириллы	81
Спорангий	105
Споруляция	104
Среды:	
жидкие	38
индикаторные	38
натуральные.....	37
синтетические	37
сыпучие	38
универсальные.....	38
элективные.....	38
Стадии фотосинтеза	218
световая.....	218
темновая.....	218
Стационарная фаза	119
Стенка ядра споры	103
Стерилизация	45
облучением.....	48
с помощью газов.....	47
термическая	45
холодная.....	47
Стимуляторы роста.....	267
Стимуляция.....	294
Столбняк	168
Стрептомицин	23
Строматолиты.....	230, 244
Сульфатредукторы	172
Сульфатредукция.....	173
ассимиляционная	273
диссимиляционная.....	173
Сульфидогены	172
«Сухой жар»	45
Таксисы.....	88
аэротаксис	88
магнитотаксис.....	88
фототаксис	88
хемотаксис.....	88
Тейхоевые кислоты.....	74
Теория симбиогенеза	236
Тилакоиды	231
Трансдукция.....	91, 93

Транскрипция	64, 279
Транслокация групп	140
Трансляция	64, 280
Трансмембранный градиент протонов	139, 146
Трансмембранный потенциал	142, 146
Транспозоны (Тп)	67
Транспорт	139
активный	139
вторичный	139
первичный	139
Транспортные РНК (тРНК)	279
Трансформация	91, 92
«Триада Коха»	18
Трофофаза	287
Турбидостат	122
Уксуснокислые бактерии	187
Унипорт	140
Уреаза	272
Урожай	117
Фаги	62
Фаговая конверсия	63
Фагоцитарная теория иммунитета	23
Фаза замедления роста	119
Фаза отмирания	119
Факторы роста	36
Фенотип	91
Ферменты	148
индуцибельные	296
конститутивные	296
Феромоны	96
Ферредоксин (Фд)	154, 216, 226
Физиологические (функциональные) группы	134
Фикобилипротеины	216
Фикобилисома	231
Фиксация	34
Фиксация CO_2	262
автотрофная	262
гетеротрофная	163, 265
Фильтрование	47
Фимбрии	77
Флавопротеиды (ФП)	145
Фосфолипиды	69, 284
Фосфорилирование	142
мембранное	142
окислительное	142

субстратное	142
фотофосфорилирование	142
нециклическое	216
циклическое	216
Фотобактерии	187
Фотокинезис	235
Фотолитоавтотрофия	135
Фотолитогетеротрофия	135
Фотоорганавтотрофия	136
Фотоорганогетеротрофы	135
Фотосинтез	214
аноксигенный	218, 219
оксигенный	218
Фотосистема	215
I (ФС I)	216
II (ФС II)	216
Фототрофы	134
Фотофобная реакция	235
Хемолитоавтотрофия	20, 136, 199
Хемолитогетеротрофы	135
Хемоорганавтотрофия	136
Хемоорганогетеротрофия	135
Хемостат	119
Хемотрофы	134
Хиноны	146
Хлоробии	224
Хлоросомы (хлоробиум-везикулы)	225
Хлорофилы (Хл)	215
Хранение при сверхнизких температурах	44
Хроматическая адаптация	233
Хромосомы	59
Циано-бактериальный мат	235, 244
Цианобактерии	230
Цианофицин	69, 231
Цикл:	
азота	20
Арнона	212, 226, 263
восстановительный дикарбоновых кислот	228
глиоксилатный	228, 263
дикарбоксилатный/4-гидроксипропионатный	264
Кальвина	203, 207, 235, 262
Кребса	154
трикарбоновых кислот (ЦТК)	154
цитрамалатный	223
3-гидроксипропионатный/4-гидроксипропионатный	263

Циста.....	105
Цитоплазма.....	68
Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ).....	69
Цитохромы (цит).....	146
Чехлы.....	79, 230
Штрих.....	43
Эдификаторы.....	236
Экзогидролазы	137
Экзоспориум	103
Экзоферменты	77
Экология микроорганизмов	14
Экономический коэффициент.....	117
Экспоненциальная (логарифмическая) фаза.....	119
Элективные условия	21
Электронтранспортная цепь (ЭТЦ).....	142
Элементарная сера	55, 69, 287
Эндоплазматическая сеть	59
Эндоспоры	54, 101
Эндоцитоз	137
Энергетический заряд клетки	298, 300
Энергетический коэффициент	117
Эритробактерии.....	236
Эукариоты.....	59
Эффект:	
«кворума»	188
Крэбтри	158
Пастера	158
Эффектор	294
Ядро.....	59
Ядро споры.....	103
L-трансформация	77
L-форма.....	77
S-слои.....	80
Z-схема	216, 231