



МЕЖДУНАРОДНАЯ АССОЦИАЦИЯ «АГРООБРАЗОВАНИЕ»

В. Н. КИСЛЕНКО, Н. М. КОЛЫЧЕВ

ВЕТЕРИНАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ И ИММУНОЛОГИЯ

Часть 1. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Допущено Министерством сельского хозяйства Российской Федерации в качестве учебника для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 111201 «Ветеринария»



МОСКВА «Колос» 2006

УДК 619:579(075.8)

ББК 48я73

K44

619:616-097.3(075.8)
579(075.8)

Редактор *Е. В. Ярних*

Рецензенты: академик РАСХН, профессор *А. С. Донченко*; член-корреспондент РАСХН, профессор *Ф. И. Василевский* в кафедре эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы доктор ветеринарных наук профессор *И. И. Гуславский*

Кисленко В. Н., Кольчев Н. М.

К44 Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 1. Общая микробиология. — М.: КолосС, 2006. — 183 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).

ISBN 5—9532—0404—3 (ч. 1)

ISBN 5—9532—0403—5

Представлены основные сведения о месте прокариот среди живых организмов, о морфологии и химическом составе микроорганизмов, об обмене веществ и энергии в микробной клетке. Подробно рассмотрены вопросы генетики, экологии бактерий и патогенности микроорганизмов. Изложены основы биотехнологии.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Ветеринария».

УДК 619:579(075.8)

ББК 48я73

ISBN 5—9532—0404—3 (ч. 1)

ISBN 5—9532—0403—5

© Издательство «КолосС», 2006

ВВЕДЕНИЕ

Микробиология — наука о микроорганизмах. Объектом изучения микробиологии являются микроорганизмы — организмы, размер которых менее 0,1 мм. К микробам относятся некоторые простейшие, одноклеточные водоросли, микроскопические грибы, бактерии, вирусы. Большинство микроорганизмов невидимы невооруженным глазом, так как их размеры обычно составляют несколько микрометров или даже нанометров, т. е. находятся за пределами разрешающей способности человеческого глаза. Для их исследования применяют оптические микроскопы, увеличивающие в 3000 раз, и электронные микроскопы, увеличивающие в десятки и сотни тысяч раз.

Микроорганизмы распространены в природе повсеместно: в почве, воде, иле, воздухе, на поверхности растений, на коже и в кишечнике животных и человека, на шерстном покрове животных, на всех предметах окружающей среды. Микробы встречаются в песках пустынь, в снегах и водах Арктики и Антарктиды, в глубине шахт и морей, в стратосфере на высоте нескольких десятков километров. Они составляют значительную часть живого вещества планеты. Так, в 1 мл загрязненной воды содержится несколько сот миллионов микробов, а в 1 г окультуренной почвы — несколько миллиардов. В пахотном слое 1 га окультуренной почвы масса микробов составляет 5...10 т. Однако на протяжении многих веков человечеству ничего не было известно о микроорганизмах.

Проникновение в тайны микромира неразрывно связано с созданием и совершенствованием оптических приборов. Первым человеком, увидевшим микроорганизмы, был голландец Антони ван Левенгук (Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723), мануфактурщик из Дельфта. Заинтересовавшись строением льняного волокна, он отшлифовал для себя несколько грубых линз. Позднее А. ван Левенгук увлекся этой тонкой и кропотливой работой и достиг большого совершенства в деле изготовления линз, названных им «микроскопиями». По форме это были одинарные двояковыпуклые стекла, оправленные в серебро или латунь (то, что мы теперь называем «лупы»), однако по своим оптическим свойствам линзы А. ван Левенгука, дававшие увеличение в 200...270 раз, не знали себе равных. (Достаточно напомнить, что теоретический предел увеличения двояковыпуклой линзы — в 250...300 раз.)

Обладея природной любознательностью, А. ван Левенгук с интересом рассматривал все, что попадалось под руку: воду из пруда, зубной налет, настой перца, слюну, кровь и многое другое. Результаты своих наблюдений он начал посылать в Лондонское Королевское общество, членом которого впоследствии был избран. Всего А. ван Левенгук написал в это общество более 170 писем, а позднее завещал ему 26 своих знаменитых «микроскопий». Сопоставив описания, приведенные А. ван Левенгуком, и оптические возможности имевшихся в его распоряжении линз, можно сделать заключение, что в 1676 г. ему впервые удалось увидеть бактерии (рис. 1). А. ван Левенгук обнаруживал повсюду организмы и пришел к выводу, что окружающий мир густо заселен микроскопическими обитателями. Все виденные им микроорганизмы, в том числе и бактерии, А. ван Левенгук считал маленькими животными, названными им «анималькулями», и был убежден, что они устроены так же, как и крупные организмы, т. е. имеют органы пищеварения, ножки, хвостики и т. д. Открытия А. ван Левенгука были настолько неожиданными и даже фантастическими, что на протяжении почти 50 последующих лет вызвали всеобщее изумление. Будучи в Голландии, Петр I посетил А. ван Левенгука и беседовал с ним. Из этой поездки Петр I привез в Россию микроскоп, а позднее в мастерских при его дворе были изготовлены первые отечественные микроскопы.

Дальнейшее систематическое изучение окружающей природы при помощи более совершенных микроскопов подтверждало обнаруженное А. ван Левенгуком повсеместное распространение микроорганизмов. Три основные проблемы, волновавшие умы ученых на протяжении длительного времени, послужили могучим стимулом для развития исследований, приведших к возникновению и последующему интенсивному развитию микробиологии: природа процессов брожения и гниения, причины возникновения инфекционных болезней и проблема самозарождения организмов.

Формирование представлений о микробной природе инфекционных болезней. Еще древнегреческий врач Гиппократ (ок. 460—377 до н. э.) высказывал предположение о том, что заразные болезни



Рис. 1. Рисунок бактерий А. ван Левенгука

вызываются невидимыми живыми существами. Авиценна (ок. 980—1037) в «Каноне медицины» писал о «невидимых» возбудителях чумы, оспы и других заболеваний. Подобные мысли можно обнаружить и в трудах итальянского врача, астронома и поэта Дж. Фракасторо (J. Fracastoro, 1478—1553). В том, что инфекционные болезни вызываются живыми микроскопическими существами, был глубоко убежден русский врач-эпидемиолог Д. С. Самойлович (1744—1805), пытавшийся под микроскопом обнаружить возбудитель чумы, однако возможности существовавших тогда микроскопов не позволили ему этого сделать. В 1827 г. итальянский естествоиспытатель А. Басси (A. Bassi, 1773—1856), изучая заболевание шелковичных червей, обнаружил передачу болезни при переносе микроскопического грибка от больной особи к здоровой. Таким образом, А. Басси впервые удалось экспериментально установить микробную природу этого заболевания.

Научная деятельность Л. Пастера. Человеком, который своими работами положил начало современной микробиологии, был выдающийся французский ученый Луи Пастер (Louis Pasteur, 1822—1895). Научная деятельность Л. Пастера многогранна и охватывала все основные проблемы того времени, связанные с жизнедеятельностью микроорганизмов.

Чтобы оценить гигантский научный труд Л. Пастера, достаточно привести надпись на мемориальной доске, установленной на доме, где помещалась его лаборатория. Надпись эта гласит: «Здесь была лаборатория Л. Пастера»:

1857 г. — Брожение. 1860 г. — Самопроизвольное зарождение. 1865 г. — Болезни вина и пива. 1868 г. — Болезни шелковичных червей. 1881 г. — Зараза и вакцина. 1885 г. — Предохранение от бешенства».

Трудно переоценить значение научных открытий Л. Пастера, каждого из которых достаточно, чтобы навсегда вписать имя ученого в историю науки. Изучая молочнокислое, спиртовое, маслянокислое брожение, Л. Пастер выяснил, что эти процессы вызываются микроорганизмами определенных видов и непосредственно связаны с их жизнедеятельностью. Позднее, изучая «болезни» вина, болезни животных и человека, он экспериментально установил, что их «виновниками» также служат микробы.

Л. Пастер впервые показал, что микроорганизмы — это активные формы, полезные или вредные, энергично воздействующие на окружающую природу, в том числе и на человека.

Принципиально важным не только для микробиологии, но и для более глубокого понимания сущности живого в его разнообразных проявлениях было открытие Л. Пастером у микроорганизмов новых типов жизни, не похожих на те, которые имеют место в мире растений и животных. В 1857 г. Л. Пастер при изучении спиртового брожения установил, что оно является результатом жизнедеятельности дрожжей в условиях, исключающих доступ

кислорода. Позднее при изучении маслянокислого брожения ученый обнаружил, что микроорганизмы, вызывающие брожение, вообще отрицательно относятся к кислороду и могут размножаться только при отсутствии его свободного доступа. Таким образом, Л. Пастер обнаружил существование «жизни без кислорода», т. е. анаэробный способ существования. Он же ввел термины «аэробный» и «анаэробный» для обозначения жизни в присутствии или в отсутствие молекулярного кислорода.

К области теоретических открытий Л. Пастера относятся его работы о невозможности самозарождения. Спор о том, откуда возникают живые существа, в том числе и микроорганизмы, — из себе подобных или из других компонентов живой природы — это давний спор, приобретший к середине XIX в. большую остроту и вышедший далеко за рамки чисто научных дискуссий. На основании проделанных экспериментов ученый пришел к следующему выводу: «Нет, сегодня не имеется ни одного известного факта, с помощью которого можно было бы утверждать, что микроскопические существа появились на свет без зародышей, без родителей, которые их напоминают. Те, кто настаивает на противоположном, являются жертвой заблуждения или плохо проделанных опытов, содержащих ошибки, которые они не сумели заметить или которые они не сумели избегнуть».

Л. Пастер установил, что причиной родильной горячки является стрептококк. В дальнейшем им были открыты возбудители гнойных абсцессов, остеомиелита и куриной холеры. В результате этих открытий удалось доказать, что каждое инфекционное заболевание вызывается определенным микробом. При изучении куриной холеры в одной из серии опытов для заражения цыплят Л. Пастер использовал старую культуру возбудителя этой болезни. Все цыплята в этой серии опытов остались здоровы, в то время как обычно половина их погибала. При повторном заражении тех же цыплят свежей культурой все цыплята снова остались живы, а в контрольной группе, зараженной свежей культурой, как обычно, половина цыплят погибла. На этом основании Л. Пастер сделал вывод, что в старых культурах болезнетворные свойства патогенных микробов снижаются, но при этом сохраняется способность повышать резистентность организма к высоковирулентному возбудителю. На основании этих наблюдений Л. Пастер предложил идею аттенуации (ослабления вирулентности) патогенных микробов с целью применения их для профилактики инфекционных болезней. Л. Пастер назвал такие препараты *вакцинами* в честь английского ученого Э. Дженнера, разработавшего в 1776 г. способ предупреждения заболевания натуральной оспой путем прививки материала из гнойников на коже у зараженных оспой телят или образующихся на коже рук доярок при коревой оспе. Ослабление спорообразующей палочки сибирской язвы было достигнуто путем выращивания культуры при

температуре 42,5...43 °С. При этом палочка утрачивала также и способность образовывать споры. Таким путем был получен штамм, поддающийся аттенуации.

И наконец, работы Л. Пастера в области изучения инфекционных болезней животных и человека (болезнь шелковичных червей, сибирская язва, куриная холера, бешенство) позволили ему не только выяснить природу этих заболеваний, но и найти способ борьбы с ними. Поэтому мы с полным правом можем считать, что своими классическими работами по изучению инфекционных болезней и мер борьбы с ними Л. Пастер положил начало развитию микробиологии.

Работы Л. Пастера были по достоинству оценены его современниками и получили международное признание. В 1888 г. на средства, собранные по международной подписке, в Париже был построен научно-исследовательский институт, носящий в настоящее время имя Л. Пастера, который и стал первым директором этого института. Открытия Л. Пастера показали, как разнообразен, необъятен, активен не видимый простым глазом микромир и какое огромное поле деятельности представляет его изучение.

Успехи микробиологии во второй половине XIX в. Оценивая успехи, достигнутые микробиологами во второй половине XIX в., французский исследователь П. Таннери (P. Tannery) в работе «Исторический очерк развития естествознания в Европе (1300—1900)» писал: «Перед лицом бактериологических открытий история других естественных наук за последние десятилетия XIX столетия кажется несколько бледной». Успехи микробиологии в этот период непосредственно связаны с новыми идеями и методическими подходами, внесенными в микробиологические исследования Л. Пастером. В числе первых, кто оценил значение открытий Л. Пастера, был английский хирург Дж. Листер (J. Lister, 1827—1912). Он понял, что причина большого процента смертных случаев после операций — заражение ран бактериями из-за незнания и несоблюдения элементарных правил антисептики. Дж. Листер впервые ввел в медицинскую практику методы предупреждения подобного заражения ран, заключавшиеся в обработке всех хирургических инструментов карболовой кислотой и разбрызгивании ее в операционной во время операции. Таким путем он добился существенного снижения числа смертельных исходов после операций.

Одним из основоположников медицинской микробиологии наряду с Л. Пастером явился немецкий микробиолог Р. Кох (R. Koch, 1843—1910), занимавшийся изучением возбудителей инфекционных заболеваний. Свои исследования Р. Кох начал, еще будучи сельским врачом, с изучения сибирской язвы и в 1877 г. опубликовал работу, посвященную возбудителю этого заболевания — *Bacillus anthracis*. Вслед за этим его внимание привлекла другая тяжелая и широко распространенная болезнь того времени — туберкулез. В 1882 г. Р. Кох сообщил об открытии возбудите-

ля туберкулеза, который в его честь был назван «палочкой Коха». (В 1905 г. за исследование туберкулеза ученому была присуждена Нобелевская премия.) Ему принадлежит также открытие возбудителя холеры.

В лабораториях Коха впервые разработаны способы приготовления плотных питательных сред путем добавления желатина к настоям и экстрактам из мяса. На такой плотной питательной среде бактерии растут в виде отдельных колоний, а каждая колония состоит из бактерий одного вида — так называемая *чистая культура*. Относительная простота выделения чистой культуры этим способом сделала микробиологические исследования доступными для широкого круга микробиологических лабораторий. Недостатком этого метода было то, что желатин — белковое вещество, которое способны расщеплять микробы многих видов, вследствие чего питательная среда с желатином зачастую разжижается. Кроме того, желатин плавится при температуре 28 °С.

В дальнейшем в лаборатории Коха был разработан метод приготовления плотных питательных сред с добавлением в качестве гелеобразующего вещества *агара* — сложного полисахарида, получаемого из красных морских водорослей. Агар плавится при 100 °С, а при 44 °С затвердевает, образуя плотный и прозрачный гель. Его расщепляют лишь немногие виды микробов, так что разжижение питательной среды с агаром наблюдается редко. В лаборатории Коха разработаны также способы окрашивания микробов анилиновыми красителями, сконструирован осветитель для микроскопа, применена иммерсионная система и разработан способ микрофотографирования бактерий.

Важный вклад в развитие микробиологии внесли естествоиспытатели нашей страны. В 1775 г. М. М. Тереховский впервые в мире применил экспериментальный метод для исследования микроорганизмов. Изучив влияние на инфузории физических и химических факторов, он впервые установил, что перед делением бактерии растут, т. е. увеличиваются в размерах. М. М. Тереховский отрицал возможность самозарождения микробов.

Родоначальником русской микробиологической школы является Л. С. Ценковский (1822—1887). Объектом его исследований были микроскопические простейшие, водоросли, грибы. Л. С. Ценковский открыл и описал большое число простейших, изучал их морфологию и циклы развития. Это позволило ему сделать вывод об отсутствии резкой границы между миром растений и животных.

Л. С. Ценковский интересовался проблемами медицинской микробиологии. Им была организована одна из первых Пастеровских станций в России и разработана вакцина против сибирской язвы (так называемая живая вакцина Ценковского).

Основоположником медицинской микробиологии справедливо считают также И. И. Мечникова (1845—1916). Мечников был

разносторонним исследователем, но основные свои научные интересы он сосредоточил на проблеме изучения взаимоотношений хозяина и микроорганизма-паразита. В 1883 г. ученый создал фагоцитарную теорию иммунитета. Невосприимчивость человека к повторному заражению после перенесенного инфекционного заболевания была известна давно. Однако природа этого явления оставалась непонятной и после того, как были разработаны и стали широко применяться прививки против ряда инфекционных заболеваний. И. И. Мечников показал, что защита организма от болезнетворных микроорганизмов — сложная биологическая реакция, в основе которой лежит способность белых кровяных клеток (лимфоцитов) захватывать и разрушать чужеродные тела, попавшие в организм. Вклад И. И. Мечникова в науку был оценен его современниками. В 1909 г. за исследования по фагоцитозу И. И. Мечникову была присуждена Нобелевская премия.

Большой вклад в развитие общей микробиологии внесли русский микробиолог С. Н. Виноградский (1856—1953) и голландский микробиолог М. Бейеринк (M. Beijerinck, 1851—1931). Оба много и плодотворно работали в разных областях микробиологии. Впитав идеи Л. Пастера о многообразии форм жизни в микромире, С. Н. Виноградский ввел микрoэкологический принцип в исследование микроорганизмов.

Для выделения в лабораторных условиях группы бактерий с определенными свойствами С. Н. Виноградский предложил создавать специфические (элективные) условия, дающие возможность преимущественного развития данной группы организмов. Именно так С. Н. Виноградским в 1893 г. был выделен из почвы анаэробный азотфиксатор, названный им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Пользуясь изящными методическими приемами, в основу которых был положен микрoэкологический принцип, С. Н. Виноградский выделил из почвы микроорганизмы, представляющие собой совершенно новый тип жизни и получившие название хемолитоавтотрофных. В качестве единственного источника углерода для построения всех структур клетки хемолитоавтотрофы используют углекислоту, а энергию получают в результате окисления неорганических соединений серы, азота, железа, сурьмы или молекулярного водорода.

С. Н. Виноградский и М. Бейеринк являются основоположниками экологического направления микробиологии, связанного с изучением роли микроорганизмов в природе и участием их в круговороте веществ в биосфере.

Таким образом, вторая половина XIX в. характеризуется выдающимися открытиями в области микробиологии. На смену описательному морфолого-систематическому изучению микроорганизмов, господствовавшему в первой половине XIX в., пришло изучение физиологии микроорганизмов, основанное на точном экспе-

рименте. Развитие нового этапа микробиологии связано в первую очередь с трудами Л. Пастера. К концу XIX в. в микробиологии начинают выделяться определенные направления: общая, медицинская, почвенная, сельскохозяйственная, ветеринарная, техническая, космическая.

Микробиология в XX в. Успехи микробиологии во второй половине XIX в. привели к обнаружению чрезвычайного разнообразия типов жизни в микромире. И в связи с этим исследователи заинтересовались следующими вопросами: как объяснить такое многообразие, определить его границы, выявить, на чем оно основано? Постановкой этих проблем, имеющих общебиологическое значение, мы обязаны двум крупнейшим микробиологам нашего времени — А. Клюйверу (A. Kluyver, 1888—1956) и К. ван Нилью (C. van Niel, 1897—1985). А. Клюйвер и его ученики (одним из них был К. ван Ниль) провели сравнительные биохимические исследования представителей относительно далеко отстоящих друг от друга физиологических групп микроорганизмов. Было изучено много форм микроорганизмов и примерно к середине 50-х гг. XX в. сформулировано то, что теперь называют теорией биохимического единства жизни.

В чем же конкретно состоит биохимическое единство жизни? Общее основано на единстве конструктивных, энергетических процессов и механизмов передачи генетической информации. А. Клюйвер доказал два первых положения: все живые организмы построены из однотипных химических макромолекул, универсальной единицей биологической энергии служит аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), в основе физиологического разнообразия живых существ лежит несколько основных метаболических путей. Что касается последнего положения, то сам А. Клюйвер изучением этой проблемы не занимался. Единство системы передачи генетической информации у всех клеточных типов жизни было установлено позднее. В настоящее время мы пока не знаем исключений, которые ставили бы под сомнение теорию биохимического единства жизни.

С начала XX в. продолжается дальнейшая дифференциация микробиологии. От нее отпочковываются новые научные дисциплины (вирусология, микология) со своими объектами исследования, выделяются направления, различающиеся задачами исследования (общая микробиология, техническая, сельскохозяйственная, медицинская, генетика микроорганизмов).

Расцвет медицинской и ветеринарной микробиологии. В трудах ученых древности можно встретить предположения о том, что возбудителями заразных болезней являются невидимые живые организмы, живой «контагий», болезнетворные семена (Гиппократ, IV в. до н. э.; Фукидид, IV в. до н. э.; Лукреций, I в. до н. э.; Плиний, I в.; Гален, III в.; Авиценна, XI в.).

В XVI в. итальянский ученый Джироламо Фракасторо сделал вывод, что передача заразных болезней от больных людей здоровым осуществляется мелкими живыми существами, которые он именовал общим названием *Contagium vivum*. Русский врач, член многих западноевропейских академий Д. Самойлович (XVII в.) был твердо убежден, что «возбудителем чумы является особливое и совсем отменное существо». Однако безусловные доказательства роли микробов в этиологии инфекционных болезней были получены только в XIX в. В 1813 г. было установлено, что грибы могут вызывать болезни пшеницы и ржи, а в 1845 г., что они вызывают болезни картофеля. В 1836 г. итальянский ученый А. Басси установил, что грибы вызывают болезни шелковичных червей и показал возможность заражения здоровых особей от больных путем переноса мицелия. В 1854 г. И. Шонлейн установил, что грибы являются возбудителями фавуса у человека. В 1849—1854 гг. появились сообщения (А. Поллендер, К. Давен) о наличии микробов в крови животных и человека при сибирской язве, а в 1876 г. Кох доказал, что возбудителем этого заболевания служит бактерия сибирской язвы. В течение последней четверти XIX в. главным образом в институте Пастера в Париже и в институте Коха в Берлине выделены и изучены возбудители большинства важнейших бактериальных инфекций человека: возвратного и брюшного тифа, паратифов, чумы, анаэробных инфекций, холеры, столбняка, лепры, туберкулеза, дизентерии, патогенные стрептококки, стафилококки, пневмококки, менингококки и др. Установлено, что некоторые патогенные бактерии (возбудители столбняка, дифтерии) продуцируют высокотоксичные вещества — экзотоксины, обуславливающие патогенез заболевания. Были разработаны рациональные способы диагностики инфекционных болезней. В начале XX в. выделены спирохеты сифилиса, палочка коклюша, риккетсии сыпного тифа, микоплазмы.

В этот период проведены широкие исследования по изучению реактивности организма животных и человека в ответ на инфекцию.

Э. Беринг и С. Китазато в институте Коха разработали способы получения иммунных сывороток для лечения и профилактики столбняка, а Э. Ру в институте Пастера получил иммунную сыворотку против дифтерии. У нас в стране такие сыворотки в 1897 г. получил Г. Н. Габричевский. Развитию этих исследований способствовала острая дискуссия между видным немецким ученым П. Эрлихом и великим русским биологом И. И. Мечниковым. П. Эрлих отстаивал разработанную им теорию гуморального иммунитета, согласно которой резистентность к инфекции создается в результате синтеза и поступления в кровь специфических антител. И. И. Мечников защищал созданную им фагоцитарную теорию иммунитета. В конечном счете выяснилось, что оба вида реактивности имеют равное значение в обеспечении резистентности

организма к инфекции. За развитие этих исследований П. Эрлиху и И. И. Мечникову в 1909 г. присуждена Нобелевская премия.

Для профилактических прививок был создан ряд эффективных живых и инактивированных вакцин, которые нашли широкое применение в практике. Французский исследователь Г. Рамон разработал в 1924—1925 гг. методику превращения экзотоксинов в нетоксичные, но сохраняющие иммуногенность анатоксины путем обработки экзотоксинов формалином. Эти методы были успешно применены для получения иммунных сывороток против столбняка, дифтерии и газовой гангрены.

Выдающимся достижением, имевшим первостепенное значение для медицинской микробиологии, явилось открытие антибиотиков, продуцируемых микроскопическими грибами, актиномицетами и бактериями. В 1929 г. английский ученый А. Флеминг обнаружил пенициллин, а в 1940 г. американские ученые А. Шатц и С. Ваксман — стрептомицин. В 1940 г. Г. Флори и Е. Чейн разработали методику очистки пенициллина, после чего было начато его промышленное производство. Оба антибиотика обладают довольно широким спектром действия и успешно применяются при многих инфекционных заболеваниях человека, животных и растений. Антибиотики эффективно борются с бактериальными инфекциями, тогда как еще недавно смертность от инфекционных заболеваний лидировала среди прочих причин.

Глава 1

ПОЛОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В СИСТЕМЕ ЖИВОГО МИРА

Начиная с Аристотеля (384—322 гг. до н. э.), которому принадлежит первая попытка систематизировать накопленные к тому времени сведения об организмах, биологи делили живой мир на два царства — растений и животных. А. ван Левенгук, открывший мир микроскопических живых существ, был убежден в том, что они являются «маленькими живыми зверушками». С этого времени и до XIX в. все открываемые микроорганизмы рассматривали как мельчайшие существа животной природы.

Во второй половине XIX в. немецкий биолог Э. Геккель (E. Haeckel, 1834—1919) приходит к заключению, что микроорганизмы настолько существенно отличаются от представителей как царства животных, так и царства растений, что не укладываются ни в одно из этих подразделений. Э. Геккель предложил выделить все микроорганизмы, у которых отсутствует дифференцировка на органы и ткани (простейшие, водоросли, грибы, бактерии), в отдельное царство Protista (протисты, первосущества)¹, включив в него организмы, во многих отношениях занимающие промежуточное положение между растениями и животными. Термин «protista» и сейчас применим для обозначения объектов, исследуемых микробиологами.

В настоящее время нет единства во взглядах на общую систему живого мира. Согласно одной из точек зрения попытки уложить все существующее разнообразие организмов в жесткую схему нецелесообразны, поскольку любые искусственные разграничения нарушают естественные связи между организмами. Следствие этого — тенденция наименьшего дробления органического мира, признание целесообразности выделения только двух царств: Plantae (растения) и Animalia (животные). Эта точка зрения акцентирует внимание на чертах сходства, соединяющих различные типы организмов, и на существовании переходов от одной группы организмов к другой в процессе эволюции.

В соответствии с противоположным представлением разделение всех живых форм на крупные таксоны (царства) наиболее

¹ От греч. protos — самый простой.

полно отражает существующее многообразие типов жизни, подчеркивая эту сторону живого мира.

Согласно первой точке зрения все микроорганизмы рассматриваются как примитивные растения или животные и соответственно входят в состав царств *Plantae* или *Animalia*. Согласно второй — микроорганизмы могут претендовать на уникальное место в иерархии живых форм, что впервые понял Э. Геккель. Дальнейшее изучение геккелевских «первосуществ» выявило неоднородность этой группы. Тогда же стало ясно, что понятие «микроорганизм» не имеет таксономического смысла. Оно объединяет организмы по признаку их малых (как правило, видимых только при помощи соответствующих приборов) размеров и связанных с этим специфических методов изучения.

Данные о различии в строении клеток микроорганизмов, входящих в группу *Protista*, начали накапливаться с конца XIX в. Это повлекло за собой деление группы на высшие и низшие протисты. К высшим протистам стали относить микроскопических животных (простейших), микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых) и микроскопические грибы (плесени, дрожжи); к низшим — все бактерии и сине-зеленые водоросли (последние чаще называют теперь цианобактериями). Деление на высшие и низшие протисты происходило в соответствии с двумя выявленными типами клеточной организации — эукариотической и прокариотической¹.

Таким образом, основное различие между двумя типами клеток — существование в эукариотической клетке вторичных полостей, сформированных с участием элементарных мембран. Сопоставление некоторых черт клеточной организации прокариотов и эукариотов представлено в таблице 1.

1. Основные отличия прокариотической клетки от эукариотической

I. Структурные и генетические различия прокариот и эукариот

Особенности	Прокариоты	Эукариоты
<i>Структурная организация</i>		
1. Замкнутые вторичные полости, создаваемые мембранами	Отсутствуют	Имеются
2. Эндоплазматический ретикулум	*	*
3. Размер цитоплазматических рибосом	70S	80S
4. Наличие рибосом в органеллах	Отсутствуют	В митохондриях (70S)
5. Часть рибосом ассоциирована с цитоплазматической мембраной	Наблюдается	Отсутствует
6. Лизосомы	Отсутствуют	Имеются

¹ Термины были предложены в 30-х гг. XX в. протозоологом Э. Шаттоном (E. Chatton).

Особенности	Прокариоты	Эукариоты
7. Митохондрии	Отсутствуют	Имеются
8. Органеллы, окруженные белковой однослойной мембраной	Имеются	Отсутствуют
9. Хлоропласты	Отсутствуют	Имеются или отсутствуют
10. Аппарат Гольджи	*	Имеется
11. Ядро	Имеется аналог — нуклеоид	Имеется
12. Ядерная мембрана	Отсутствует	Имеется
13. Ядрышко	*	*
14. Вакуоли	Встречаются редко	Встречаются часто
15. Жгутики	Состоят из одной или нескольких фибрилл	Каждый жгутик состоит из 20 фибрилл, собранных в группы
<i>Генетическая организация</i>		
1. Организация ядерной ДНК	ДНК не отделена от цитоплазмы мембраной	Ядерная оболочка окружена мембраной
2. Хромосома	Одна кольцевая (в клетке несколько ее копий)	Больше одной
3. Гистоны в хромосоме	Отсутствуют (у некоторых прокариот обнаружены гистонподобные белки)	Имеются
4. Хромосома представляет собой репликон	Единый репликон	Множество репликонов
5. Интрон-экзонная структура хромосомы и сплайсинг считываемых РНК	Отсутствуют	Имеются
6. Гены	Организованы в опероны	Обычно не организованы в опероны
7. Для инициации белкового синтеза присутствие на 5'-конце иРНК	Не обязательно	Необходимо
8. Митоз	Отсутствует	Имеется
9. Мейоз	*	*
10. Концентрация ДНК	В нуклеоиде и цитоплазматической ДНК, не окруженной оболочкой	В ядре, окруженном оболочкой
11. Способы генетической рекомбинации	Отсутствуют	Имеются
12. Образование частичных диплоидов при однонаправленном переносе ДНК	Имеется	Отсутствует

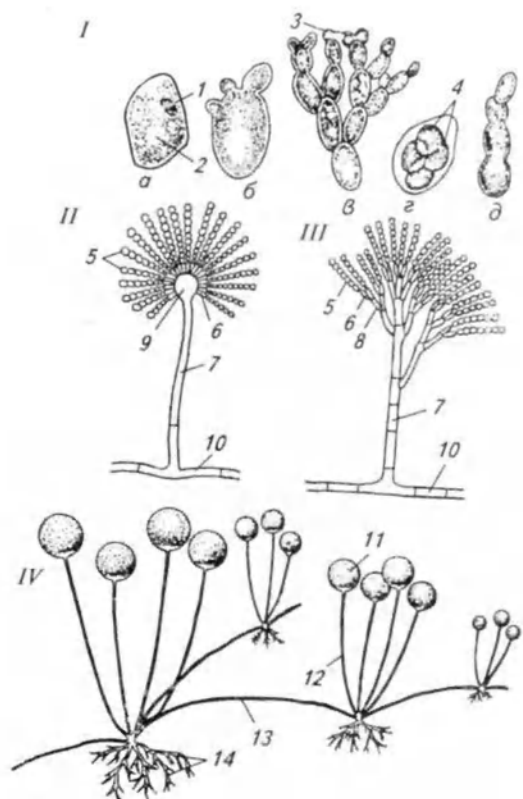


Рис. 5. Морфология микроскопических мицелиальных грибов:

I — дрожжи; II — аспергилл; III — пеницилл; IV — ризопус; а — клетка в стадии покоя; б, в — клетка при почковании; г — аскоспоры; д — образование новой особи; 1 — ядро; 2 — вакуоль; 3 — почки; 4 — аскоспоры; 5 — конидии; 6 — стеригмы; 7 — конидиофор; 8 — метелки; 9 — булавовидное расширение конидиеносца; 10 — вегетативная гифа; 11 — спорангий; 12 — спорангиофор; 13 — стolon; 14 — ризоида

септированный мицелий и размножающимся половым путем; фикомицетам (Phycomycetes), имеющим несептированный мицелий и характеризующимся наличием полового размножения; базидиомицетам (Basidiomycetes), отличающимся образованием половых спор на специальных выростах — базидиях; несовершенным грибам (Deuteromycetes, или Fungi imperfecti), обладающим септированным мицелием и не размножающимся половым путем.

Грибы классифицируют по типу колоний, характеру субстратного (воздушного) мицелия, наличию функционально различных гиф, способу размножения, строению конидие- и спорангиеносцев, типу и морфологии спор и т. д.

Микроскопические мицелиальные грибы широко распространены в природе — в почве, в воде, на растительных и животных остатках. Среди них есть сапрофиты, паразиты, хищники, многие из них патогенны для растений, животных и человека. Микромицеты вызывают порчу пищевых продуктов, произведений живописи, настенных росписей, покрытий оптических приборов (биноклей, линз, фотоаппаратуры и т. д.), резины и т. д. Некоторые виды грибов вызывают поражения кожных покровов человека и животных — дерматомикозы (стригучий лишай, парша). Такие грибы называют *дерматомицетами*. Среди грибов имеется немало токсинобразующих видов, вызывающих токсикозы.

Благодаря высокой биохимической активности, способности быстро окислять и расщеплять углеводы, жиры, белки и другие соединения микромицеты принимают активное участие в круговороте веществ в природе. Многие из них нашли практическое применение в деятельности человека, в основном это грибы родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* и др. Так, в микробиологической промышленности они используются как продуценты органических кислот (лимонной — *Aspergillus niger*, итаконовой — *A. terreus*); ферментов (амилаз — *Aspergillus oryzae*, пектиназ — *A. awamori*, протеаз — *A. flavus*, *A. nidulans*, глюкозооксидазы и каталазы — *Penicillium vitale*); липидов (*Penicillium soppii*), гиббереллинов (*Fusarium moniliforme*), антибиотиков (пенициллина — *Penicillium notatum*, *P. chrysogenum*, гризеофульфина — *Penicillium griseofulvum*), а также используются в пищевой промышленности (например, для созревания сыров рокфор и камамбер — *P. roqueforti*, *P. camamberti*).

К группе микроорганизмов, называемых дрожжи, относят микроскопические одноклеточные низшие грибы, размножающиеся почкованием или делением. Термин «дрожжи» не имеет таксономического значения. Преимущественное их существование в виде одноклеточных форм позволяет рассматривать дрожжи в виде отдельной группы. Их клетки бывают круглые, овальные (Trichosporon), яйцевидные (*Candida*), цилиндрические (*Endomycetes*), треугольные (*Trigonopsis*), лимонovidные (*Nadsonia*), грушевидные (*Schizoblastopodium*), стреловидные (*Brettanomyces*), серповидные (*Selenotila*). Размеры клеток дрожжей варьируются от 1,5...2 до 10 мкм (*Saccharomycoides*) в ширину и достигают 20 мкм и более в длину.

Некоторые дрожжи образуют капсулы (*Cryptococcus*), в других встречаются включения гликогена (*Cryptococcus*), волотина (*Saccharomyces*), жира в виде отдельных капель (*Trichosporon*) либо одной липидной вакуоли (*Lipomyces*). Размножаются дрожжи почкованием, делением (*Schizosaccharomyces*), хламидоспорами (*Candida*), баллистоспорами (*Sporobolomyces*) и половым путем.

Почкующиеся клетки могут не разъединяться и формировать *псевдомицелий* (*Candida*). При почкующемся делении формирующаяся полярно на материнской клетке почка отделяется от нее *септой* (перегородкой) в районе перешейка (*Pityogonium*). При половом размножении диплоидного ядра дрожжей образуются гаплоидные споры — *аскоспоры* (эндогенные) или *споридии* (экзогенные).

Дрожжи — раздельнополюсы организмы, поэтому различают *гомоталлические* (слияние потомков одной споры или особей, образовавшихся из одной и той же гаплоидной клетки) и *гетероталлические* (конъюгация между клетками — потомками разных гаплоидных клеток). Морфологически эта особенность дрожжей ничем не проявляется, поэтому в микологии вместо термина «пол» используется термин «тип спаривания», обозначаемый знаками «+» и «-» или же буквами греческого алфавита.

Дрожжи широко распространены в природе — в воде, в почве, в нектаре цветов, в сокоотечениях деревьев, на поверхности листьев растений, в плодах, в пищевых продуктах, в организме насекомых, животных и человека. *Candida albicans* может обуславливать заболевание животных — кандидоз.

Легко размножаясь на субстратах, содержащих доступные растворимые источники углерода (сахара, спирты, органические кислоты), в частности на пищевых продуктах, в соках, сиропе, пиве и т. д., дрожжи не вызывают образование токсичных веществ, но обуславливают изменение вкуса, запаха и внешнего вида пищевых продуктов, вызывая их порчу. Высокая метаболическая активность дрожжей позволила использовать их в заквасках для хлебопечения, получения кисломолочных продуктов (*Candida kefir*), вина, сидра, спирта (*Saccharomyces cerevisiae*).

Контрольные вопросы и задания. 1. Назовите отличительные особенности грибов. 2. Дайте классификацию грибов. 3. В чем особенности строения грибов?

Глава 4

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ КОМПОНЕНТОВ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

4.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ

Химический состав бактериальной клетки сходен с химическим составом клеток других живых организмов. Компонентами микробной клетки являются вода, минеральные вещества и органические соединения — белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды (табл. 2).

Клеточная вода. Она составляет 75...90 % массы вегетативной клетки. Нормальный метаболизм, рост и размножение микробов возможны только в водной среде. Вода служит растворителем органических и минеральных веществ, дисперсионной средой для коллоидов, источником водородных и гидроксильных ионов, а также водорода и кислорода в процессе метаболизма бактерий. В бактериальной клетке вода находится в двух состояниях: 1) свободном — является растворителем, принимает участие в процессах ассимиляции и диссимиляции; 2) связанном с клеточными коллоидами, обуславливает изменение значений криоскопической точки цитоплазмы (определяет устойчивость микробов к низким и высоким температурам).

Минеральный состав. Из 100 известных в настоящее время химических элементов в состав живого вещества чаще всего входят только 22, из них лишь 16 элементов встречаются во всех группах организмов. Шесть основных элементов — углерод, кислород, азот, водород, фосфор и сера — составляют 95 % сухой биомассы клетки бактерий. Углерод, азот, водород и кислород легко образуют прочные ковалентные связи посредством спаривания электронов, благодаря чему они способны давать разнообразные химические соединения.

Микроорганизмы используют металлы в форме катионов неорганических солей. Содержание минеральных солей в микробной клетке варьируется в зависимости от состава питательной среды и возраста культуры. Минеральные соли составляют 2...30 % сухого остатка микробов. В молодых клетках их в 6...7 раз больше, чем в старых. Некоторым микроорганизмам для роста необходимы редкие элементы.

2. Химический состав клетки E.coli

Компонент	Общее количество, % от сухих веществ клетки	Молекулярная масса	Число молекул в клетке	Число разных видов молекул в клетке
Белок	55,0			
РНК	20,5	$4,7 \cdot 10^4$	2 350 000	1850
23S рРНК		$1,0 \cdot 10^6$	18 700	1
16S рРНК		$5,0 \cdot 10^5$	18 700	1
5S рРНК		$3,9 \cdot 10^4$	18 700	1
тРНК		$2,5 \cdot 10^4$	198 000	60
иРНК		$1,0 \cdot 10^6$	1380	600
ДНК	3,1	$2,5 \cdot 10^9$	2	1
Липиды	9,1	705	22 000 000	
Липополисахариды	3,4	4070	1 430 000	1
Пептидогликан	2,5		1	1
Гликоген	2,5		1	1
Полиамины:	0,4	$1,0 \cdot 10^6$	4 300	1
путресцин		88	5 600 000	1
спермидин		145	1 100 000	1
Метаболиты, кофакторы, ионы	3,5			800

Органические соединения. Белки составляют 40...80 % массы бактериальной клетки и представлены простыми белками (протеинами) и сложными белками (протеидами). Протеины состоят только из аминокислот; протеиды — из аминокислот и веществ небелковой природы — нуклеиновых кислот (нуклеопротеиды), липидов (липопротеиды), углеводов (гликопротеиды), фосфатных групп (фосфопротеиды), железа, цинка, меди (металлопротеиды), флавиноклеотидов (флавопротеиды) и т. д. Содержание белков в бактериальной клетке варьируется в зависимости от вида бактерий, возраста культуры, состава питательной среды и т. д. Так, в клетке у возбудителя сибирской язвы содержится 42 % белка. Бактериальные белки состоят из тех же 20 важнейших аминокислот, что и белки растений и животных, которые, соединяясь, образуют полипептидные цепи.

Аминокислотный состав белков разных видов бактерий качественно и количественно различен. Например, у сарцин много лизина, у протей — триптофана, у бацилл — глутаминовой кислоты. В гликопептиде клеточной стенки бактерий имеется диаминопимелиновая аминокислота, которая отсутствует у высших организмов. У кокков диаминопимелиновая кислота заменена близкой по химическому составу аминокислотой — лизином, а у других видов бактерий — орнитинном. Кроме того, в клеточной стенке бактерий встречаются D-изомеры аланина и глутаминовой кислоты. У высших организмов D-аминокислоты отсутствуют. Внеклеточные белки бактерий не содержат цистеина или содержат, но в малых количествах.

Нуклеиновые кислоты (НК) — сложные полимеры, состоящие из большого числа (1500...5 000 000) мононуклеотидов. Мононуклеотиды построены из азотистого основания [пуриново-го — аденин (А) или гуанин (Г), или пиримидинового — урацил (У), тимин (Т) или цитозин (Ц)], рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Мононуклеотиды ковалентно связываются между собой фосфодиэфирными мостиками, соединяющими 3'-положение одного мононуклеотида с 5'-положением последующего. Таким образом образуются полинуклеотиды — нуклеиновые кислоты. Существует два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая (РНК), состоящая из рибонуклеотидов, и дезоксирибонуклеиновая (ДНК), построенная из дезоксирибонуклеотидов. У бактерий имеются обе НК.

Углеводы в бактериальной клетке составляют 12...30 % ее сухой массы. Они представлены моно- и полисахаридами.

Полисахариды микроорганизмов — чрезвычайно разнообразная группа биополимеров, среди которых есть соединения, характерные как для прокариот, так и для эукариот (целлюлоза, гликоген). У бактерий обнаружен ряд полисахаридов, не встречающихся у других организмов (тейхоевые кислоты, декстран, пептидогликаны и др.). Высокая активность полисахаридов обусловлена их способностью легко вступать в реакции с другими макромолекулами, соединяясь ионными и водородными связями, а также путем гидрофобных взаимодействий.

Большинство полисахаридов включает самые распространенные сахара — глюкозу, галактозу и рамнозу. В состав специфических бактериальных полисахаридов входит множество анионных функциональных групп (гексуроновые и аминогексуроновые кислоты, нейраминовая кислота, ацильные заместители, сульфат, фосфат). Это экзополисахариды, которые либо образуют биополимеры клеточной стенки или капсулы, либо входят в состав секретуемой внеклеточной слизи. Например, типоспецифические капсульные антигены бактерий рода *Haemophilus* представлены анионными полисахаридами. К основным замещенным полисахаридам и полиолам бактерий относятся пептидогликаны, тейхоевые кислоты, низкомолекулярные гликолипиды, липополисахариды.

Тейхоевые кислоты содержатся в клеточной стенке бактерий. Это разного типа многофункциональные полиоксимакромолекулы, в которых повторяющийся полиол (глицерин или рибит) может содержать моносахарид в качестве заместителя.

В **липополисахаридах** (ЛПС) бактерий полисахаридная часть у разных видов микробов представлена разными углеводами: глюкозой, рамнозой, галактозой, фукозой, глюкозамином, D-глюкозой и L-рамнозой. Липополисахариды могут образовывать

2. Химический состав клетки *E.coli*

Компонент	Общее количество, % от сухих веществ клетки	Молекулярная масса	Число молекул в клетке	Число разных видов молекул в клетке
Белок	55,0			
РНК	20,5	$4,7 \cdot 10^4$	2 350 000	1850
23S рРНК		$1,0 \cdot 10^6$	18 700	1
16S рРНК		$5,0 \cdot 10^5$	18 700	1
5S рРНК		$3,9 \cdot 10^4$	18 700	1
тРНК		$2,5 \cdot 10^4$	198 000	60
иРНК		$1,0 \cdot 10^6$	1380	600
ДНК	3,1	$2,5 \cdot 10^9$	2	1
Липиды	9,1	705	22 000 000	
Липополисахариды	3,4	4070	1 430 000	1
Пептидогликан	2,5		1	1
Гликоген	2,5		4 300	1
Полиамины:	0,4			
путресцин		88	5 600 000	1
спермидин		145	1 100 000	1
Метаболиты, кофакторы, ионы	3,5			800

Органические соединения. Белки составляют 40...80 % массы бактериальной клетки и представлены простыми белками (протеинами) и сложными белками (протеидами). Протеины состоят только из аминокислот; протеиды — из аминокислот и веществ небелковой природы — нуклеиновых кислот (нуклеопротеиды), липидов (липопротеиды), углеводов (гликопротеиды), фосфатных групп (фосфопротеиды), железа, цинка, меди (металлопротеиды), флавиноклеотидов (флавопротеиды) и т. д. Содержание белков в бактериальной клетке варьируется в зависимости от вида бактерий, возраста культуры, состава питательной среды и т. д. Так, в клетке у возбудителя сибирской язвы содержится 42 % белка. Бактериальные белки состоят из тех же 20 важнейших аминокислот, что и белки растений и животных, которые, соединяясь, образуют полипептидные цепи.

Аминокислотный состав белков разных видов бактерий качественно и количественно различен. Например, у сарцин много лизина, у протей — триптофана, у бацилл — глутаминовой кислоты. В гликопептиде клеточной стенки бактерий имеется диаминопимелиновая аминокислота, которая отсутствует у высших организмов. У кокков диаминопимелиновая кислота заменена близкой по химическому составу аминокислотой — лизином, а у других видов бактерий — орнитинном. Кроме того, в клеточной стенке бактерий встречаются D-изомеры аланина и глутаминовой кислоты. У высших организмов D-аминокислоты отсутствуют. Внеклеточные белки бактерий не содержат цистеина или содержат, но в малых количествах.

Нуклеиновые кислоты (НК) — сложные полимеры, состоящие из большого числа (1500...5 000 000) мононуклеотидов. Мононуклеотиды построены из азотистого основания [пуриново-го — аденин (А) или гуанин (Г), или пиримидинового — урацил (У), тимин (Т) или цитозин (Ц)], рибозы или дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Мононуклеотиды ковалентно связываются между собой фосфодиэфирными мостиками, соединяющими 3'-положение одного мононуклеотида с 5'-положением последующего. Таким образом образуются полинуклеотиды — нуклеиновые кислоты. Существует два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновая (РНК), состоящая из рибонуклеотидов, и дезоксирибонуклеиновая (ДНК), построенная из дезоксирибонуклеотидов. У бактерий имеются обе НК.

Углеводы в бактериальной клетке составляют 12...30 % ее сухой массы. Они представлены моно- и полисахаридами.

Полисахариды микроорганизмов — чрезвычайно разнообразная группа биополимеров, среди которых есть соединения, характерные как для прокариот, так и для эукариот (целлюлоза, гликоген). У бактерий обнаружен ряд полисахаридов, не встречающихся у других организмов (тейхоевые кислоты, декстран, пептидогликаны и др.). Высокая активность полисахаридов обусловлена их способностью легко вступать в реакции с другими макромолекулами, соединяясь ионными и водородными связями, а также путем гидрофобных взаимодействий.

Большинство полисахаридов включает самые распространенные сахара — глюкозу, галактозу и рамнозу. В состав специфических бактериальных полисахаридов входит множество анионных функциональных групп (гексуриновые и аминогексуриновые кислоты, нейраминавая кислота, ацильные заместители, сульфат, фосфат). Это экзополисахариды, которые либо образуют биополимеры клеточной стенки или капсулы, либо входят в состав секретируемой внеклеточной слизи. Например, типоспецифические капсульные антигены бактерий рода *Haemophilus* представлены анионными полисахаридами. К основным замещенным полисахаридам и полиомам бактерий относятся пептидогликаны, тейхоевые кислоты, низкомолекулярные гликолипиды, липополисахариды.

Тейхоевые кислоты содержатся в клеточной стенке бактерий. Это разного типа многофункциональные полиоксимакромолекулы, в которых повторяющийся полиол (глицерин или рибит) может содержать моносахарид в качестве заместителя.

В **липополисахаридах** (ЛПС) бактерий полисахаридная часть у разных видов микробов представлена разными углеводами: глюкозой, рамнозой, галактозой, фукозой, глюкозамином, D-глюкозой и L-рамнозой. Липополисахариды могут образовывать

комплексы с пептидогликаном, кислыми капсульными полисахаридами.

По функциональной активности полисахариды микроорганизмов подразделяются на внутриклеточные и внеклеточные. Внутриклеточные полисахариды выполняют функции запасных веществ клетки (гликоген), входят в состав клеточной стенки (теиховые кислоты), цитоплазматической мембраны (липотейховые кислоты), эндотоксинов (абескоза, колитоза и др.).

Внеклеточные полисахариды микроорганизмов входят в состав капсулы. Это вещества с высокой молекулярной массой до 1 000 000 дальтон, гидрофильные, часто несущие отрицательный заряд. В основном они представлены гетерополисахаридами, но отдельные виды микробов продуцируют гомополисахариды. Возбудитель туберкулеза образует гетерополисахарид, состоящий из D-маннозы и арабинозы.

Липиды бактерий представлены высшими жирными кислотами, фосфолипидами, нейтральными жирами, восками. *Насыщенные жирные кислоты* широко распространены у микробов, например, капроновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$, пальмитиновая $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ кислоты. Ненасыщенные жирные кислоты представлены исключительно кислотами с одной двойной связью, в основном гексадекеновой $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{HC}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ и др. Из оксикислот у микроорганизмов часто встречаются миколовые (у микобактерий), которые придают клеточной стенке гидрофобный характер.

Содержание свободных жирных кислот в клетках колеблется в зависимости от видовых особенностей бактерий и условий их выращивания. Кишечная палочка при росте на средах с аланином содержит до 8 % липидов, а на обычных средах — 4...5 %. Качественный и количественный состав бактериальных жирных кислот изменяется с возрастом культуры и характеризуется высокой чувствительностью к физическим и химическим факторам внешней среды.

Фосфолипиды (фосфоглицериды, глицерофосфаты) представлены фосфатидной кислотой, фосфатидилсерином, фосфатидилэтаноламином, фосфатидилхолином и др. Количество фосфолипидов в туберкулезной палочке — 6,5 %. Основная масса липидов бактериальной клетки содержится в цитоплазматических мембранах или в клеточных оболочках.

Нейтральные жиры (ацилглицерины или глицериды) бактерий чаще всего содержат пальмитиновую, масляную, лауриновую, линолеовую ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$) жирные кислоты. Наличие *воска* является отличительным признаком кислотоустойчивых бактерий, например микобактерий. Так, в клетке возбудителя туберкулеза содержится более 60 % «неомыляемого воска».

Основная масса липидов в бактериальной клетке связана с дру-

гими компонентами — белками (в цитоплазматической мембране), полисахаридами (эндотоксины и O-антигены грамотрицательных бактерий). Так, у видов рода *Nocardia* свободные липиды составляют 17,5 % сухой массы, а связанные — 20 % и входят в качестве основного компонента в состав клеточных стенок.

Липиды микроорганизмов значительно разнообразнее липидов высших организмов. Они выполняют разнообразные функции: являются аккумуляторами энергии, у некоторых бактерий служат структурными компонентами клетки (цитоплазматическая мембрана), участвуют в метаболизме углеводов, в энергетическом обмене, входят в состав антигенов, определяют кислотоустойчивость микробов.

Пигменты образуют в процессе своей жизнедеятельности представители пигментобразующих видов. Пигменты вырабатываются бактериями в зависимости от условий, в которых выращивается культура, — минерального состава и реакции среды, источника углерода, температуры, количества кислорода, наличия света. Известно свыше 300 каротиноидов, и они в определенной степени определяют окраску колоний бактерий. Каротиноиды так же, как и бактериохлорофиллы, локализованы во внутриклеточных белково-липидных мембранных структурах клетки, они поглощают свет с длиной волны 400...550 нм. У фототрофных бактерий они являются вспомогательными фотосинтезирующими пигментами, передающими от 30 до 90 % энергии возбужденных состояний молекулам бактериохлорофилла, защищают хлорофилл от фотоокисления, осуществляют реакцию фототаксиса. У нефотосинтезирующих микробов они участвуют в цепи передачи электронов, обуславливают устойчивость к солнечной радиации, к повышенным концентрациям солей.

Роль пигментов в бактериальной клетке изучена недостаточно, но установлено участие их в фотосинтезе, дыхании, окислительно-восстановительных реакциях, защите от экстремальных факторов внешней среды (УФ-излучений, повышенных концентраций минеральных солей и т. д.).

4.2. МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Клетка прокариот обладает рядом принципиальных особенностей, касающихся как ее ультраструктурной, так и химической организации (рис. 6). Структуры, расположенные снаружи от ЦПМ (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки), называют обычно поверхностными структурами. Термином «клеточная оболочка» часто обозначают все слои, расположенные с внешней стороны от ЦПМ (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол). ЦПМ вместе с цитоплазмой называется *протопластом*.

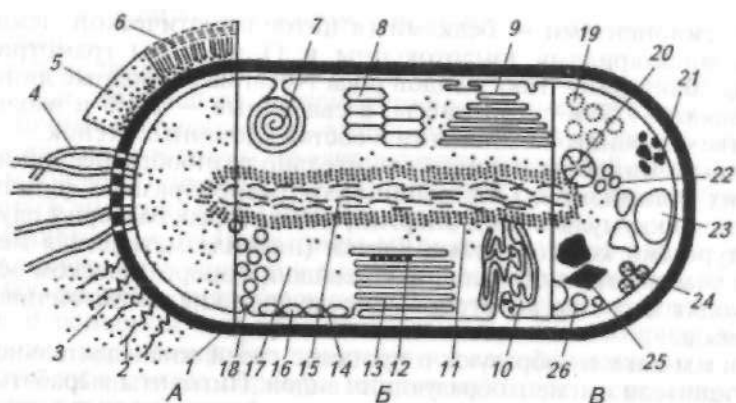


Рис. 6. Комбинированное изображение прокариотической клетки:

А — поверхностные клеточные структуры и внеклеточные образования: 1 — клеточная стенка; 2 — ворсинки; 3 — слизистые выделения; 4 — жгутики; 5 — капсула; 6 — чехол; Б — цитоплазматические клеточные структуры: 7 — мезосома; 8 — азросомы (газовые вакуоли); 9 — ламеллярные структуры; 10 — трубчатые тилакоиды; 11 — рибосомы; 12 — фикобилисомы; 13 — пластинчатые тилакоиды; 14 — ЦПМ; 15 — нуклеоид; 16 — хлоросомы; 17 — цитоплазма; 18 — хроматофоры; В — запасные вещества: 19 — полисахаридные гранулы; 20 — цианофитиновые гранулы; 21 — гранулы полифосфата; 22 — углеводородные гранулы; 23 — гранулы поли- β -оксимасляной кислоты; 24 — жировые капли; 25 — карбоксисомы (полиэдральные тела); 26 — включения серы

4.2.1. КЛЕТЧНАЯ СТЕНКА

Клеточная стенка — важный и обязательный структурный элемент подавляющего большинства прокариотических клеток, располагающийся под капсулой или слизистым чехлом или же непосредственно контактирующий с окружающей средой (у клеток, не содержащих перечисленных слоев клеточной оболочки). На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50 % сухих веществ клетки. Клеточная стенка служит механическим барьером между протопластом и внешней средой и придает клеткам определенную, присущую им форму. Концентрация солей в клетке, как правило, намного выше, чем в окружающей среде, и поэтому между ними существует большое различие в осмотическом давлении. Клеточная стенка чисто механически защищает клетку от проникновения в нее избытка воды.

По строению и химическому составу клеточная стенка прокариот резко отличается от таковой эукариотических организмов. В ее состав входят специфические полимерные комплексы, которые не содержатся в других клеточных структурах. Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида и являются важным диагностическим признаком. В зависимости

от строения клеточной стенки прокариоты, относящиеся к эубактериям, делятся на две большие группы. Было обнаружено, что если фиксированные клетки эубактерий обработать сначала кристаллическим фиолетовым (кристаллвиолет), а затем йодом, образуется окрашенный комплекс. При последующей обработке спиртом в зависимости от строения клеточной стенки судьба комплекса различна: у так называемых грамположительных видов этот комплекс удерживается клеткой, и последние остаются окрашенными; у грамотрицательных видов, наоборот, окрашенный комплекс вымывается из клеток, и они обесцвечиваются. Этот способ был впервые предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом (Ch. Gram), занимавшимся окрашиванием тканей. У некоторых эубактерий положительная реакция при окрашивании описанным выше способом свойственна только клеткам, находящимся в стадии активного роста. Выяснено, что окрашенный комплекс образуется на протопласте, но его удержание клеткой или вымывание из нее при последующей обработке спиртом определяется особенностями строения клеточной стенки.

Клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных эубактерий резко различаются как по химическому составу (табл. 3), так и по ультраструктуре (рис. 7).

3. Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных эубактерий

Компоненты клеточной стенки	Грамположительные эубактерии	Грамотрицательные эубактерии	
		внутренний слой (пептидогликановый)	внешний слой
Пептидогликан	+	+	—
Тейхоевые кислоты	+	—	—
Полисахариды	+	—	+
Белки	+	—	+
Липиды	+	—	+
Липополисахариды	—	—	+
Липопротеиды	—	+	+

Обозначения: «+» — присутствуют; «-» — отсутствуют.

В состав клеточной стенки эубактерий входят семь различных групп химических веществ, при этом пептидогликан присутствует только в клеточной стенке. У грамположительных эубактерий он составляет основную массу вещества клеточной стенки (от 40 до 90 %), у грамотрицательных содержание пептидогликана значительно меньше (1...10 %). Клеточная стенка цианобактерий, сходная с таковой грамотрицательных эубактерий, содержит от 20 до 50 % этого гетерополимера.

Под электронным микроскопом клеточная стенка грамположительных эубактерий выглядит как гомогенный электронно-

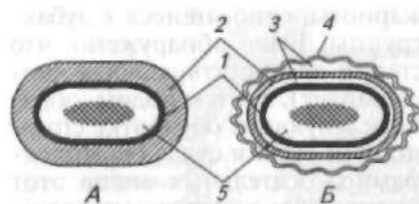


Рис. 7. Клеточная стенка грамположительных и грамотрицательных эубактерий:

А — грамположительные бактерии; Б — грамотрицательные бактерии; 1 — цитоплазматическая мембрана; 2 — пептидогликан; 3 — периплазматическое пространство; 4 — наружная мембрана; 5 — цитоплазма, в центре которой расположена ДНК

плотный слой, толщина которого колеблется у разных видов от 20 до 80 нм. У грамотрицательных эубактерий клеточная стенка многослойная. Внутренний электронно-плотный слой толщиной порядка 2...3 нм состоит из пептидогликана. Снаружи к нему прилежит, как правило, волнистый слой (8...10 нм), имеющий характерное строение: две электронно-плотные полосы, разделенные электронно-прозрачным промежутком. Такой вид характерен для элементарных мембран. Поэтому трехконтурный внешний компонент клеточной стенки грамотрицательных эубактерий получил название наружной мембраны.

Клеточная стенка грамположительных эубактерий плотно прилежит к ЦПМ в отличие от клеточной стенки бактерии грамотрицательных видов, компоненты которой (пептидогликановый слой и наружная мембрана) разделены электронно-прозрачным промежутком и четко отделены аналогичным образом от ЦПМ. Пространство между цитоплазматической и наружной мембранами получило название периплазматического. Оно, как можно видеть из строения клеточных стенок эубактерий обеих групп, характерно только для грамотрицательных форм.

Клеточная стенка грамположительных эубактерий. Основную массу клеточной стенки грамположительных эубактерий составляет специфический гетерополимер — пептидогликан. Полисахаридный остов молекулы построен из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных между собой посредством β-1,4-гликозидных связей (рис. 8). К N-ацетилмурамовой кислоте присоединен короткий пептидный хвост, состоящий из небольшого числа (обычно четыре или пять) аминокислот. У грамположительных эубактерий обнаружено более 100 различных химических типов пептидогликана. Большинство различий относится к пептидной части его молекулы.

Две особенности пептидного хвоста заслуживают внимания: наличие аминокислот в D-форме (неприродная конфигурация) и высокое содержание аминокислот с двумя аминогруппами. Это имеет принципиальное значение для пространственной организации пептидогликана. Обе аминогруппы этих аминокислот могут участвовать в образовании пептидных связей, причем вторые аминогруппы — в формировании дополнительных пептидных связей между гетерополимерными цепочками. В большинстве случаев в образовании пептидной связи участвует карбоксильная

N-Ацетилглюкозамин N-Ацетилмурамовая кислота

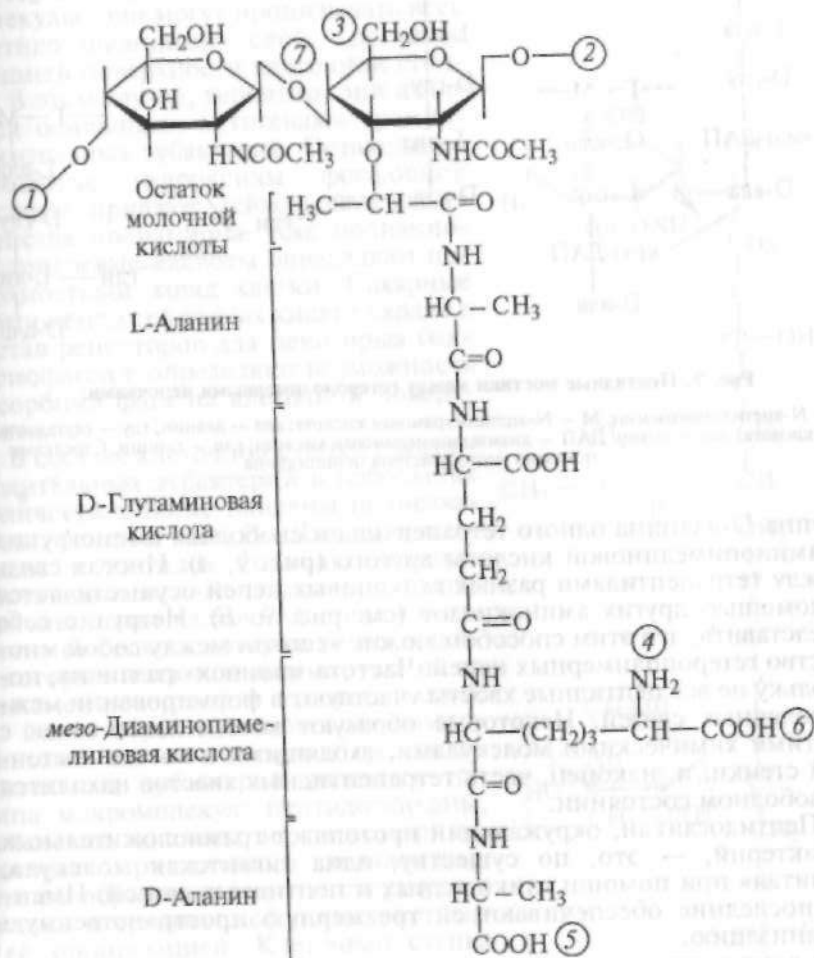


Рис. 8. Структура повторяющейся единицы пептидогликана клеточной стенки эубактерий:

Цифры в кружках обозначают: 1, 2 — места полимеризации гликанового остова молекулы; 3 — место присоединения фосфоэфирной связью молекулы тейхоевой кислоты в клеточной стенке грамположительных эубактерий; 4, 5 — места, по которым происходит связывание между гликановыми цепями с помощью пептидных связей; 6 — место ковалентного связывания (пептидная связь) с липопротеидом наружной мембраны у грамотрицательных эубактерий; 7 — место действия лизоцима

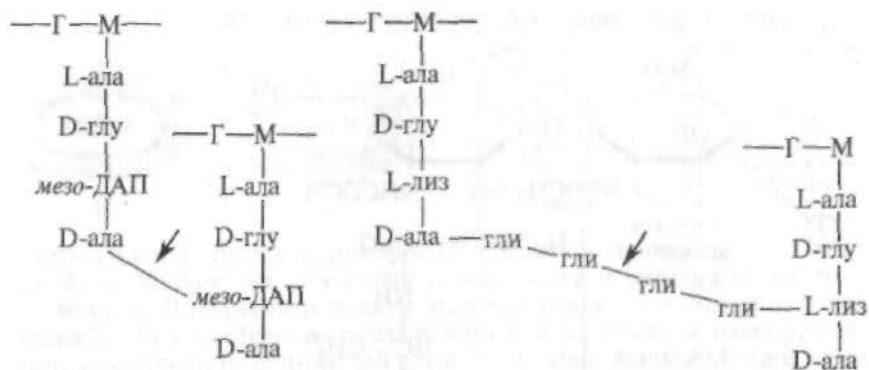


Рис. 9. Пептидные мостики между гетерополимерными цепочками:

Г — N-ацетилглюкозамин; М — N-ацетилмурамовая кислота; ала — аланин; глу — глутаминовая кислота; лиз — лизин; ДАП — диаминопимелиновая кислота; гли — глицин. Стрелками показано место действия пенициллина

группа D-аланина одного тетрапептида и свободная аминогруппа диаминопимелиновой кислоты другого (рис. 9, А). Иногда связь между тетрапептидами разных гликановых цепей осуществляется с помощью других аминокислот (см. рис. 9, Б). Нетрудно себе представить, что этим способом можно «сшить» между собой множество гетерополимерных цепей. Частота «сшивок» различна, поскольку не все пептидные хвосты участвуют в формировании межцепочечных связей. Некоторые образуют ковалентные связи с другими химическими молекулами, входящими в состав клеточной стенки, и, наконец, часть тетрапептидных хвостов находится в свободном состоянии.

Пептидогликан, окружающий протопласт грамположительных эубактерий, — это, по существу, одна гигантская молекула, «сшитая» при помощи гликозидных и пептидных связей. Именно последние обеспечивают ей трехмерную пространственную организацию.

Кроме пептидогликана в состав клеточных стенок грамположительных эубактерий входит другой уникальный класс химических соединений — тейхоевые кислоты, представляющие собой полимеры, построенные на основе рибита (пятиатомного спирта) или глицерина (трехатомного спирта), остатки которых соединены между собой фосфоэфирными связями (рис. 10). Некоторые свободные гидроксильные группы в молекулах спиртов могут быть замещены остатками D-аланина, глюкозы, N-ацетилглюкозамина и некоторых других сахаров. Тейхоевые кислоты ковалентно могут соединяться с N-ацетилмурамовой кислотой (см. рис. 10).

Поскольку это длинные линейные молекулы, они могут пронизывать весь пептидогликановый слой, достигая внешней поверхности клеточной стенки. В этом случае, вероятно, они являются основными антигенами грамположительных эубактерий. Остающиеся свободные гидроксилы фосфорной кислоты придают тейхоевой кислоте свойства полианиона. Как полианионы тейхоевые кислоты определяют поверхностный заряд клетки. Сахарные компоненты тейхоевых кислот входят в состав рецепторов для некоторых бактериофагов и определяют возможность адсорбции фага на клеточной поверхности.

В составе клеточной стенки грамположительных эубактерий в небольших количествах также найдены полисахариды, белки и липиды. Для полисахаридов и липидов показана возможность ковалентного связывания с макромолекулами клеточной стенки в отличие от белков, которые (у тех видов, у которых имеются) формируют на ее внешней поверхности отдельный слой.

Таким образом, основными компонентами клеточной стенки грамположительных эубактерий являются три типа макромолекул: пептидогликаны, тейхоевые кислоты и полисахариды, которые при помощи ковалентных связей образуют сложную структуру с весьма упорядоченной пространственной организацией. Клеточная стенка бацилл, например *Bacillus subtilis* (сенная палочка), приблизительно соответствует толщине 40 молекул пептидогликана. В целом клеточную стенку грамположительных эубактерий можно представить в виде губчатой структуры с порами диаметром примерно 1...6 нм. Возможность прохождения

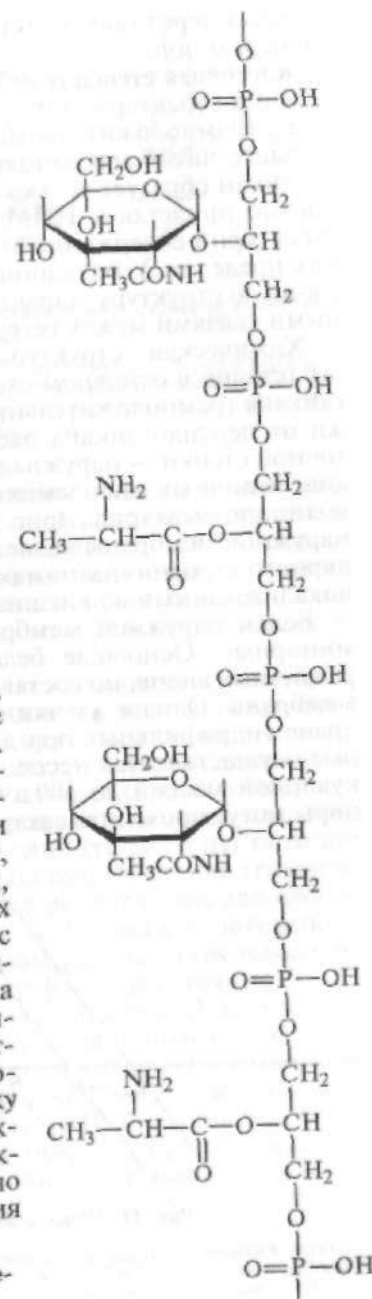


Рис. 10. Структурная формула глицеринтейхоевой кислоты

молекул через такую клеточную стенку определяется ее зарядом и размером пор.

Клеточная стенка грамотрицательных зубактерий. У грамотрицательных зубактерий строение клеточной стенки намного сложнее, чем у грамположительных (см. рис. 7). В ее состав входит гораздо большее число макромолекул разного химического типа. Пептидогликан образует только внутренний слой клеточной стенки, неплотно прилегая к ЦПМ. Для разных видов грамотрицательных зубактерий содержание этого гетерополимера колеблется в широких пределах. У большинства видов он образует одно- или двухслойную структуру, характеризующуюся весьма редкими поперечными связями между гетерополимерными цепями (рис. 11).

Химическая структура пептидогликана грамотрицательных зубактерий в основном сходна со структурой типичного пептидогликана грамположительных зубактерий (см. рис. 8 и 9, А). Снаружи от пептидогликана располагается дополнительный слой клеточной стенки — наружная мембрана. Она состоит из фосфолипидов, типичных для элементарных мембран, белков, липопротеида и липополисахарида (рис. 12, А). Специфическим компонентом наружной мембраны является липополисахарид сложного молекулярного строения, занимающий около 30...40 % ее поверхности и локализованный во внешнем слое (см. рис. 12, Б).

Белки наружной мембраны можно разделить на основные и минорные. Основные белки представлены небольшим числом различных видов, но составляют почти 80 % всех белков наружной мембраны. Одна из функций этих белков — формирование в мембране гидрофильных пор диаметром примерно 1 нм, через которые осуществляется неспецифическая диффузия молекул с молекулярной массой до 600...900 Да. Это означает, что через такие поры могут проходить сахара, аминокислоты, небольшие олигоса-

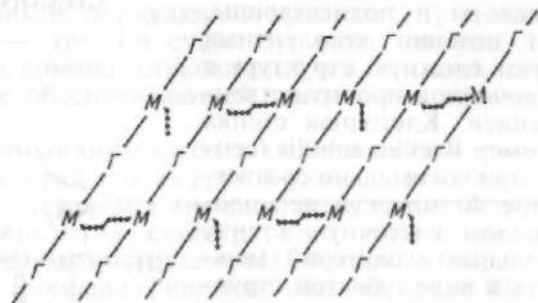


Рис. 11. Однослойная структура пептидогликана:

Линиями обозначены гетерополимерные цепочки, образованные чередующимися остатками N-ацетилглюкозамина (Г) и N-ацетилмурамовой кислоты (М), соединенными между собой β -1,4-гликозидными связями. Точками обозначены аминокислоты пептидного хвоста

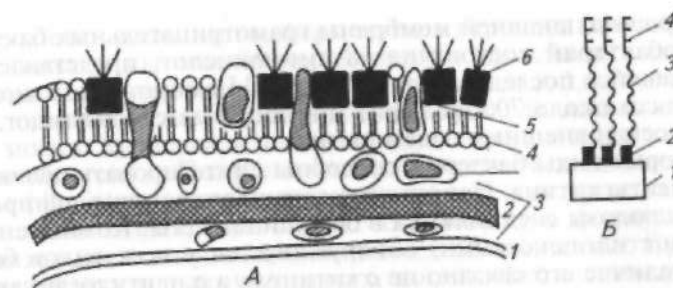


Рис. 12. Клеточная стенка грамотрицательных зубактерий и строение молекулы липополисахарида:

А: 1 — цитоплазматическая мембрана; 2 — пептидогликановый слой; 3 — периплазматическое пространство; 4 — фосфолипид; 5 — молекулы белков (заштрихована гидрофобная часть); 6 — липополисахарид. Б: 1 — липид А; 2 — внутреннее полисахаридное ядро; 3 — наружное полисахаридное ядро; 4 — О-антиген

хариды и пептиды. Белки, пронизывающие наружную мембрану насквозь и образующие гидрофильные поры, называются поринами. Минорные белки наружной мембраны представлены гораздо большим числом видов. Их основные функции — транспортная и рецепторная. Примером минорных белков могут служить белки, ответственные за специфический транспорт в клетку железосодержащих соединений.

Липополисахариды (ЛПС) внешнего слоя клеточной стенки грамотрицательных бактерий — сложные молекулы с молекулярной массой свыше 10 000. Лучше всего они изучены у сальмонелл. Это олигомеры, содержащие в среднем около трех мономерных субъединиц. Каждая субъединица состоит из трех разных участков — липида А, ядра (2-кето-3-дезоксид-Д-маннооктоновая кислота и гептоза) и О-специфической боковой цепи (тетра- и пентасахариды). Липополисахариды — антигены клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Они служат также рецепторами для адсорбции бактериофагов, располагаются на наружной поверхности внешнего слоя стенки, а длинные О-замещенные (кислородзамещенные) боковые цепи выступают наружу на расстояние 30...150 нм от поверхности стенки. Различная структура О-замещенных боковых цепей липополисахаридов определяет антигенное разнообразие бактерий. ЛПС клеточных стенок у ряда видов грамотрицательных бактерий содержат 3,6-дидезоксиаскарилозу, колитозу, аскарилозу, паратозу, тивелозу. ЛПС большинства бактерий токсичен (это эндотоксин, токсичность которого определяется липидом А), кроме того, липополисахарид вызывает неспецифическое повышение резистентности макроорганизма, стимулирует выработку интерферона, обладает противоопухолевой активностью, митогенной активностью в отношении лимфоцитов.

Липопротеид внешней мембраны грамотрицательных бактерий (у энтеробактерий состоит из 58 аминокислот, представленных повторяющейся последовательностью из 15 аминокислот, молекулярная масса около 7000) служит мостиком между пептидогликановым слоем и внешним слоем стенки.

Некоторые виды бактерий способны синтезировать целлюлозу и компоненты хитина. Например, клетки *Sarcina ventriculi* при помощи целлюлозы соединяются в большие пакеты. Компонент хитина — ацетилглюкозамин, обнаруживается у всех видов бактерий, но наличие его связано не с хитином, а с пептидогликаном.

У грамотрицательных бактерий во внешней мембране белки представлены двумя группами: белки основные и минорные. Белки основные (молекулярная масса 29 000...50 000) служат рецепторами для фагов, колицинов, участвуют в стабилизации структуры внешней мембраны и, главное, в формировании мембранных гидрофильных пор (их называют поринами). Предполагают, что водную пору диаметром 1,5...2 нм окружают три молекулы порина, образующие Р-структуру. Каждая молекула порина стабилизирована тремя скрученными молекулами липопротеида, из которых одна соединена с пептидогликаном (рис. 13). Минорные белки несут транспортные (транспорт железа, нуклеозидов и др.) и рецепторные (фагов, колицинов) функции. Белки на внешней мембране грамотрицательных бактерий иногда могут располагаться слоем из тетрагональных или гексагональных структур. Внешняя мембрана обладает трансмембранным потенциалом. Она отрицательно заряжена со стороны периплазмы.

Более сложное строение клеточной стенки наблюдается у некоторых эубактерий (*Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria mucosa*, *Deinococcus radiodurans*, бактерий родов *Nocardia*, *Corynebacterium*).

Клеточную стенку бактерий можно разрушить экстрагировани-

ем щелочью, механически, ультразвуком. Наблюдать ее можно в фазово-контрастном и электронном микроскопах (ультратонкие срезы), микроскопией автолизированных бактерий, с применением специальных методов окраски.

Прокариоты без клеточной стенки.

При воздействии определенными химическими веществами оказалось возможным получать в лаборатории из разных видов эубактерий формы с частично (сферопласты) или полностью (протопласты) отсутствующей клеточной стенкой. Впервые это обнаружили при действии на бактери-

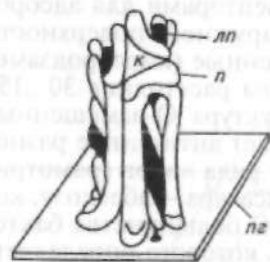


Рис. 13. Гипотетическая модель организации поры внешней мембраны (по D. Rienzo и др., 1978):

к — канал поры; лп — липопротеид; п — порин; пг — пептидогликан

альные клетки лизоцимом, ферментом из группы гликозидаз, содержащимся в яичном белке, слезной жидкости и выделяемом некоторыми бактериями. Лизоцим разрывает β -1,4-гликозидные связи гетерополисахаридной цепи (см. рис. 8), что в конечном итоге может привести к полному удалению пептидогликана из клеточной стенки. Полученные под действием лизоцима сферопласты (из грамотрицательных эубактерий) или протопласты (из грамположительных) принимают сферическую форму и очень чувствительны к внешнему осмотическому давлению. Существовать они могут только в условиях, когда осмотическое давление питательной среды сбалансировано с осмотическим давлением внутри клетки. В благоприятных условиях сферопласты и протопласты проявляют определенную метаболическую активность, но утрачивают способность к размножению.

Прокариоты, не содержащие клеточной стенки, обнаружены и в природе. Это группа микоплазм, сапрофитов и внутриклеточных паразитов растений, животных и человека. Формы, сходные с микоплазмами, были получены также опытным путем при помощи пенициллина, лизоцима и других факторов. Это так называемые L-формы. В благоприятных условиях они обладают метаболической активностью и способны к размножению.

Уникальность химического состава клеточной стенки прокариот, ее отличие от таковой эукариот сделали возможным создание и применение лекарственных препаратов, специфически действующих только на стенку прокариотической клетки. На этом основано действие пенициллина и некоторых других антибиотиков, подавляющих разные этапы синтеза пептидогликана. Пенициллин, например, ингибирует образование связей между пептидными хвостами на этапе «сшивания» полимера, происходящего в клеточной стенке в процессе роста прокариотической клетки (см. рис. 9).

Функции клеточной стенки прокариот. Клеточная стенка прокариот выполняет разнообразные функции: механически защищает клетку от воздействий окружающей среды, обеспечивает поддержание ее внешней формы, дает возможность клетке существовать в гипотонических растворах. В первую очередь в этом «заслуга» пептидогликана.

Структурная дифференцировка клеточной стенки у грамотрицательных эубактерий, приведшая к формированию дополнительного слоя в виде наружной мембраны, значительно расширила круг функций клеточной стенки. Прежде всего это связано с проницаемостью и транспортом веществ в клетку. Наружная мембрана имеет специфические и неспецифические каналы (поры) для пассивного транспорта веществ и ионов, необходимых клетке, т. е. осуществляет функции молекулярного «сита». Наружная мембрана также препятствует проникновению в клетку токсичных веществ, что находит отражение в большей устойчивости грамотри-

цательных зубактерий (по сравнению с грамположительными) к действию некоторых ядов, химических веществ, ферментов и антибиотиков.

Появление у грамотрицательных зубактерий дополнительной мембраны в составе клеточной стенки фактически привело к созданию обособленной полости (периплазматического пространства), отграниченной от цитоплазмы и внешней среды специфическими мембранами и несущей важную функциональную нагрузку.

Периплазматическое пространство, куда погружен пептидогликановый слой, заполнено раствором, в состав которого входят специфические белки, олигосахариды и неорганические молекулы. Периплазматические белки представлены двумя типами: транспортными белками и гидролитическими ферментами. Транспортные белки — это переносчики, связывающиеся с соответствующими субстратами внешней среды и транспортирующие их от наружной мембраны к цитоплазматической.

Было обнаружено также, что многие бактерии способны в больших количествах вырабатывать ферменты (гликозидазы, протеазы, липазы и др.), гидролизующие все типы полимерных молекул. Последними могут быть как молекулы, синтезируемые самой клеткой, так и чужеродные, попавшие в клетку извне. Отрицательные последствия гидролиза собственных молекул (самопереваривание) очевидны. В то же время прокариоты нуждаются в гидролитических ферментах, так как это расширяет круг используемых ими веществ, включая в него полимеры разного типа. Становится понятна необходимость изолирования этих ферментов от цитоплазматического содержимого. Грамположительные зубактерии выделяют гидролитические ферменты во внешнюю среду, у грамотрицательных они локализованы в периплазматическом пространстве.

Разнообразные функции выполняют макромолекулы, локализованные частично или полностью на внешней стороне клеточной стенки, контактирующей с окружающей средой: это специфические рецепторы для фагов и колицинов; антигены (липополисахарид грамотрицательных зубактерий, тейхоевые кислоты грамположительных); макромолекулы, обеспечивающие межклеточные взаимодействия при конъюгации, а также между патогенными бактериями и тканями высших организмов.

Окраска по Граму. Предложена как метод дифференциального окрашивания бактерий, который в настоящее время широко используется в микробиологии. Сущность метода состоит в том, что при окрашивании бактерий генцианвиолетом (кристаллвиолетом, метилвиолетом и др.) краска с йодом образует соединение, которое удерживается клетками при обработке их спиртом. Такие бактерии окрашены в сине-фиолетовый цвет и их называют грамположительными. Обесцвеченные спиртом бактерии грамот-

рицательны и их докрашивают контрастной краской. В 1978 г. Н. Е. Гиббоне и Р. Г. Е. Муррей предложили грамотрицательные истинные бактерии (зубактерии) выделить в отдел *грациликотных* (Gracilicutes), а грамположительные — в отдел *фирмакутных* (Firmicutes). Это две главные группы прокариот, так как подавляющее большинство бактерий относится к ним. Механизм окраски по Граму окончательно не изучен. В основе его лежат особенности химического состава и строения клеточных стенок бактерий. Предполагают, что при обработке бактерий спиртом происходит разбухание пептидогликана и уменьшение диаметра пор клеточной стенки, что в целом приводит к снижению ее проницаемости. Так как фирмакутные бактерии характеризуются высоким содержанием пептидогликана, то в результате обработки спиртом их стенки становятся непроницаемыми для красителей и краска из клеток не вымывается.

У грациликотных бактерий слой пептидогликан тонкий, и проницаемость их клеточной стенки увеличивается за счет растворения и вымывания липидов спиртом. Доказательством того, что в окраске по Граму основную роль играет клеточная стенка, служит тот факт, что протопласты грамположительных бактерий становятся грамотрицательными. Имеются бактерии, у которых в процессе прохождения цикла развития изменяется отношение к окраске по Граму. При старении у многих бактерий стенка утолщается, и это обуславливает их положительную окраску, эндоспорообразующие бактерии обладают грамположительной клеточной стенкой, но некоторые из них не окрашиваются по Граму. Окраска по Граму является диагностической, но только в отношении прокариот, обладающих клеточной стенкой.

L-Формы бактерий. Впервые L-формы были открыты у *Streptobacillus moniliformis*. Они образуются только у бактерий, имеющих клеточную стенку, в условиях нарушения биосинтеза пептидогликана и полностью или частично лишены его. В организме человека и животных они образуются при антибиотикотерапии, в частности при использовании в качестве лекарственных препаратов антибиотиков, специфически действующих только на стенку прокариотической клетки — пенициллина, бацитрацина, новобиноцина и др.

У L-форм бактерий значительно увеличиваются размеры клеток, которые превращаются в гигантские (до 50 мкм) шаровидные, нитевидные, грушевидные сильно вакуолизированные формы, содержащие элементарные тела (размером 0,2...1 мкм). Скорость образования L-форм варьируется от нескольких дней до месяцев. В благоприятных условиях (на казеиновом переваре, печеночном бульоне и т. д.) L-формы медленно (1...4 нед и более) растут в виде характерных колоний с врастающим в среду слегка пигментированным центром и нежным кружевным краем. Колонии L-форм бывают двух типов. *Стабильные* — мелкие (диаметром до 10 мкм),

многочисленные, нежные, растущие как в присутствии фактора, обусловившего их образование, так и в его отсутствии. Они часто не реверсируют в исходные бактериальные клетки, не адсорбируют фаги (из-за отсутствия рецепторов фагов), длительно переживают на питательных средах, сохраняют внутренние мембранные системы и миелоноподобные структуры, характеризуются отсутствием пептидогликана и значительными изменениями антигенного строения. *Нестабильные* колонии — крупные (диаметром более 500 мкм), пигментированы (часто желто-коричневого цвета), легко реверсируют в исходные бактериальные клетки при удалении фактора, обусловившего их образование, содержат внутренние мембранные системы и миелиновые структуры, адсорбируют фаги и лизируются ими. Они являются промежуточными формами между клетками и стабильными L-формами, сохраняют антигенное строение исходных бактериальных клеток, характеризуются прерывистостью слоя пептидогликана, так как вновь синтезированные субъединицы включаются в клеточную стенку нерегулярно и некоординированно. Реверсия L-форм протекает очень медленно (2...4 нед и более) и может быть завершенной (с полным восстановлением всех свойств исходной культуры) или незавершенной (биологические свойства полностью не восстанавливаются). L-Формы обладают метаболической активностью, способностью к делению и слиянию их элементов.

L-Формы образуются как сапрофитными, так и патогенными бактериями, например возбудителями туберкулеза, бруцеллеза. Их выделяют от животных, больных и другими заболеваниями. L-Формы болезнетворных бактерий патогенны. Они сохраняют способность продуцировать токсины, гиалуронидазу и другие вещества, синтез которых осуществляется в цитоплазме либо в цитоплазматической мембране. Заболевания, обусловленные реверсией L-форм, характеризуются длительным течением, меньшей смертностью. L-Формы имеют приспособительное значение для клетки как способ переживания бактериями неблагоприятных условий.

4.2.2. КАПСУЛЫ, СЛИЗИСТЫЕ СЛОИ, ЧЕХЛЫ

Снаружи клеточная стенка прокариот часто бывает окружена слизистым веществом. Такие образования в зависимости от структурных особенностей получили название капсул, слизистых слоев или чехлов. Все они являются результатом биосинтеза прокариотами органических полимеров и отложения их вокруг клеток.

Под *капсулой* понимают слизистое образование, обволакивающее клетку, сохраняющее связь с клеточной стенкой и имеющее аморфное строение (см. рис. 3, 19; 6, 5). Если толщина образова-

ния меньше 0,2 мкм и, следовательно, оно может быть обнаружено только при помощи электронного микроскопа, говорят о микрокапсуле; если больше 0,2 мкм, говорят о макрокапсуле. Последнюю можно видеть в обычный световой микроскоп. Для этого препарат просматривают в капле туши, которая не в состоянии проникнуть в капсулу. На темном фоне выделяются клетки, окруженные светлыми зонами. Если же слизистое вещество имеет аморфный, бесструктурный вид и легко отделяется от поверхности прокариотической клетки, говорят о слизистых слоях, окружающих клетку (см. рис. 6, 3).

В отличие от капсул *чехлы* имеют тонкую структуру. Нередко в них обнаруживают несколько слоев с разным строением (см. рис. 6, 4). Чехлы ряда бактерий, метаболизм которых связан с окислением восстановленных соединений металлов, часто инкрустированы их оксидами. Между этими структурами у прокариот обнаружено много переходных форм, так что иногда нельзя четко отграничить капсулу от слизистых клеточных выделений или капсулу от чехла.

Наличие капсулы зависит от штамма микроорганизма и условий его культивирования. Бактерии, образующие капсулу, могут легко в результате мутации превращаться в бескапсульные формы, что не приводит к какому-либо нарушению клеточной активности, поэтому капсулы нельзя рассматривать как обязательный структурный компонент прокариотической клетки.

Капсулы, слизистые образования и чехлы могут содержать такие же компоненты, как и клеточная стенка, однако их химический состав не идентичен. Как правило, химический состав капсул, образуемых бактериями, родо- или видоспецифичен. Основные химические компоненты большинства капсул прокариот — полисахариды гомо- или гетерополимерной природы. Исключение составляет капсула некоторых видов рода *Bacillus*, построенная из полипептида, являющегося полимером D-глутаминовой кислоты. Некоторые бактерии способны синтезировать и выделять в окружающую среду волокна целлюлозы.

Чехлы как более сложные структуры имеют обычно и более сложный химический состав. Чехол *Sphaerotilus natans*, например, содержит 36 % сахаров, 11 % гексозамина, 27 % белка, 5,2 % липида и 0,5 % фосфора.

Хотя капсулы, слизистые вещества и чехлы не являются обязательными структурами прокариотической клетки, им приписывают определенные полезные для клетки функции. Внеклеточная среда, вязкость которой обусловлена наличием слизистых веществ, очевидно, благоприятна для клетки, так как обеспечивает защиту от механических повреждений, высыхания, создает дополнительный осмотический барьер, служит препятствием для проникновения фагов. Иногда слизистые образования могут служить источником запасных питательных веществ. При помощи слизи

осуществляется связь между соседними клетками в колонии, а также прикрепление клеток к различным поверхностям. Способность определенных бактерий синтезировать эти своеобразные внеклеточные полимеры находит практическое применение: их используют в качестве заменителя плазмы крови, а также для получения синтетических пленок.

4.2.3. ЖГУТИКИ И МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ

Жгутики. По способности передвигаться все бактерии делятся на две группы — неподвижные и подвижные. Движение бактерий бывает скользящее, вращательное и поступательное, осуществляемое с помощью жгутиков. Наиболее распространен тип движения с помощью жгутиков. По числу и характеру расположения различают: 1) *полюсные жгутики*, когда один, два и более жгутиков расположены на одном (монополярно) или на обоих (биполярно) полюсах клетки и основание жгутика обычно параллельно длинной оси клетки; 2) *подполюсные жгутики* (или субполярные), когда один-два и более жгутиков расположены в месте перехода боковой поверхности в полюс клетки на одном или двух ее концах и основание жгутика обычно составляет прямой угол с длинной осью клетки; 3) *боковые* (или латеральные) жгутики, когда один, два и более жгутиков в виде куста расположены в средней точке одной из половин клетки; 4) *перитрихиальные жгутики* расположены по всей поверхности клетки по одному или пучками (кишечная палочка, обыкновенный протей), полюса клетки обычно лишены их; 5) *смешанные жгутики*, когда два или несколько жгутиков расположены в различных точках клетки (рис. 14).

Бактерии, обладающие одним жгутиком, называют *монотрихами* (см. рис. 14), имеющие пучок жгутиков — *лофотрихами*. Число жгутиков у бактерий варьируется в зависимости от вида микроба и условий культивирования, например у спироил (лофотрихи) может быть от 5 до 30 жгутиков, у вибрионов — 1...3, у обыкновенного протей, возбудителя столбняка (перитрихи) — 50...1000 жгутиков.

Жгутики — очень тонкие образования, их поперечный диаметр колеблется в пределах 10...20 нм у простых жгутиков (белковая нить) до 40...60 нм у сложных жгутиков (когда нить дополнительно одета чехлом, например у бактерий родов *Vibrio*, *Vdellovibrio*, *Proteus*). Наблюдать жгутики можно при темнопольной микроскопии (например, у спироил), фазово-контрастной микроскопии, с использованием специальных сложных методов окрашивания с применением протравы (например, танина, который увеличивает диаметр жгутиков и повышает их сродство к краскам), электронной микроскопии. Наиболее ценные данные

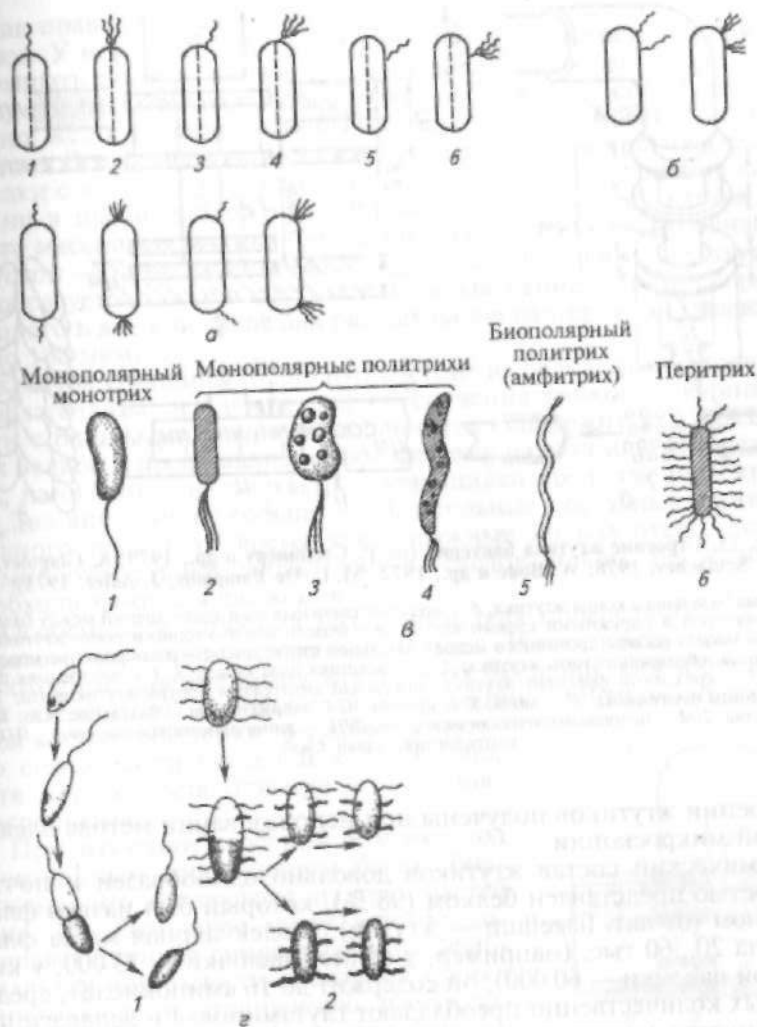


Рис. 14. Жгутики бактерий:

a — монополярное и биполярное расположение жгутиков: 1 — полюсные монотрихи; 2 — полюсные лофотрихи; 3 — подполюсные монотрихи; 4 — подполюсные лофотрихи; 5 — боковые монотрихи; 6 — боковые лофотрихи; *b* — смешанное расположение жгутиков: *a* — типы жгутования: 1 — *Vibrio*; 2 — *Pseudomonas*; 3 — *Chromatium*; 4 — *Thiospirillum*; 5 — *Spirillum*; 6 — *Proteus*; *z* — распределение и образование жгутиков во время деления клетки: 1 — монополярный монотрих; 2 — перитрих

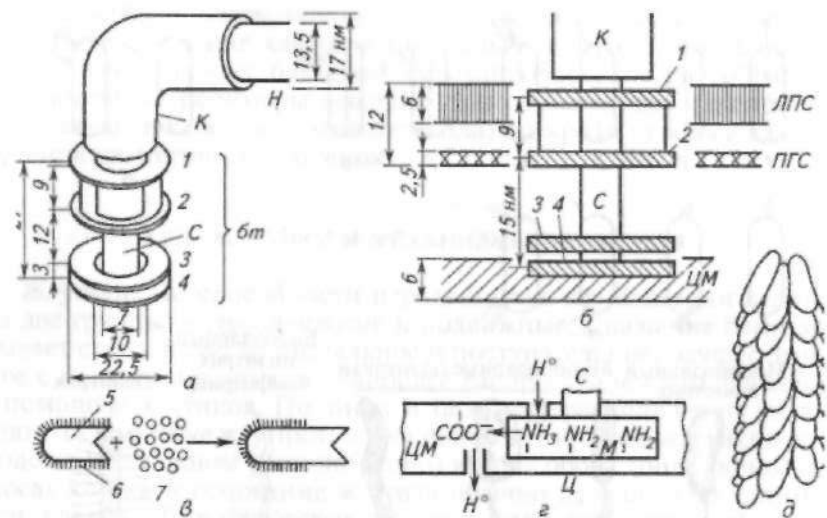


Рис. 15. Строение жгутика бактерий (по Р. Стейннеру и др., 1979; А. Glagolev, V. Sculachev, 1978; W. Bode и др., 1972, M. L. De Pamphilis, J. Adler, 1971):

a — схема базального конца жгутика; *б* — модель возможных взаимоотношений между базальной структурой и наружными слоями клетки; *в* — модель одновекторного роста жгутика *in vitro*; *г* — модель работы протонного мотора базальной структуры; *д* — расположение молекул флагеллина, образующих нить жгутика; 1, 2 — внешняя пара колец; 3, 4 — внутренняя пара колец; 5 — срезанный фрагмент жгутика, покрытый антителами против жгутиков (6); 7 — субъединицы флагеллина; *H* — нить; *K* — крючок; *C* — стержень; *бт* — базальное тело; *Ц* — цитоплазма; *ЦМ* — цитоплазматическая мембрана; *ЛПС* — липополисахаридный слой; *ПГС* — пептидогликановый слой

о строении жгутиков получены при использовании метода электронной микроскопии.

Химический состав жгутиков довольно однообразен и почти полностью представлен белком (98%), который был назван флагеллином (от лат. *flagellum* — жгутик). Молекулярная масса флагеллина 20...60 тыс. (например, у сенной палочки — 33 000, у кишечной палочки — 60 000), он содержит до 16 аминокислот, среди которых количественно преобладают глутаминовая и аспарагиновая, имеется незначительное количество ароматических аминокислот и отсутствуют триптофан, цистеин, цистин. Флагеллин обладает антигенной специфичностью (его называют Н-антигеном). Четвертичная структура флагеллина представляется полым цилиндром, стенки которого, как полагают, могут быть «выстланы» глобулярными субъединицами белка под углом к оси жгутика (рис. 15), спирально и в виде прямых тяжей, например у *Salmonella typhimurium*. В противоположность жгутикам водорослей и простейших жгутики бактерий не обладают АТФазной активностью.

Как правило, толщина жгутика — 10...20 нм, длина — от 3 до 15 мкм. У некоторых бактерий длина жгутика может на порядок превышать диаметр клетки. Полярные жгутики обычно более толстые, чем перитрихальные. Жгутик представляет собой относительно жесткую спираль. Жгутик закручен против часовой стрелки. Вращение жгутика также осуществляется против часовой стрелки с частотой от 40 до 60 об/с, что вызывает вращение клетки, но в противоположном направлении. Поскольку клетка намного массивнее жгутика, она вращается со значительно меньшей частотой — от 12 до 14 об/мин. Вращательное движение жгутика преобразуется также в поступательное движение клетки, скорость которого в жидкой среде для разных видов бактерий составляет от 16 до 100 мкм/с.

Крючок (толщина 20...45 нм) состоит из белка, отличающегося от флагеллина, и служит для обеспечения гибкого соединения нити с базальным телом. Базальное тело содержит 9...12 различных белков и представляет собой систему из двух или четырех колец, нанизанных на стержень, являющийся продолжением крючка. Два внутренних кольца — обязательные составные части базального тела, в то время как наружные кольца отсутствуют у грамположительных эубактерий и, следовательно, не являются необходимыми для движения.

Особенности строения базального тела определяются, таким образом, строением клеточной стенки. Интактность последней необходима для движения жгутиковых бактерий. Обработка клеток лизоцимом, приводящая к удалению пептидогликанового слоя клеточной стенки, вызывает и потерю способности бактерий к движению, хотя жгутики остаются при этом неповрежденными.

При изучении строения жгутика под электронным микроскопом было обнаружено, что он состоит из трех частей (рис. 16). Основную массу жгутика составляет длинная спиральная нить (фибрилла), у поверхности клеточной стенки переходящая в утолщенную изогнутую структуру — крючок. Нить при помощи крючка прикреплена к базальному телу, «вмонтированному» в ЦПМ и клеточную стенку. У большинства прокариот нить состоит из белка только одного типа — флагеллина. Белковые субъединицы уложены в виде спирали, внутри которой проходит полый канал. Нарастивание жгутика происходит с дистального конца, куда субъединицы поступают по

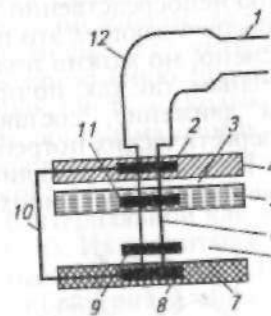


Рис. 16. Строение жгутика грамтрихальных эубактерий:

1 — нить; 2 — L-кольцо; 3 — периплазматическое пространство; 4 — наружная мембрана; 5 — пептидогликановый слой; 6 — стержень; 7 — ЦПМ; 8 — M-кольцо; 9 — S-кольцо; 10 — базальное тело; 11 — P-кольцо; 12 — крючок

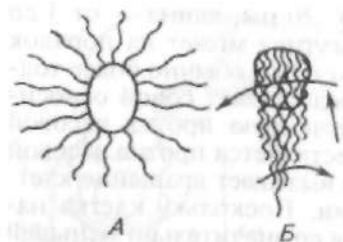


Рис. 17. Клетка *Salmonella typhimurium* в состоянии покоя (А) и при движении (Б). Стрелками показано направление вращения и движения клетки

вращаться в противоположном направлении, начинающей вращаться в противоположном направлении, и обеспечивающей эффективное движение (плавание) в жидкой среде и более медленное перемещение по поверхности твердых сред.

Для работы двигательного аппарата прокариот необходима энергия. Установлено, что движение жгутиковых прокариот обеспечивается энергией трансмембранного электрохимического потенциала ($\Delta\mu_{H^+}$), причем обе его составляющие — электрическая ($\Delta\psi$) и химическая (ΔpH) — поддерживают движение. Скорость вращения жгутиков прямо зависит от величины мембранного потенциала. Таким образом, прокариотическая клетка обладает механизмом, позволяющим превращать электрохимическую энергию непосредственно в механическую. Молекулярное устройство, обеспечивающее это превращение, к настоящему времени не выяснено, но можно полагать, что оно должно быть весьма эффективным, так как, по проведенным расчетам, энергия, расходуемая на движение, составляет десятые доли процента от общих энергетических потребностей клетки.

Необычная локализация структур, ответственных за движение, описана у спирохет (рис. 18). Трехслойная структура, окру-

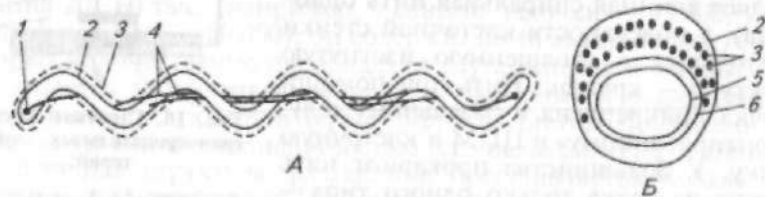


Рис. 18. Клетка спирохеты в продольном и поперечном разрезах:

А — продольный разрез; клетка, содержащая по одной аксиальной фибрилле у каждого конца; Б — поперечный разрез, прошедший через среднюю часть клетки, где показаны два пересекающихся пучка, состоящих из множества аксиальных фибрилл; 1 — место прикрепления аксиальных фибрилл; 2 — протоплазматический цилиндр; 3 — наружный чехол; 4 — аксиальные фибриллы; 5 — ЦПМ; 6 — пептидогликановый слой клеточной стенки;

внутреннему каналу. У некоторых видов жгутик снаружи дополнительно покрыт чехлом особого химического строения или же являющимся продолжением клеточной стенки и, вероятно, построенным из того же материала.

Большие успехи достигнуты в расшифровке механизма движения прокариот, имеющих жгутики. Если в клетке много жгутиков, все они при движении собираются в пучок, вращаясь в одном направлении (рис. 17). Вращение жгутиков передается клетке, начинающей вращаться в противоположном направлении, и обеспечивающей эффективное движение (плавание) в жидкой среде и более медленное перемещение по поверхности твердых сред.

жающая клетку и называемая у спирохет наружным чехлом, аналогична наружной мембране клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Этот чехол окружает так называемый протоплазматический цилиндр, состоящий из пептидогликанового слоя клеточной стенки, ЦПМ и цитоплазматического содержимого. Протоплазматический цилиндр обвивается лучком нитчатых структур — аксиальных фибрилл. Число их колеблется от 2 до 100. Один конец каждой аксиальной фибриллы прикреплен вблизи полюса протоплазматического цилиндра, другой — свободный. Клетка содержит по два набора фибрилл, прикрепленных субполярно у каждого ее конца. Так как каждая аксиальная фибрилла тянется почти вдоль всей клетки, пучки фибрилл, прикрепленных у разных полюсов, в центральной части перекрываются.

Изучение строения и химического состава аксиальных фибрилл спирохет обнаружило их близкое сходство с бактериальными жгутиками. Отличие заключается в том, что аксиальные фибриллы спирохет — внутриклеточные структуры, но обеспечивают движение как в жидкой среде, так и по твердому субстрату. Движение спирохет осуществляется за счет вращения фибрилл в периплазматическом пространстве между пептидогликановым слоем и наружной мембраной клеточной стенки, вызывающего эластичную волну на поверхности клеточной стенки. Спирохеты совершают движения трех типов: быстро вращаются вокруг длинной оси спирали, способны к изгибанию и осуществляют передвижение по винтовому или волнообразному пути.

Присущая спирохетам локализация двигательного аппарата интересна тем, что позволяет сделать вывод о возможности его работы в условиях нахождения в «закрытом» клеточными структурами состоянии. Это может служить ключом к пониманию еще одного вида движения, свойственного части прокариот, — скольжения. Последнее определяют как способность организма передвигаться по твердому или полужидкому субстрату без помощи наружных локомоторных структур — жгутиков.

Ворсинки. К поверхностным структурам бактериальной клетки относятся также ворсинки и пили (см. рис. 6, б). Их насчитывается от нескольких единиц до нескольких тысяч на клетку. Эти структуры не имеют отношения к движению бактерий и обнаружены у подвижных и неподвижных форм.

Ворсинки (от лат. *fimbriae* — нить, бахрома, волокно) отличаются от жгутиков рядом особенностей: они короче (0,3...1 мкм, редко до 4 мкм), толще, не согнуты волнообразно, многочисленны (от 200 до нескольких тысяч), обнаружены у подвижных и неподвижных клеток, не выполняют функции движения. Они кодируются генами хромосомы, состоят из гидрофобного белка — пилина. Ворсинки снижают электрофоретическую подвижность клетки, расположены по всей поверхности клеточной стенки, служат для

соединения клеток, защищают клетку от паразитов, препятствуя их непосредственному контакту с поверхностью клетки-хозяина. Некоторые ворсинки кодируются плазмидными генами. Они могут быть одним из факторов патогенности, например, ворсинками клетки кишечной палочки прикрепляются к эпителию. Сократимые полярные пили, возможно, обуславливают дергающееся движение бактерий (медленное периодическое перемещение клеток и колоний по поверхности плотной среды), подобное амебoidному движению эукариот.

Строение и функции пилей различны, у одной и той же бактерии могут присутствовать пили разной природы.

F-пили присущи мужским клеткам бактерий. Их образование обусловлено наличием полового фактора. Это полые цилиндрические отростки толщиной 8...35 нм, длиной до 1,0... 2,0 мкм, образованы белком пилином с молекулярной массой 11 800 Да (до 40 000 Да). В пилине отсутствуют пролин, цистеин, гистидин, аргинин, имеется много кислых и гидрофобных аминокислот, ковалентно связан с двумя фосфатными группами и остатком D-глюкозы. Пилин синтезируется на рибосомах, связанных с ЦПМ, и накапливается в ней, на ее поверхности осуществляется сборка трубочек пили. Трубочки проходят через клеточную стенку и выступают наружу. Формируются F-пили только у активно растущей клетки за 4...5 мин и в течение такого же промежутка времени сохраняются на ее поверхности, затем сбрасываются. Половыми ворсинками мужская клетка прикрепляется к женской, образуется конъюгационный тоннель, по которому происходит передача ДНК от донора реципиенту. У бактерий с половыми ворсинками появляется специфический антиген, чувствительность к мужским мелким РНК- и ДНК-содержащим фагам, клетки становятся малоподвижными, способны к автоагглютинации.

4.2.4. МЕМБРАНЫ

Содержимое клетки отделяется от клеточной стенки цитоплазматической мембраной (ЦПМ) — обязательным структурным элементом любой клетки, нарушение целостности которого приводит к потере ею жизнеспособности. На долю ЦПМ приходится 8...15 % сухого вещества клетки. У большинства прокариотических клеток ЦПМ — единственная мембрана. В клетках фототрофных и ряда хемотрофных прокариот содержатся также мембранные структуры, располагающиеся в цитоплазме и получившие название внутрицитоплазматических мембран. Их происхождение и функции будут рассмотрены ниже.

Химический состав мембран. ЦПМ — белково-липидный комплекс, в котором белки составляют 50...75 %, липиды — от 15 до

45 %. Кроме того, в составе мембран обнаружено небольшое количество углеводов. Как правило, липиды и белки составляют 95 % и больше вещества мембран. Главным липидным компонентом бактериальных мембран являются фосфолипиды — производные 3-фосфоглицерина. Хотя у прокариот найдено множество различных фосфолипидов, набор их в значительной степени родо- и даже видоспецифичен. Широко представлены в бактериальных мембранах различные гликолипиды. Стерины отсутствуют у подавляющего большинства прокариот, за исключением представителей группы микоплазм и некоторых бактерий. Из других групп липидов в мембранах прокариот обнаружены каротиноиды, хиноны, углеводороды.

Все липиды эубактерий — производные глицерина — содержат один или несколько остатков жирных кислот, состав которых весьма своеобразен. В основном это насыщенные или мононенасыщенные жирные кислоты с 16...18 углеродными атомами. Поскольку ЦПМ прокариот многофункциональна и участвует в осуществлении разнообразных ферментативных процессов, был сделан вывод, что мембранные белки — это, как правило, ферменты. По аминокислотному составу мембранные белки не отличаются от других клеточных белков, за исключением того, что в них содержится мало (иногда следы) цистеина.

Структура мембран. Мембранные липиды всех эубактерий и части архебактерий образуют бислой, в которых гидрофильные «голова» молекул обращены наружу, а гидрофобные «хвосты» погружены в толщу мембраны (рис. 19). Углеводородные цепи, прилегающие к гидрофильным «головам», довольно жестко фиксированы, а более удаленные части «хвостов» обладают достаточной гибкостью. У некоторых архебактерий (ряд метаногенов, термоацидофилы) мембранные липиды, в состав которых входит C₄₀-спирт, формируют монослойную мембрану, по толщине равную бислою. Монослойные липидные мембраны обладают большей жесткостью сравнительно с бислоем. При «биологических» температурах мембранные липиды находятся в жидкокристаллическом состоянии, характеризующемся частичной упорядоченностью структуры. При понижении температуры они переходят в квазикристаллическое состояние.

В отличие от липидов у мембранных белков нет единого способа структурной организации. От 30 до 50 % белков имеют конфигурацию α -спирали, остальная часть находится преимущественно в виде беспорядочного клубка.

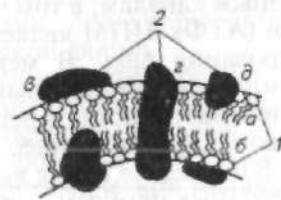


Рис. 19. Модель строения элементарной биологической мембраны:

1 — молекулы липидов: а — гидрофильная «голова»; б — гидрофобный «хвост»; 2 — молекулы белков: в — поверхностная; г — интегральная; д — периферическая

Вероятно, некоторые белки лишены ферментативной активности и участвуют только в поддержании мембранной структуры. В то же время доказано, что для осуществления белками определенных функций необходима их строго упорядоченная взаимная организация в мембране.

Предложено несколько моделей строения мембраны. Наибольшее признание получила модель, учитывающая большинство данных, известных о мембранах, согласно которой в липидную основу включены асимметрично расположенные белковые молекулы (см. рис. 19). Некоторые из них образуют скопления на поверхности липидного би- или монослоя, другие частично или полностью погружены в него, третьи пронизывают его насквозь. В модели подчеркнута асимметрия строения мембраны, основанная на различиях в химическом строении и расположении молекул белка.

Функции ЦПМ прокариот. ЦПМ прокариот выполняет разнообразные функции, в основном обеспечиваемые локализованными в ней соответствующими ферментными белками. Первоначально была постулирована барьерная функция клеточной мембраны, получившая позднее экспериментальное подтверждение. С помощью специальных переносчиков, называемых транслоказами, через мембрану осуществляется избирательный перенос различных органических и неорганических молекул и ионов. В ней локализованы ферменты, катализирующие конечные этапы синтеза мембранных липидов, компонентов клеточной стенки и некоторых других веществ.

Общепризнана роль ЦПМ прокариот в превращениях клеточной энергии. У бактерий, источником энергии для которых служат процессы дыхания или фотосинтеза, в ЦПМ определенным образом расположены переносчики цепи электронного транспорта, функционирование которых приводит к генерированию электрохимической энергии ($\Delta\mu_{h+}$), используемой затем в клетке по разным каналам, в том числе и для образования химической энергии (АТФ). ЦПМ является одним из компонентов аппарата генерирования $\Delta\mu_{h+}$. В мембране расположены также ферментные комплексы, обеспечивающие превращения $\Delta\mu_{h+} \rightleftharpoons \text{АТФ}$. ЦПМ принимает участие в репликации и последующем разделении хромосомы прокариотической клетки.

В последнее время выявляется еще одна функциональная грань клеточных мембран — их интегрирующая роль в организме, вполне сочетающаяся с давно установленной разъединяющей (барьерной) функцией. Клетка — единое целое. В обеспечении этого принципа клеточной организации важная роль принадлежит мембранам. Установлено, что вдоль мембран осуществляется перенос электрохимической энергии и электронов. Мембраны рассматриваются так же как возможные пути транспорта жирорастворимых субстратов и молекулярного кислорода.

ЦПМ служит основным барьером, обеспечивающим избирательное поступление в клетку и выход из нее разнообразных веществ и ионов. У грамположительных форм ЦПМ является и единственным барьером такого рода, у грамотрицательных зубактерий функции дополнительного барьера (молекулярного «сита») выполняет наружная мембрана клеточной стенки, через которую молекулы транспортируются только по механизму пассивной диффузии.

Как правило, гидрофильные вещества поступают в клетку за счет функционирования систем, в состав которых входят специальные переносчики (транслоказы, или пермеазы), так как скорость физической диффузии этих веществ через гидрофобный слой мембраны очень невелика. Переносчики — вещества белковой природы, локализованные в мембране и характеризующиеся высокой субстратной специфичностью, — связываясь с субстратом, подвергаются конформационным изменениям и вследствие этого приобретают способность к перемещению субстрата с одной стороны ЦПМ на другую.

Известен механизм транспорта, получивший название облегченной диффузии, требующий для переноса веществ через мембрану участия транслоказ. Перенос веществ в этом случае происходит по градиенту их концентрации и не требует энергетических затрат. Этот механизм транспорта не получил широкого распространения у прокариот. Основным механизмом избирательного переноса веществ через ЦПМ прокариот является активный транспорт, позволяющий «накачивать» в клетку молекулы и ионы против их концентрационных и электрических градиентов. Этот процесс, так же как и облегченная диффузия, протекает при участии локализованных в ЦПМ переносчиков белковой природы с высокой специфичностью к субстрату, но в отличие от облегченной диффузии для движения против электрохимического градиента требует затрат метаболической энергии. Транспорт такого рода должен быть поэтому сопряжен с реакциями, продуцирующими энергию в химической или электрохимической форме.

Во всех описанных выше путях переноса веществ через ЦПМ они поступают в клетку в химически неизменном виде. У прокариот известны системы транспорта, посредством которых осуществляется поступление в клетку ряда сахаров, при этом процесс их переноса через мембрану сопровождается химической модификацией молекул. Так происходит, например, поступление в клетки многих прокариот молекул глюкозы, в процессе которого они фосфорилируются.

Внутрицитоплазматические мембраны прокариот. Различают несколько видов внутрицитоплазматических мембран. Развитая система внутрицитоплазматических мембран характерна для большинства фотосинтезирующих зубактерий. Поскольку было показано, что в этих мембранах локализован фотосинтетический аппа-

рат клетки, они получили общее название *фотосинтетических мембран*.

У прокариот, принадлежащих к разным группам, описаны локальные впячивания ЦПМ, получившие название *мезосом* (см. рис. 6).

Эти внутриклеточные мембранные образования впервые были описаны у *Bacillus cereus*. По морфологическим особенностям различают ламеллярные (пластинчатые), везикулярные (имеющие форму пузырьков), тубулярные (трубчатые) мезосомы (рис. 20). Часто в бактериальной клетке наблюдаются мезосомы смешанного типа, состоящие из ламелл, трубочек, пузырьков — мезосомные комплексы. Мезосомный комплекс (см. рис. 20) ограничен инвагинацией ЦПМ мешковидной формы, содержит ветвящиеся внутренние трубочки и пластинчатые мембраны.

Хорошо развитые и сложно организованные мезосомы характерны для грамположительных эубактерий. У грамотрицательных видов они встречаются значительно реже и относительно просто организованы. По расположению в клетке различают мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования поперечной перегородки (септы), мезосомы, к которым прикреплен

нуклеоид, и мезосомы, сформированные в результате инвагинации периферических участков ЦПМ.

Существуют разные точки зрения относительно роли мезосом в клетке. Согласно одной из них мезосомы не являются обязательной структурой, а служат только для усиления определенных клеточных функций, увеличивая общую «рабочую» поверхность мембран. Получены данные о том, что с мезосомами связано усиление энергетического метаболизма клеток. Мезосомы играют роль в репликации хромосомы и ее последующем расхождении по дочерним клеткам, участвуют в процессе инициации и формирования поперечной перегородки при клеточном делении. Для некоторых грамположительных бактерий обнаружено участие мезосом в секреторных процессах.

Высказывается также предположение, что мезосомы не при-

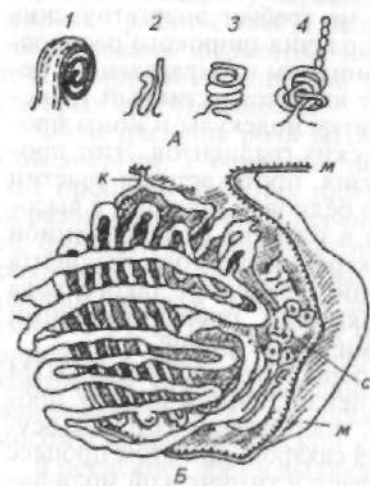


Рис. 20. Типы истинных мезосом (А) и строение мезосомного комплекса (Б) (по В. И. Бирюзовой, М. Н. Поглазовой, 1977; I. Burdett, 1972):

1 — ламеллярные; 2...4 — тубулярные; к — контакт внутренних мембран с мембраной мешочка; м — мембрана, окружающая мешочек; с — скопление пластинчатых мембранных элементов

нимают активного участия в процессах клеточного метаболизма, но выполняют структурную функцию, обеспечивая компартментализацию прокариотической клетки, т. е. пространственное разграничение внутриклеточного содержимого на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для последовательного протекания определенных ферментативных реакций.

4.2.5. ЦИТОПЛАЗМА И РИБОСОМЫ

Содержимое клетки, окруженное ЦПМ, называется цитоплазмой. Фракция цитоплазмы, имеющая гомогенную консистенцию и содержащая набор растворимых РНК, ферментных белков, продуктов и субстратов метаболических реакций, получила название *цитозоля*. Другая часть цитоплазмы представлена разнообразными структурными элементами: внутрицитоплазматическими мембранами (если они есть), генетическим аппаратом, рибосомами и включениями разной химической природы и функционального назначения.

Рибосомы — место синтеза белка — рибонуклеопротеидные частицы размером 15...20 нм. Их число в клетке зависит от интенсивности процессов белкового синтеза и колеблется от 5000 до 90 000. Общая масса рибосом может составлять примерно $\frac{1}{4}$ клеточной массы, а количество рибосомальной РНК (рРНК) — 80...85 % всей бактериальной РНК. Отношение рРНК : белок в рибосомах *E. coli* составляет 2:1, у других прокариот оно может быть несколько сдвинуто в сторону преобладания белка. Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S¹, отчего получили название 70S-частиц. Они построены из двух неодинаковых субчастиц: 30S- и 50S-субъединиц. 30S-Субъединица содержит одну молекулу 16S-рРНК и в большинстве случаев по одной молекуле белка более 20 видов. 50S-Субъединица состоит из двух молекул рРНК (23S и 5S). В ее состав входят более 30 различных белков, также представленных, как правило, одной копией. Большая часть рибосомальных белков выполняет структурную функцию.

Синтез белка осуществляется агрегатами, состоящими из рибосом, молекул информационной и транспортных РНК и называемыми полирибосомами, или полисомами. Последние могут находиться в цитоплазме или же быть связанными с мембранными структурами.

4.2.6. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АППАРАТ И РЕПЛИКАЦИЯ ХРОМОСОМЫ

Строение генетического аппарата прокариот долгое время было предметом жарких дискуссий, суть которых сводилась к тому, есть у них такое же ядро, как у эукариот, или нет. Установ-

¹ Константы седиментации, характеризующие скорость, с которой эти частицы осаждаются при центрифугировании в определенных стандартных условиях.

лено, что генетический материал прокариотических организмов, как и эукариотических, представлен ДНК, но имеются существенные различия в ее структурной организации. У прокариот ДНК представляет собой более или менее компактное образование, занимающее определенную область в цитоплазме и не отделенное от нее мембраной, как это наблюдается у эукариот. Чтобы подчеркнуть структурные различия в генетическом аппарате прокариотических и эукариотических клеток, предложено у первых его называть *нуклеоидом* в отличие от ядра у вторых.

При электронно-микроскопическом наблюдении видно, что нуклеоид прокариот, несмотря на отсутствие ядерной мембраны, довольно четко отграничен от цитоплазмы, занимает в ней, как правило, центральную область и заполнен нитями ДНК диаметром около 2 нм. Не исключено, что на выявляемую в электронном микроскопе организацию хромосомы большое влияние оказывают условия фиксации препарата. По имеющимся наблюдениям, в живой прокариотической клетке нуклеоид занимает больше места в цитоплазме.

Вся генетическая информация прокариот содержится в одной молекуле ДНК, имеющей форму ковалентно замкнутого кольца и получившей название *бактериальной хромосомы*¹. Длина молекулы в развернутом виде может составлять более 1 мм, т. е. почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки. Длительное время считали, что в распределении нитей ДНК бактериальной хромосомы не прослеживается никакой закономерности. Однако если исходить из того, что молекула ДНК образует беспорядочный клубок, трудно объяснить процесс репликации и последующее распределение образовавшихся хромосом по дочерним клеткам. Специальные исследования показали, что хромосомы прокариот представляют собой высокоупорядоченную структуру, имеющую константу седиментации 1300...2000S для свободной и 3200...7000S для связанной с мембраной формы. В том и другом случае часть ДНК в этой структуре представлена системой из 20...100 независимо суперспирализованных петель. В обеспечении суперспирализованной организации хромосом участвуют молекулы РНК.

Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах $(1...3) \cdot 10^9$. У микоплазм генетический материал представлен молекулами, имеющими наименьшее для клеточных организмов количество ДНК $(0,4...0,8) \cdot 10^9$, а наибольшее содержание ДНК обнаружено у нитчатых цианобактерий $(8,5 \cdot 10^9)$. Хотя каждая прокариотическая клетка содержит 1 хромосому, часто в экспоненциально растущей культуре количество ДНК на клетку может достигать массы 3, 4, 8 и более хромосом. Нередко в

клетках при действии на них определенных факторов (температура, pH среды, ионизирующее излучение, соли тяжелых металлов, некоторые антибиотики и др.) происходит образование множества копий хромосомы. При устранении воздействия этих факторов, а также после перехода в стационарную фазу в клетках, как правило, обнаруживается по одной копии хромосомы.

Из изложенного выше следует, что термины «нуклеоид» и «хромосома» не всегда совпадают. В зависимости от условий нуклеоид прокариотической клетки может состоять из одной или некоторого числа копий хромосомы.

ДНК прокариот построена так же, как и ДНК эукариот (рис. 21). Молекула ДНК несет множество отрицательных зарядов, поскольку каждый фосфатный остаток содержит ионизированную гидроксильную группу. У эукариот отрицательные заряды нейтрализуются образованием комплекса ДНК с основными белками — гистонами. В клетках подавляющего большинства прокариот не обнаружено гистонов, поэтому нейтрализация зарядов осуществляется взаимодействием ДНК с полиаминами (спермином и спермидином), а также с ионами Mg^{2+} . Содержание пар оснований А + Т и Г + Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком. У прокариот молярная доля ГЦ в ДНК колеблется в очень широких пределах: от 23 до 75 %.

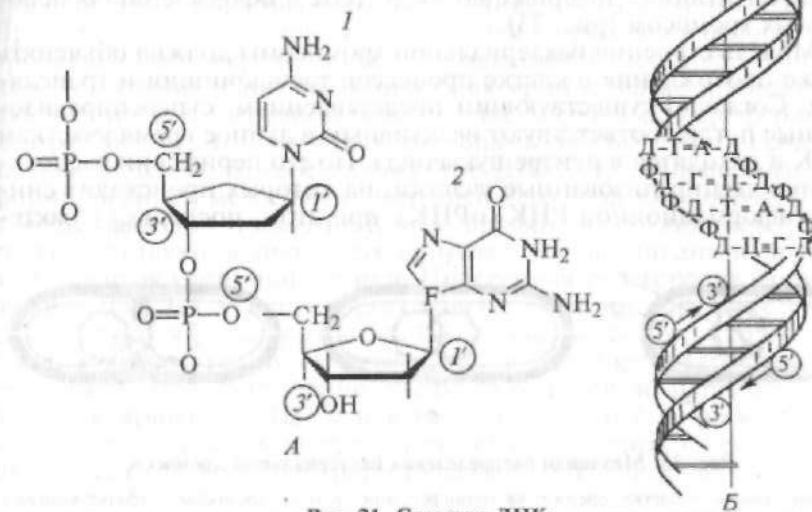


Рис. 21. Строение ДНК:

А — фрагмент нити ДНК, образованной чередующимися остатками дезоксирибозы и фосфорной кислоты. К первому углеродному атому дезоксирибозы присоединено азотистое основание: 1 — цитозин; 2 — гуанин; Б — двойная спираль ДНК: Д — дезоксирибоза; Ф — фосфат; А — аденин; Т — тимин; Г — гуанин; Ц — цитозин

¹ В прокариотической клетке ДНК может находиться и вне бактериальной хромосомы — в плазмиде, но последние не являются обязательными клеточными компонентами.

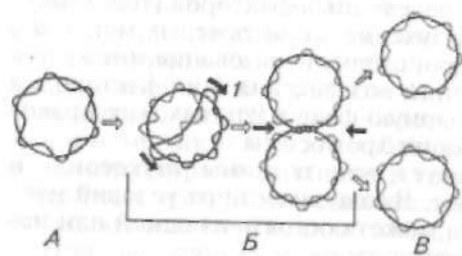


Рис. 22. Репликация кольцевой бактериальной хромосомы в двух направлениях:

А — родительская молекула ДНК; Б — промежуточные репликационные формы; В — дочерние молекулы ДНК после завершения процесса репликации и расхождения; 1 — точка начала репликации. Черными стрелками показано направление репликации

Деление молекулы ДНК (репликация) происходит по полуконсервативному механизму и в норме всегда предшествует делению клетки. При помощи электронного микроскопа установлено, что репликация ДНК начинается в точке прикрепления кольцевой хромосомы к ЦПМ, где локализован ферментативный аппарат, ответственный за репликацию. Часто можно обнаружить, что контакт ДНК с ЦПМ осуществляется посредством мезосом. Репликация, начавшаяся в точке прикрепления, идет затем в двух противоположных направлениях, образуя характерные для кольцевой хромосомы промежуточные структуры (рис. 22). Возникающие дочерние хромосомы остаются прикрепленными к мембране. Репликация молекул ДНК происходит параллельно с синтезом мембраны в области контакта ДНК с ЦПМ. Это приводит к разделению (сегрегации) дочерних молекул ДНК и оформлению обособленных хромосом (рис. 23).

Модель строения бактериальной хромосомы должна объяснять также прохождение в клетке процессов транскрипции и трансляции. Согласно существующим представлениям, суперспирализованные петли соответствуют неактивным в данное время участкам ДНК и находятся в центре нуклеоида. По его периферии располагаются деспирализованные участки, на которых происходит синтез информационной РНК (иРНК), при этом, поскольку у бакте-

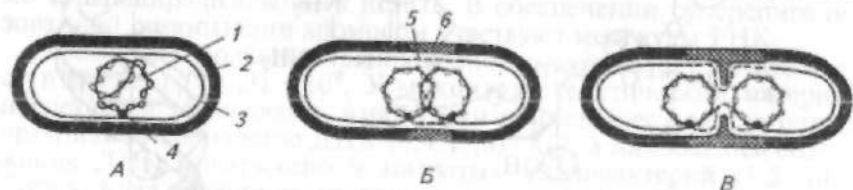
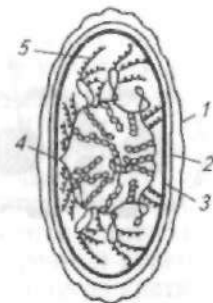


Рис. 23. Механизм распределения бактериальных хромосом:

А — бактериальная клетка содержит частично реплицированную хромосому, прикрепленную к мембране в точке (или точках) репликации; Б — репликация хромосомы завершена. В бактериальной клетке две дочерние хромосомы, каждая из которых прикреплена к ЦПМ. Показан синтез клеточной стенки и ЦПМ; В — продолжающийся синтез мембраны и клеточной стенки приводит к разделению дочерних хромосом. Показано начало деления клетки путем образования поперечной перегородки; 1 — ДНК; 2 — клеточная стенка; 3 — ЦПМ; 4 — прикрепление хромосомы к ЦПМ; 5 — синтезированный участок ЦПМ; 6 — новый материал клеточной стенки

Рис. 24. Модель организации нуклеоида *E. coli* (по Б. В. Громову, 1985):

1 — наружная мембрана клеточной стенки; 2 — пептидогликановый слой; 3 — ЦПМ; 4 — точка прикрепления бактериальной хромосомы к ЦПМ; 5 — рибосомы, «сядающие» на иРНК. Объяснение см. в тексте



рий процессы транскрипции и трансляции идут одновременно, одна и та же молекула иРНК может быть одновременно связана с ДНК и рибосомами (рис. 24).

4.2.7. РОСТ И СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ

Под ростом прокариотической клетки понимают согласованное увеличение количества всех химических компонентов, из которых она построена. Рост является результатом множества скоординированных биосинтетических процессов, находящихся под строгим регуляторным контролем, и приводит к увеличению массы (а следовательно, и размеров) клетки. Но рост клетки не беспределен. После достижения определенных (критических) размеров клетка начинает делиться.

Типы деления клеток бактерий. Для подавляющего большинства прокариот характерно *равновеликое бинарное поперечное деление*, приводящее к образованию двух одинаковых дочерних клеток. При таком способе деления наблюдается симметрия в отношении продольной и поперечной осей. У большинства грамположительных эубактерий и нитчатых цианобактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущей от периферии к центру (рис. 25, А). Так, у *Bacillus subtilis* в середине клетки сначала появляется кольцевое впячивание ЦПМ, что сопровождается формированием мезосом разного внешнего вида. Они образуются в месте закладки поперечной перегородки, и, по-видимому, активно участвуют в процессах синтеза пептидогликана и других компонентов клеточной стенки. Поперечная перегородка формируется из ЦПМ и пептидогликанового слоя, ее наружные слои синтезируются позднее. Клетки большинства грамотрицательных эубактерий делятся путем перетяжки. У *E. coli* на месте деления обнаруживается постепенно увеличивающееся и направленное внутрь искривление ЦПМ и клеточной стенки (см. рис. 25, Б). Синтез новой клеточной стенки может происходить в нескольких местах или только в зоне формирования поперечной перегородки (см. рис. 25, А, Б).

Вариантом бинарного деления является почкование, которое можно рассматривать как неравновеликое бинарное деление. При почковании на одном из полюсов материнской клетки образуется маленький вырост (почка), увеличивающийся в процессе роста.

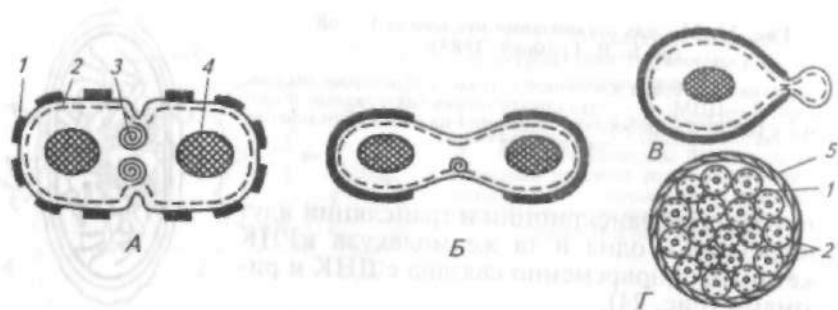


Рис. 25. Способы деления и синтез клеточной стенки у прокариот:

А — деление путем образования поперечной перегородки; Б — деление путем почкования; В — почкование; Г — множественное деление; 1 — клеточная стенка (толстой линией обозначена клеточная стенка материнской клетки, тонкой — заново синтезированная); 2 — ЦПМ; 3 — мембранная структура; 4 — цитоплазма, в центре которой расположен нуклеоид; 5 — дополнительный фибриллярный слой клеточной стенки

Постепенно почка достигает размеров материнской клетки, после чего отделяется от последней. Клеточная стенка почки полностью синтезируется заново (см. рис. 25, В). В процессе почкования симметрия наблюдается в отношении только продольной оси. При равновеликом бинарном делении материнская клетка, делясь, дает начало двум дочерним клеткам и сама, таким образом, исчезает. При почковании материнская клетка дает начало дочерней клетке, и между ними можно в большинстве случаев обнаружить морфологические и физиологические различия: есть старая материнская клетка и новая дочерняя. В этом случае можно наблюдать процесс старения. Так, для некоторых штаммов *Rhodospirillum rubrum* показано, что материнская клетка способна отпочковывать не более четырех дочерних клеток. Дочерние клетки лучше приспосабливаются к меняющимся условиям. Почкование обнаружено в разных группах прокариот: среди фото- и хемотрофов, осуществляющих авто- и гетеротрофный конструктивный метаболизм.

Бинарное деление может происходить в одной или нескольких плоскостях. В первом случае, если после деления клетки не расходятся, это приводит к образованию цепочек палочковидных или сферических клеток, во втором — к клеточным скоплениям разной формы (см. рис. 3, 4...6). Расхождение образовавшихся дочерних клеток происходит в результате лизиса среднего слоя клеточной стенки.

Описано размножение бактерий путем множественного деления. Оно начинается с предварительной репликации хромосомы и увеличения размеров вегетативной клетки, которая затем претерпевает ряд быстрых последовательных бинарных делений, происходящих внутри дополнительного фибриллярного слоя материнской клеточной стенки.

У шаровидных бактерий может образовываться не одна, а несколько поперечных перегородок. Если возникает одна перегородка, то клетка делится в одной плоскости и образуются микрококки, диплококки, стрептококки. Две перегородки располагаются в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, и тогда при делении образуются тетракокки. При расположении перегородок в трех взаимно перпендикулярных плоскостях получают скопления клеток в виде сарцин. Эти способы закладки перегородок являются наследственно закрепленными и используются в систематике бактерий. При делении с образованием поперечной перегородки ЦПМ вместе с клеточной стенкой врастает внутрь клетки, инвагинаты сближаются, соединяются и образовавшаяся перегородка расщепляется. Расщепление клеточной перегородки может происходить по мере ее роста (стрептококки) или быстро, толчком в конце деления (стафилококки) и бывает полным, тогда дочерние клетки расходятся, либо неполным и клетки остаются связанными (стафилококки).

Деление прокариотической клетки начинается, как правило, спустя некоторое время после завершения цикла репликации молекулы ДНК. Вероятно, репликация бактериальной хромосомы запускает какие-то процессы, ведущие к клеточному делению.

Фазы развития бактериальной популяции. Теоретически допустимо, что если бактериям создать условия непрерывного притока и прогрессивного увеличения массы свежей питательной среды и оттока продуктов выделения, то размножение будет возрастать логарифмически, а гибель — арифметически.

Общую закономерность роста и размножения бактериальной популяции представляют графически в виде кривой, которая отражает зависимость логарифма числа живых клеток от времени. Типичная кривая роста (рис. 26) имеет S-образную форму и позволяет различать несколько фаз, следующих в определенной последовательности.

I. Исходная (стационарная, латентная, или фаза покоя). Представляет собой период от момента посева бактерий на питательную среду до начала их роста. В этой фазе число живых бактерий не увеличивается, а может даже уменьшиться. Продолжительность — 1...2 ч (см. рис. 26).

II. Фаза задержки размножения. В этот период бактериальные клетки интенсивно растут, но слабо размножаются. Продолжи-

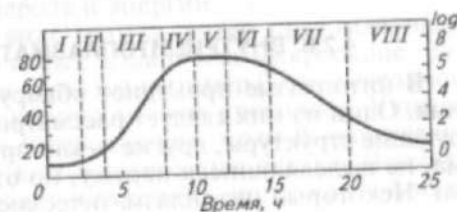


Рис. 26. Фазы роста клеточных культур на питательных средах

тельность этой фазы около 2 ч, что зависит от ряда условий: возраста культуры (молодые культуры приспосабливаются быстрее, чем старые); биологических особенностей микробных клеток (для кишечных бактерий характерен короткий период приспособления, для микобактерий туберкулеза — длительный); полноценности питательной среды; температуры выращивания; концентрации CO_2 , pH; степени аэрации среды; окислительно-восстановительного потенциала и др. Нередко обе фазы объединяют термином «лаг-фаза» (от англ. lag — отставание, запаздывание).

III. Логарифмическая фаза. В этот период скорость размножения клеток и увеличение бактериальной популяции максимальны. Период генерации (от лат. generatio — рождение, воспроизведение), т. е. время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, постоянное для данного вида. Число бактерий в этот период удваивается в геометрической прогрессии. Это означает, что в конце первой генерации из одной клетки формируются две, в конце второй — обе бактерии, разделяясь, образуют четыре, из четырех формируются восемь и т. д. Следовательно, после n генераций количество клеток в культуре будет равно $2n$. Продолжительность фазы — 5...6 ч.

IV. Фаза отрицательного ускорения. Скорость размножения бактерий снижается, число делящихся особей уменьшается, а число погибших увеличивается. Продолжительность фазы — около 2 ч. Одна из возможных причин, замедляющих размножение бактерий, — истощение питательной среды, т. е. исчезновение специфических веществ, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток данного вида.

V. Стационарная фаза максимума. Число новых бактерий почти равно числу отмерших, т. е. наступает равновесие между погибшими и вновь образующимися клетками. Продолжительность фазы — 2 ч.

VI. Фаза ускорения гибели. Прогрессивное преобладание погибших клеток над вновь нарождающимися. Продолжительность фазы — около 3 ч.

VII. Фаза логарифмической гибели. Отмирание клеток происходит с постоянной скоростью. Продолжительность фазы — около 5 ч.

VIII. Фаза уменьшения скорости отмирания. Остающиеся в живых клетки переходят в состояние покоя.

4.2.8. ВНУТРИЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ

В цитоплазме прокариот обнаруживаются различные включения. Одни из них следует рассматривать как активно функционирующие структуры, другие — как продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, но откладывающиеся внутри клетки. Некоторые цитоплазматические включения имеют явно при-

способительное значение. И наконец, многие из них являются запасными веществами, отложение которых клеткой происходит в условиях избытка питательных веществ в окружающей среде, а потребление наблюдается, когда организм попадает в условия голодания.

К числу внутрицитоплазматических включений, выполняющих определенную функцию в фотосинтезе, относятся хлоросомы зеленых бактерий и фикобилисомы цианобактерий. В этих структурах локализованы пигменты, поглощающие кванты света и передающие их в реакционные центры, т. е. выполняющие роль антенны (см. рис. 6). Примером внутрицитоплазматических включений, имеющих приспособительное значение, служат магнитосомы и газовые вакуоли, или аэросомы, обнаруженные у водных прокариот. Газовые вакуоли найдены у представителей, относящихся к 15 таксономическим группам. Это сложно организованные структуры, напоминающие пчелиные соты (см. рис. 6). Состоят из множества регулярно расположенных газовых пузырьков, имеющих форму вытянутого цилиндра с заостренными концами (диаметр — 65...115 нм, длина — 200...1200 нм). Каждый пузырек окружен однослойной белковой мембраной толщиной 2...3 нм, построенной из белковых молекул одного или двух видов, и заполнен газом, состав которого идентичен таковому окружающей среде. Мембрана газовых пузырьков проницаема для газов, но не проницаема для воды. Число газовых пузырьков, составляющих аэросому, у разных видов различно и зависит от внешних условий. Основная функция газовых вакуолей состоит в обеспечении плавучести водных организмов, которые с их помощью могут регулировать глубину, выбирая более благоприятные условия. При увеличении объема и числа газовых пузырьков плотность цитоплазмы уменьшается и клетки перемещаются в верхние слои воды. Сжатие газовых пузырьков, наоборот, приводит к погружению клеток.

Запасные вещества прокариот представлены полисахаридами, липидами, полипептидами, полифосфатами, включениями серы (см. рис. 6). Из полисахаридов в клетках откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество — гранулеза. Последняя — специфический запасной полисахарид анаэробных споровых бактерий группы клостридий. Названные полисахариды построены из остатков глюкозы. В неблагоприятных условиях они используются в качестве источника углерода и энергии.

Липиды накапливаются в виде гранул, резко преломляющих свет и поэтому хорошо различимых в световом микроскопе. Запасным веществом такого рода является полимер β -оксимасляной кислоты, накапливающийся в клетках многих прокариот. У некоторых бактерий, окисляющих углеводороды, поли- β -оксимасляная кислота составляет до 70 % сухого вещества клетки. Отложение липидов в клетке происходит в условиях, когда среда богата

источниками углерода и бедна азотом. Липиды служат для клетки хорошим источником углерода и энергии.

Другой широко распространенный тип запасных веществ многих прокариот — полифосфаты, содержащиеся в гранулах, называемых волютиновыми, или метахроматиновыми, зернами. Используются клетками как источник фосфора. Полифосфаты содержат макроэргические связи и, таким образом, являются депо энергии, хотя считается, что их роль как источника энергии незначительна.

Обращает на себя внимание тот факт, что все запасные вещества представлены в виде высокомолекулярных полимерных молекул, в ряде случаев отграниченных от цитоплазмы белковой мембраной, т. е. находятся в осмотически неактивном состоянии. Это важно, так как в противном случае сосредоточение в цитоплазме большого числа молекул осмотически активных веществ оказало бы на клетку отрицательное действие.

К *морфологически дифференцированным клеткам* разных представителей эубактерий относятся категории покоящихся форм, назначение которых — обеспечить переживание вида в течение длительного времени в неблагоприятных условиях. Это эндоспоры ряда грамположительных бактерий, цисты азотобактера и миксобактерий, акинеты цианобактерий, экзоспоры отдельных представителей метилотрофных и фототрофных бактерий, экзо- и эндоспоры актиномицетов. После попадания в подходящие условия покоящиеся формы прорастают, давая начало вегетативным клеткам.

Цисты (покоящиеся клетки) встречаются у разных групп эубактерий: азотобактера, спирохет, миксобактерий, риккетсий. У большинства миксобактерий образование цист, называемых также миксоспорами, — закономерная стадия их жизненного цикла (рис. 27, А). После окончания стадии активного размножения клетки миксобактерий собираются вместе и образуют так называемые плодовые тела, представляющие собой массу слизи, в которую погружены клетки, или весьма дифференцированные структуры, поднимающиеся над поверхностью субстрата на простых или разветвленных стебельках (рис. 27, Б). Внутри плодовых тел клетки переходят в покоящееся состояние (рис. 28, А).

У одних видов цисты могут морфологически не отличаться от вегетативных клеток, у других их образование сопровождается заметными морфологическими и структурными изменениями: происходит утолщение стенки вегетативной клетки, в результате чего формируются оптически плотные, более сильно преломляющие свет, окруженные капсулой укороченные палочки или сферические формы (рис. 28, Б, В, Г).

У азотобактера образование цист сопровождается изменением морфологии клетки, потерей жгутиков и накоплением в цитоплазме в больших количествах гранул поли-β-оксимасляной кислоты;

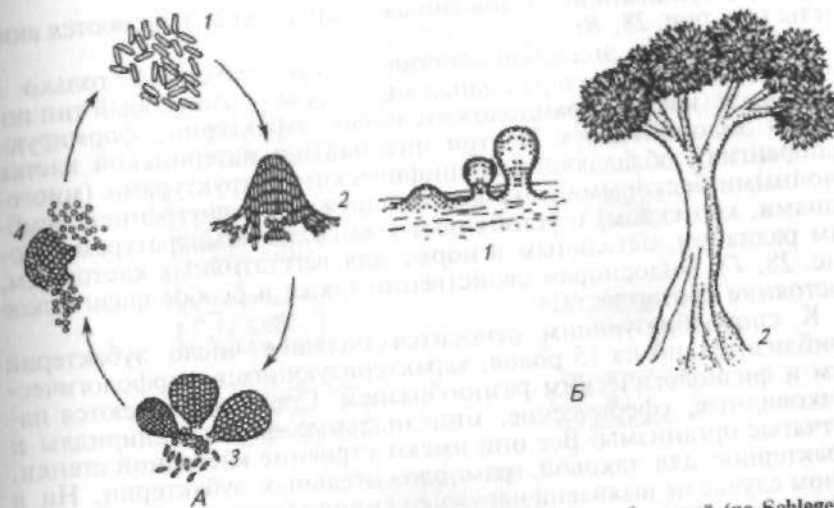


Рис. 27. Цикл развития и плодовые тела некоторых миксобактерий (по Schlegel, 1972):

А — цикл развития *Mucosoccus*: 1 — активно размножающиеся вегетативные клетки; 2 — скопление клеток, предшествующее образованию плодового тела; 3 — плодовое тело; 4 — микроспоры; Б — плодовые тела: 1 — *Mucosoccus*; 2 — *Chondromyces*

одновременно происходит синтез дополнительных клеточных покровов: внешних (экзина) и внутренних (интина) по отношению к клеточной стенке (см. рис. 28, Б), различающихся структурно и химическим составом.

Покоящимися клетками некоторых цианобактерий, обладающими повышенной устойчивостью к ряду неблагоприятных фак-

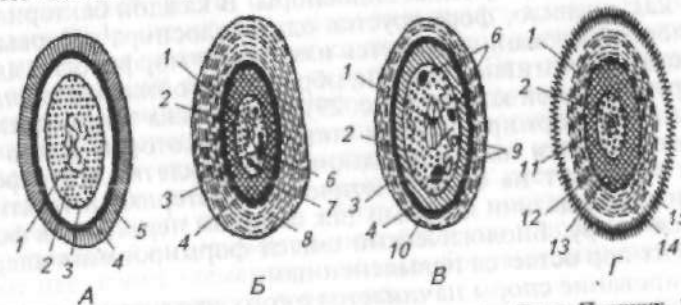


Рис. 28. Строение покоящихся форм прокариот (по Дуде, Проницу, 1981):

А — микроспоры миксобактерий; Б — цисты азотобактера; В — акинеты цианобактерий; Г — эндоспоры; 1 — нуклеоид; 2 — цитоплазма; 3 — ЦПМ; 4 — клеточная стенка; 5 — капсула; 6 — гранулы запасных веществ; 7 — внутренние покровы (интина); 8 — внешние покровы (экзина); 9 — тилакоиды; 10 — чехол; 11 — внутренняя мембрана споры; 12 — наружная мембрана споры; 13 — кортекс; 14 — покровы споры, состоящие из нескольких слоев; 15 — экзоспориум споры

торов (высушиванию, пониженным температурам), являются актинеты (см. рис. 28, В).

Образование эндоспор — процесс, происходящий только в мире прокариот. Бактериальные эндоспоры — это особый тип покоящихся клеток грамположительных эубактерий, формирующихся эндогенно, т. е. внутри цитоплазмы материнской клетки (спорангия), обладающих специфическими структурами (многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом) и устойчивых к высоким температурам и дозам радиации, летальным в норме для вегетативных клеток (см. рис. 28, Г). Эндоспорам свойственно также и особое физическое состояние протопласта.

К спорообразующим относится большое число эубактерий приблизительно из 15 родов, характеризующихся морфологическим и физиологическим разнообразием. Среди них имеются палочковидные, сферические, мицелиальные формы, спирали и нитчатые организмы. Все они имеют строение клеточной стенки, характерное для таковой грамположительных эубактерий. Ни в одном случае не выявлена наружная липополисахаридная мембрана, несмотря на то что многие роды и виды спорообразующих бактерий не окрашиваются по Граму. По типу питания среди них обнаружены хемоорганогетеротрофы, факультативные хемолитоавтотрофы и паразитические формы. Отношение к кислороду также разнообразно: часть спорообразующих форм представлена аэробами и факультативными анаэробами, другая часть включает облигатных анаэробов — от аэротолерантных форм до высокочувствительных к кислороду.

Лучше всего процесс спорообразования изучен у представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*, хотя имеющиеся данные позволяют сделать вывод о принципиальной однотипности этого процесса у всех видов, образующих эндоспоры. В каждой бактериальной клетке, как правило, формируется одна эндоспора¹. Первым шагом к спорообразованию является изменение морфологии ядерного вещества вегетативной клетки, образующего тяж вдоль длинной оси спорулирующей клетки (рис. 29). Часть тяжа затем отделяется и переходит в формирующуюся спору. У некоторых видов ядерный тяж образуется только на одном полюсе клетки, в его формировании участвует не весь генетический материал вегетативной клетки, и впоследствии ядерный тяж целиком переходит в формирующуюся спору. Биологический смысл формирования ядерного тяжа до сих пор остается невыясненным.

Формирование споры начинается с того, что у одного из полюсов клетки происходит уплотнение цитоплазмы, которая вместе с генетическим материалом, представляющим собой одну или не-

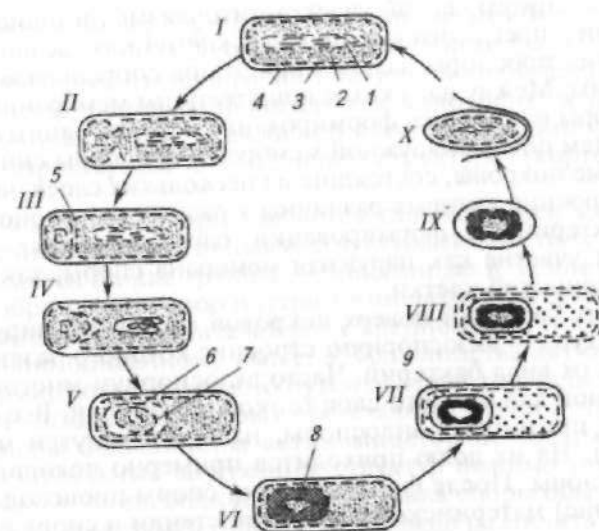


Рис. 29. Формирование эндоспоры спорообразующими бактериями (по Дуде, 1974):

I — вегетативная клетка; II — инвагинация ЦПМ; III — образование споровой перегородки (септы); IV — формирование двойной мембранной системы образующейся споры; V — формирующаяся споры; VI — формирование кортекса; VII — формирование покровов споры; VIII — лизис материнской клетки; IX — свободная зрелая спора; X — прорастание споры; 1 — нуклеоид; 2 — цитоплазма; 3 — ЦПМ; 4 — клеточная стенка; 5 — споровая перегородка; 6 — наружная мембрана споры; 7 — внутренняя мембрана споры; 8 — кортекс; 9 — покровы споры

сколько полностью реплицированных хромосом, обособляется от остального клеточного содержимого с помощью перегородки. Последняя формируется втягиванием внутрь клетки ЦПМ. Мембрана нарастает от периферии к центру, где срастается, что приводит к образованию споровой перегородки. Эта стадия формирования споры напоминает клеточное деление путем образования поперечной перегородки. Следующий этап формирования споры — «обрастание» отсеченного участка клеточной цитоплазмы с ядерным материалом мембраной вегетативной клетки, конечным результатом которого является образование проспоры — структуры, расположенной внутри материнской клетки и полностью отделенной от нее двумя элементарными мембранами: наружной и внутренней по отношению к проспоре.

Описанные выше этапы формирования споры (вплоть до образования проспоры) обратимы. Оказалось, что если к спорулирующей культуре добавить антибиотик хлорамфеникол (ингибитор белкового синтеза и, следовательно, ингибитор синтеза мембранных белков), то можно остановить «обрастание» клеточной мемб-

¹ Описана анаэробная бактерия, образующая в клетке до 3...5 эндоспор.

раной отсеченного септой участка цитоплазмы, и процесс спорообразования превратится в процесс клеточного деления. После образования проспоры дальнейшие этапы спорообразования уже необратимы. Между наружным и внутренним мембранными слоями проспоры начинается формирование кортикального слоя (кортекса). Затем поверх наружной мембраны проспоры синтезируются споровые покровы, состоящие из нескольких слоев, число, толщина и строение которых различны у разных видов спорообразующих бактерий. В формировании слоев споровых покровов принимает участие как наружная мембрана споры, так и протопласт материнской клетки.

У многих бактерий поверх покровов споры формируется еще одна структура — экзоспориум, строение которого различно в зависимости от вида бактерий. Часто экзоспориум многослойный, с характерной для каждого слоя тонкой структурой. Все слои, окружающие протопласт эндоспоры, находятся внутри материнской клетки. На их долю приходится примерно половина сухого вещества споры. После формирования споры происходит разрушение (лизис) материнской клеточной стенки и спора выходит в среду.

Спорообразование сопровождается активным синтезом белка. Белки эндоспор в отличие от белков вегетативных клеток богаты цистеином и гидрофобными аминокислотами, с чем связывают устойчивость спор к воздействию неблагоприятных факторов. Содержание ДНК в споре несколько ниже, чем в исходной вегетативной клетке, поскольку в споре переходит лишь часть генетического материала материнской клетки. Генетический материал поступает в спору в виде полностью реплицированных молекул ДНК. Споры некоторых видов содержат по две или три копии хромосомы. Содержание РНК в спорах ниже, чем в вегетативных клетках, и при спорообразовании РНК в значительной степени синтезируется заново. Одним из характерных процессов, сопровождающих образование эндоспор, является накопление в них *дипиколиновой кислоты* и *ионов кальция* в эквимолярных количествах. Эти соединения образуют комплекс, локализованный в сердцевине споры. Помимо Ca^{2+} в эндоспорах обнаружено повышенное содержание других катионов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+), с которыми связывают пребывание спор в состоянии покоя и их термостойкость.

Существенные отличия эндоспор от вегетативных клеток выявляются при изучении химического состава отдельных споровых структур. Экзоспориум состоит из липидов и белков и, вероятно, выполняет функцию дополнительного барьера, защищающего споры от внешних воздействий, а также регулирующего проникновение в нее различных веществ.

В отличие от эндоспор, образующихся внутри материнской

клетки и окруженных двумя элементарными мембранами, экзоспоры бактерий из рода *Rhodomicrobium* формируются в результате отпочкования от одного из полюсов материнской клетки. Образование экзоспор сопровождается уплотнением и утолщением клеточной стенки. У экзоспор отсутствуют дипиколиновая кислота и характерные для эндоспор структуры (кортекс, экзоспориум).

У актиномицетов споры являются покоящимися клетками и одновременно репродуктивными структурами. По типу образования они делятся на две группы — эндогенные и экзогенные. Эндогенное образование спор внутри цитоплазмы материнских гиф, обнаруженное у представителей рода *Thermoactinomyces*, протекает аналогично описанному выше. У большинства актиномицетов споры формируются экзогенно путем деления гиф перегородками на участки, каждый из которых представляет собой будущую спору. Экзоспоры большинства внутренних структур помимо тех, которые присутствуют в вегетативной клетке. Стенка споры обычно значительно толще, чем стенка гиф, и в ней можно различить несколько слоев разной электронной плотности. Часто клеточная стенка окружена дополнительными наружными покровами.

Покоящиеся клетки зубактерий характеризуются низким уровнем метаболической активности. В первую очередь это касается дыхания. От степени снижения метаболической активности зависит длительность сохранения жизнеспособности покоящимися клетками. Большой интерес представляет выяснение механизмов, ответственных за поддержание специализированных клеток в состоянии покоя. В настоящее время наибольшее внимание привлекают три гипотезы. Первая основана на том, что в покоящихся клетках имеются вещества, ингибирующие ферменты и, следовательно, блокирующие метаболизм. Из спор некоторых бактерий действительно выделены вещества, предотвращающие прорастание спор. Согласно второй гипотезе сохранение покоя связывают со структурой спор, обеспечивающей поддержание ее сердцевины в обезвоженном состоянии. Наконец, поддержание покоя объясняют особым состоянием ферментов. Изменения их конфигурации, приводящие к активированию ферментов, выводят покоящуюся клетку из этого состояния. Возможно, что поддержание специализированных клеток в состоянии покоя — результат совместного действия всех описанных выше механизмов.

Помимо факторов внешней среды, в неодинаковой степени влияющих на формирование разных типов покоящихся клеток, обнаружены специфические вещества, основная функция которых заключается в регулировании роста и развития зубактерий, в частности в индуцировании процессов формирования покоящихся клеток. Такие вещества могут выделяться в культуральную сре-

Глава 5

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОНСТРУКТИВНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРОКАРИОТ

5.1. ВЗАИМОСВЯЗЬ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И КОНСТРУКТИВНОГО МЕТАБОЛИЗМОВ

Образ жизни прокариот состоит в постоянном воспроизводстве своей биомассы. Совокупность протекающих в клетке процессов, обеспечивающих воспроизводство биомассы, называется обменом веществ, или метаболизмом. Клеточный метаболизм складывается из двух имеющих разную направленность потоков реакций: энергетического и конструктивного метаболизма. *Энергетический* метаболизм — это поток реакций, сопровождающихся мобилизацией энергии и преобразованием ее в электрохимическую (D_{e}^+) или химическую (АТФ) форму, которая затем может использоваться во всех энергозависимых процессах. *Конструктивный* метаболизм (биосинтезы) — поток реакций, в результате которых за счет поступающих извне веществ строится вещество клеток; это процесс, связанный с потреблением свободной энергии, запасенной в химической форме в молекулах АТФ или других богатых энергией соединений.

В литературе по микробиологии для обозначения энергетических и конструктивных процессов пользуются также терминами «катаболизм» и «анаболизм», имеющими отношение к распаду или синтезу органических молекул, происходящему соответственно с выделением или потреблением свободной энергии. Следует иметь в виду, что термин «катаболизм» применим для обозначения не всех типов энергетического обмена у прокариот. Существуют группы прокариотических организмов, энергетический метаболизм которых не связан с превращениями органических соединений (прокариоты с фотолито- и хемолитотрофным типом энергетического обмена). По отношению к такого рода энергетическим процессам термин «катаболизм» неприменим. У этих организмов функционирует только один поток превращений органических соединений углерода — анаболический.

Метаболические пути конструктивной и энергетической направленности состоят из множества последовательных ферментативных реакций и могут быть разделены на три этапа. На начальном воздействию подвергаются молекулы, служащие исходными субстратами. Иногда эту часть метаболического пути называют

ду или накапливаться внутри клетки. Установлено, что они способны индуцировать спорообразование.

Сформированные покоящиеся клетки в течение разного времени могут находиться в жизнеспособном состоянии и прорасти в подходящих условиях с образованием активно метаболизирующих вегетативных клеток.

Процесс прорастания эндоспор состоит из нескольких этапов: активации, инициации и выращивания. Эндоспоры могут не прорасти даже в благоприятных условиях. Для этого их необходимо подвергнуть активации. Наиболее общим активирующим фактором является термообработка споровой суспензии.

После этого споры приобретают способность прорасти, но для начала этого процесса необходим химический «пусковой» механизм. В качестве веществ, инициирующих прорастание эндоспор, наиболее эффективны углеводы, некоторые аминокислоты и неорганические ионы.

В целом прорастание — это процесс, сопровождающийся сложными физиологическими и биохимическими изменениями. Начинается он с интенсивного поглощения спорой воды и набухания. На первом этапе прорастания происходит активация ферментов (и в первую очередь литических), резко возрастает дыхание, т. е. мобилизуется энергия, происходят изменения в химическом составе (из спор удаляется дипиколиновая кислота), идет активный синтез белка и РНК, но репликация ДНК начинается не сразу, а через 1...2 ч после начала прорастания споры. Прежде всего происходят процессы репарации повреждений ДНК, произошедших в период покоя споры. За время прорастания споры теряют до $1/3$ первоначальной массы. Последующие этапы состоят в разрушении кортекса, разрыве споровых оболочек, выходе сформировавшейся к этому времени структуры, называемой ростовой трубкой, достраивании ею клеточной стенки и последующем делении сформированной вегетативной клетки.

Контрольные вопросы и задания. 1. Какие вещества входят в состав прокариотической клетки? 2. Перечислите особенности строения клеточной стенки бактерий. 3. Назовите различия капсул бактерий, слизистых слоев и чехлов. 4. В чем особенности генетического аппарата бактерий? 5. Перечислите и опишите внутриплазматические включения бактерий.

периферическим метаболизмом, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата, — периферическими. Последующие превращения включают ряд ферментативных реакций и приводят к образованию промежуточных продуктов, или метаболитов, а сама цепь превращений объединяется под названием промежуточного метаболизма.

Образующиеся на последних этапах конечные продукты конструктивных путей метаболизма используются для построения вещества клеток, а продукты энергетических путей метаболизма выделяются в окружающую среду.

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. Однако у некоторых прокариотических организмов можно выделить последовательности реакций, служащих только для получения энергии или только для биосинтеза.

Связь между конструктивными и энергетическими процессами прокариот осуществляется по нескольким каналам. Основной из них — энергетический. Определенные реакции служат источником энергии, необходимой для биосинтеза и других энергозависимых клеточных функций. Помимо энергии биосинтетические реакции нередко нуждаются в поступлении извне восстановителя в виде водорода (электронов), источником которого также служат реакции энергетического метаболизма. И наконец, тесная связь между энергетическими и конструктивными процессами проявляется в том, что определенные промежуточные этапы или метаболиты обоих путей могут быть одинаковыми (хотя направленность потоков реакций, относящихся к каждому из путей, различна). Это создает возможность для использования общих промежуточных продуктов в каждом из метаболических путей. Промежуточные соединения такой природы предложено называть *амфиболитами*, а промежуточные реакции, одинаковые для обоих потоков, — *амфиболическими*.

Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием, которое есть результат способности этих форм жизни использовать в качестве веществ тела самый широкий набор органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных периферических ферментов, воздействующих на исходные субстраты и видоизменяющих их молекулы в направлении, позволяющем им далее метаболизироваться по каналам промежуточного метаболизма. В отличие от периферического промежуточного метаболизма прокариот не отличается существенным разнообразием, хотя сравнительно с таковым эукариотических организмов он состоит из большего числа вариантов.

5.2. ПОТРЕБНОСТИ ПРОКАРИОТ В ПИТАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВАХ

Мономеры, необходимые для построения основных клеточных компонентов, могут быть синтезированы клеткой или поступать в готовом виде из среды. Чем больше готовых соединений должен получать организм извне, тем ниже уровень его биосинтетических способностей, так как химическая организация всех свободноживущих форм одинакова.

5.2.1. ИСТОЧНИКИ УГЛЕРОДА

В конструктивном метаболизме основная роль принадлежит углероду, поскольку все соединения, из которых построены живые организмы, — это соединения углерода. Их известно около миллиона. Прокариоты способны воздействовать на любое известное углеродное соединение, т. е. использовать его в своем метаболизме. В зависимости от источника углерода для конструктивного метаболизма все прокариоты делятся на две группы: *автотрофы*, к которым принадлежат организмы, способные синтезировать все компоненты клетки из углекислоты, и *гетеротрофы*, источником углерода для конструктивного метаболизма которых служат органические соединения¹. Понятия «автотрофия» и «гетеротрофия» характеризуют, таким образом, тип конструктивного метаболизма. Если автотрофия — довольно четкое и узкое понятие, то гетеротрофия — понятие весьма широкое и объединяет организмы, резко различающиеся своими потребностями в питательных веществах.

Наибольшая степень гетеротрофности присуща прокариотам, относящимся к *облигатным внутриклеточным паразитам*, т. е. организмам, которые могут жить только внутри других живых клеток. Паразитический образ жизни привел к редукции некоторых метаболических путей у этих прокариот, что и обусловило полную их зависимость от метаболизма клетки хозяина.

Другие паразитические прокариотические организмы удается выращивать на искусственных средах, но состав таких сред необычайно сложен. Они содержат, как правило, белки или продукты их неглубокого гидролиза (пептиды), полный набор витаминов, фрагменты нуклеиновых кислот и т. д. Для приготовления питательных сред такого состава используют мясные гидролизаты, цельную кровь или ее сыворотку. Формы, способные расти при создании подходящих условий вне клетки хозяина, называют *факультативными паразитами*.

¹ Впервые понятия «автотрофия» и «гетеротрофия» были введены для противопоставления растительного и животного образа жизни. Позднее их распространили на все другие организмы, в том числе и на прокариотические. Термин «автотрофия» означает питающийся самостоятельно, «гетеротрофия» — питающийся другим (от греческих слов: «autos» — сам, «heteros» — другой, «trophe» — пища).

Следующую крупную группу прокариот составляют так называемые *сапрофиты* — гетеротрофные организмы, которые непосредственно от других организмов не зависят, но нуждаются в готовых органических соединениях¹. Они используют продукты жизнедеятельности других организмов или разлагающиеся растительные и животные ткани. К сапрофитам относится большая часть бактерий. Степень требовательности к субстрату у сапрофитов весьма различна. В эту группу входят организмы, которые могут расти только на достаточно сложных субстратах (молоко, трупы животных, гниющие растительные остатки), т. е. им нужны в качестве обязательных элементов питания углеводы, органические формы азота в виде набора аминокислот, пептидов, белков, все или часть витаминов, нуклеотиды или готовые компоненты.

Особую группу гетеротрофных прокариот, обитающих в водоемах, составляют *олиготрофные бактерии*, способные расти при низких концентрациях в среде органических веществ. Организмы, предпочитающие высокие концентрации питательных веществ, относят к *копиотрофам*². Если у типичных копиотрофов оптимальные условия для роста создаются при содержании в среде питательных веществ примерно 10 г/л, то для олиготрофных организмов — в пределах 1...15 мг углерода в 1 л. В средах с более высоким содержанием органических веществ такие бактерии, как правило, расти не могут и погибают.

В мире прокариот не существует резкой границы между авто- и гетеротрофными организмами, так же как нет ее в ряду одноуглеродных соединений (CO₂, CO, HCOOH, HCHO, CH₃OH, CH₄), каждое из которых может служить источником углерода для определенной группы прокариот. Однако использование термина «автотрофия» удобно для обозначения конкретного типа конструктивного метаболизма, поскольку в процессе эволюции он оказался специфически связанным с определенными видами энергетических процессов, что привело к появлению у прокариот таких типов жизни, которые отсутствуют у более высокоорганизованных форм.

5.2.2. АЗОТ

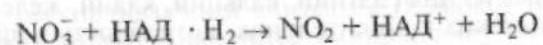
Азот (наряду с углеродом, водородом и кислородом) является одним из четырех основных элементов, участвующих в построении клетки. В расчете на сухое вещество его содержится приблизительно 10 %. Природный азот бывает в окисленной, восстанов-

¹ Термин «сапрофиты» происходит от греческих слов «sapros» — гнилой, «phyton» — растение. Чтобы удовлетворить потребность этих гетеротрофов в элементах питания, их обычно культивируют на средах, содержащих мясные гидролизаты, автолизаты дрожжей, растительные экстракты, молочную сыворотку.

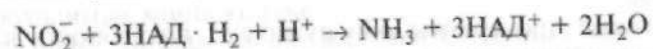
² Термин происходит от греческих слов: «oligos» — малый, «copiosus» — изобилие и «trophe» — пища.

ленной и молекулярной формах. Подавляющее большинство прокариот усваивает азот в восстановленной форме. Это соли аммония, мочевины, органические соединения (аминокислоты или пептиды). Многими прокариотами могут также потребляться окисленные формы азота, главным образом нитраты. Так как азот в конструктивном клеточном метаболизме используется в форме аммиака, нитраты перед включением в органические соединения должны быть восстановлены.

Восстановление нитратов до аммиака осуществляется посредством последовательного действия двух ферментов — нитрат- и нитритредуктазы. Нитратредуктаза катализирует НАД·Н₂-зависимое¹ восстановление нитрата до нитрита:



в результате которого осуществляется перенос на NO₃⁻ двух электронов. Нитритредуктаза катализирует шестизлектронное восстановление NO₂⁻ до NH₃:



До момента появления NH₃ никаких свободных промежуточных продуктов не обнаружено.

Молекулы мочевины и органических соединений также должны быть подвергнуты соответствующим ферментативным воздействиям, сопровождающимся высвобождением аммиака. Давно была обнаружена способность отдельных представителей прокариотного мира использовать молекулярный азот атмосферы. В последнее время установлено, что этим свойством обладают многие прокариоты, принадлежащие к разным группам: эу- и архебактерии, аэробы и анаэробы, фототрофы и хемотрофы, свободноживущие и симбиотические формы.

5.2.3. ПОТРЕБНОСТИ В ИСТОЧНИКАХ СЕРЫ И ФОСФОРА

Сера входит в состав аминокислот (цистеин, метионин), витаминов и кофакторов (биотин, липоевая кислота и др.), а фосфор — необходимый компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов. В природе сера находится в форме неорганических солей, главным образом сульфатов, в виде молекулярной (элементарной) серы или входит в состав органических соединений. Большинство прокариот для биосинтетических целей потребляют серу

¹ НАД(Ф)⁺ — окисленная, НАД(Ф)·Н₂ — восстановленная и НАД(Ф) — обобщенная формы кофермента никотинамидадениндинуклеотида или никотинамидадениндинуклеотилфосфата.

в форме сульфата, который при этом восстанавливается до уровня сульфида. Однако некоторые группы прокариот не способны к восстановлению сульфата и нуждаются в восстановленных соединениях серы.

Основной формой фосфора в природе являются фосфаты, которые и удовлетворяют потребности прокариот в этом элементе.

5.2.4. ИОНЫ МЕТАЛЛОВ И ФАКТОРЫ РОСТА

Всем прокариотическим организмам необходимы металлы, которые могут использоваться в форме катионов неорганических солей. Некоторые из них (магний, кальций, калий, железо) нужны в достаточно высоких концентрациях, потребность в других (цинк, марганец, натрий, молибден, медь, ванадий, никель, кобальт) невелика. Роль перечисленных выше металлов определяется тем, что они входят в состав основных клеточных метаболитов и, таким образом, участвуют в осуществлении жизненно важных функций организма.

Некоторые прокариоты обнаруживают потребность в каком-либо одном органическом соединении из группы витаминов, аминокислот или азотистых оснований, которое они по каким-то причинам не могут синтезировать из используемого источника углерода. Такие органические соединения, необходимые в очень небольших количествах, получили название факторов роста. Организмы, которым в дополнение к основному источнику углерода необходим один или больше факторов роста, называют *ауксотрофами* в отличие от *прототрофов*, синтезирующих все необходимые органические соединения из основного источника углерода.

5.3. СИНТЕЗ ПРОКАРИОТАМИ ОСНОВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ

Как уже отмечалось выше, основная масса органических веществ клетки состоит из полисахаридов, липидов, белков и нуклеиновых кислот, являющихся (за исключением липидов) полимерами. Образованию полимеров предшествует синтез составляющих их мономеров. В случае полисахаридов — это различные моносахара, нуклеиновых кислот — рибо- и дезоксирибонуклеотиды, белков — аминокислоты.

5.3.1. БИОСИНТЕЗ УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И АМИНОКИСЛОТ

Если прокариоты выращивать на средах, где источник углерода — одно-, двух- или трехуглеродные соединения, то необходимые сахара (в первую очередь C_6) они должны синтезировать из

имеющихся в среде источников углерода. У подавляющего большинства автотрофов на среде с CO_2 в качестве единственного источника углерода сахара синтезируются в реакциях восстановительного пентозофосфатного цикла. У гетеротрофов на среде с C_2 - и C_3 -соединениями для синтеза необходимых сахаров используются в значительной степени реакции, функционирующие в катаболическом потоке, например в гликолитическом пути. Однако поскольку некоторые ферментативные реакции этого пути необратимы, в клетках гетеротрофных прокариот, способных использовать двух- и трехуглеродные соединения, сформировались специальные ферментативные реакции, позволяющие обходить необратимые реакции катаболического пути.

Процесс, обеспечивающий синтез C_6 -углеводов из неуглеводных предшественников, например аминокислот, глицерина, молочной кислоты, получил название *глюконеогенеза*. Таким путем, сочетаяшим использование имеющегося в клетке катаболического аппарата и специальных реакций, служащих только для биосинтетических целей, решается прокариотами проблема биосинтеза необходимых моносахаров.

У прокариот липиды входят в состав клеточных мембран клеточной стенки, служат запасными веществами, являются компонентами пигментных систем и цепей электронного транспорта. Ниже мы рассмотрим синтез жирных кислот и фосфолипидов, являющихся у большинства прокариот, относящихся к эубактериям, универсальными компонентами клеточных мембран.

C_{14} — C_{18} -жирные кислоты синтезируются путем последовательного присоединения двухуглеродных фрагментов к активированной C_2 -группе, выполняющей функцию затравки, и последующего восстановления окисленных углеродных атомов.

В клетках эубактерий компонентами липидов являются в основном насыщенные или содержащие одну двойную связь (моновенасыщенные) жирные кислоты. Полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие две и более двойных связей, найдены до сих пор только у цианобактерий. Образование двойных связей в молекуле кислоты может происходить двумя путями. Один из них, обнаруженный у аэробных эубактерий, требует участия молекулярного кислорода. У облигатно анаэробных и некоторых аэробных эубактерий двойные связи вводятся в молекулу кислоты на ранней стадии ее синтеза в результате реакции дегидратации.

Пути, ведущие к синтезу фосфолипидов, состоят из нескольких этапов. Исходным субстратом служит фосфодиоксиацетон (промежуточное соединение гликолитического пути), восстановление которого приводит к образованию 3-фосфоглицерина. К последнему затем присоединяются два остатка жирных кислот. Продуктом реакции является фосфатидная кислота. Активирование ее с помощью АТФ и последующее присоединение к фосфатной группе серина, инозита, глицерина или другого соединения приводят

к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина соответственно.

Большинство прокариот способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав клеточных белков. В качестве исходных углеродных скелетов для биосинтеза аминокислот служит небольшое число промежуточных соединений различных метаболических путей. Введение в молекулу некоторых из них (щавелевоуксусной, α -кетоглутаровой, пировиноградной кислот) аминного азота приводит к образованию аспарагиновой, глутаминовой кислот и аланина. Однако в большинстве случаев исходные соединения должны подвергнуться значительным перестройкам, чтобы сформировать углеродный остов молекулы будущей аминокислоты.

Особенностью биосинтеза аминокислот является использование общих биосинтетических путей. Только одна аминокислота (гистидин) образуется по отдельному биосинтетическому пути. Азот вводится в молекулу аминокислоты посредством реакций аминирования, амидирования и переаминирования. Реакции аминирования приводят к образованию из пировиноградной кислоты аланина, а из α -кетоглутаровой — глутаминовой кислоты.

Глутаминовая кислота и глутамин прямо или косвенно служат донорами аминно- и амидогрупп при синтезе практически всех аминокислот и других азотсодержащих органических соединений. Аспарагин используется только для синтеза белковых молекул. Во все остальные аминокислоты азот вводится посредством реакций переаминирования, катализируемых соответствующими аминотрансферазами, при этом во всех реакциях одним из участников является глутаминовая кислота.

5.3.2. БИОСИНТЕЗ МОНОНУКЛЕОТИДОВ

Из монопнуклеотидов построены нуклеиновые кислоты (РНК, ДНК) клеток. Кроме того, монопнуклеотиды входят в состав многих коферментов и участвуют, таким образом, в осуществлении различных каталитических функций. Центральное место в биосинтезе монопнуклеотидов занимает синтез пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. Большинство прокариот способно к синтезу этих соединений *de novo* из низкомолекулярных предшественников. Синтез пуриновых и пиримидиновых монопнуклеотидов осуществляется независимыми путями. В результате последовательных ферментативных реакций при синтезе пуриновых нуклеотидов образуется инозиновая кислота, из которой путем химических модификаций пуринового кольца синтезируются адениловая (АМФ) и гуаниловая (ГМФ) кислоты.

Первым пиримидиновым нуклеотидом, синтезируемым *de novo*, является оротидиловая кислота, декарбоксилирование кото-

рой приводит к образованию уридилловой кислоты (УМФ). Последняя служит предшественником цитидиловых нуклеотидов, но соответствующее превращение происходит только на уровне трифосфатов, поэтому сначала из УМФ образуется УТФ, аминирование которого приводит к возникновению ЦТФ.

Дезоксирибонуклеотиды образуются в результате восстановления соответствующих рибонуклеотидов на уровне дифосфатов (для некоторых прокариот описано подобное превращение на уровне трифосфатов). Синтез специфического для ДНК нуклеотида — тимидиловой кислоты — происходит путем ферментативного метилирования дезоксиуридилловой кислоты.

Многие прокариоты способны использовать содержащиеся в питательной среде готовые пуриновые и пиримидиновые основания, их нуклеозиды и нуклеотиды, имея ферменты, катализирующие следующие этапы взаимопревращений экзогенных пуриновых и пиримидиновых производных.

Контрольные вопросы и задания. 1. Какие вещества служат источниками азота для микроорганизмов? 2. Какие вещества служат источниками углерода для микроорганизмов? 3. Какие вещества служат источниками серы и фосфора для микроорганизмов? 4. Что называют гликонеогенезом? 5. Назовите особенности биосинтеза липидов, аминокислот и монопнуклеотидов бактериями.

Глава 6

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ПРОКАРИОТ

Энергетические процессы прокариот по своему объему (масштабности) значительно превосходят процессы биосинтетические, и протекание их приводит к существенным изменениям в окружающей среде. Разнообразны и необычны в этом отношении возможности прокариот, способы их энергетического существования. Все это вместе взятое сосредоточило внимание исследователей в первую очередь на изучении энергетического метаболизма прокариот.

6.1. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ

Организмы могут использовать не все виды энергии, существующей в природе. Недоступными для них являются ядерная, механическая, тепловая энергии. Чтобы тепло могло служить источником энергии, необходим большой перепад температур, который в живых организмах невозможен. Доступными для живых систем внешними источниками энергии (энергетическими ресурсами) являются электромагнитная (физическая) энергия (свет определенной длины волны) и химическая (восстановленные химические соединения). Способностью использовать энергию света обладает большая группа фотосинтезирующих организмов, в том числе и прокариот, имеющих фоторецепторные молекулы нескольких типов (хлорофиллы, каротиноиды, фикобилипротеины). Для всех остальных организмов источниками энергии служат процессы окисления химических соединений.

Часто энергетическими ресурсами служат биополимеры, находящиеся в окружающей среде (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты), а также липиды. Прежде чем быть использованными, биополимеры должны быть гидролизованы до составляющих мономерных единиц. Этот этап весьма важен по следующим причинам. Белки и нуклеиновые кислоты отличаются исключительным разнообразием. Число видов белков исчисляется тысячами, после гидролиза же образуется только 20 аминокислот. Все разнообразие нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) после гидролиза сводится к пяти видам нуклеотидов. Таким образом, при расщеплении поли-

меров до мономерных единиц резко сокращается набор химических молекул, которые могут быть использованы организмом.

Полимерные молекулы расщепляются до мономеров при помощи ферментов, синтезируемых и выделяемых прокариотами в окружающую среду (экзоферменты). Крахмал и гликоген гидролизуются амилазами, гликозидные связи целлюлозы расщепляются целлюлазой. Многие бактерии образуют пектиназу, хитиназу, агаразу и другие ферменты, гидролизующие соответствующие полисахариды и их производные. Белки расщепляются внеклеточными протеазами, воздействующими на пептидные связи. Нуклеиновые кислоты гидролизуются рибо- и дезоксирибонуклеазами. Образующиеся небольшие молекулы легко транспортируются в клетку через мембрану.

Процесс распада жирных кислот протекает в клетке и включает несколько этапов.

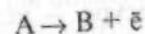
Процесс расщепления биополимеров не связан с образованием свободной¹, т. е. доступной клетке, энергии.

Общее для всех катаболических путей — многоступенчатость процесса окисления исходного субстрата. На некоторых этапах окисление субстрата сопряжено с образованием энергии в определенной форме, в которой эта энергия может использоваться в самых разнообразных энергозависимых процессах.

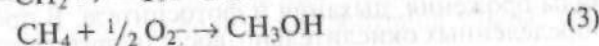
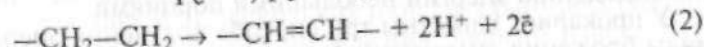
Таким образом, внешние доступные организмам источники энергии (свет, химические соединения) должны быть трансформированы в клетке в определенную форму, чтобы обеспечить внутриклеточные потребности в энергии.

6.2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

В самом общем виде процессы, способные служить источником энергии для прокариот, можно представить следующим образом:



Например,



В первой реакции окисление иона двухвалентного железа — это потеря электрона. Во втором примере окисление углеродного субстрата можно в равной мере рассматривать как отрыв от него

¹ Часть энергии, которая может быть превращена в работу.

водорода (дегидрирование) или независимое удаление двух протонов (H^+) и электронов (e^-). В биохимических процессах перенос водорода, как правило, осуществляется путем отдельного транспорта протонов и электронов: протоны выделяются в среду и при необходимости поглощаются из нее, электроны обязательно должны быть переданы на соответствующие молекулы. Поэтому и F_n (фосфор неорганический) равняется 31,8 кДж/моль (при 1 М концентрации исходных веществ и продуктов реакции, температуре 37 °С, рН 7,0 в присутствии избытка ионов Mg^{2+}). Для биолога важно, что по такому параметру, как изменение свободной энергии, он может осуществлять анализ биологических процессов. Все окислительно-восстановительные превращения определяются, по существу, перемещениями электронов. В формуле 3 имеет место присоединение атома кислорода к молекуле субстрата. Окислительно-восстановительный характер реакции в этом случае не столь очевиден, как в предыдущих, поскольку не происходит отрыва электрона (водорода) от молекулы метана. В данном случае в результате окисления метана происходит замена связи C—H на связь C—OH, кислород оттягивает электроны от атома углерода, подвергшегося окислению, сам при этом восстанавливаясь. Таким образом, внутри молекулы происходит деление электронной пары между атомами углерода и кислорода, т. е. окислительно-восстановительные перестройки. Реакции, в которых имеется возможность отрыва электронов, могут быть использованы прокариотами для получения энергии.

Разнообразные соединения, способные окисляться, т. е. являющиеся источниками отрываемых электронов, называются *донорами* электронов. Поскольку электроны не могут существовать самостоятельно, они обязательно должны быть перенесены на молекулы, способные их воспринимать и, таким образом, восстанавливаться. Такие молекулы называются *акцепторами* электронов. Какие ограничения здесь возможны? Донором электронов не может быть предельно окисленное вещество, а их акцептором — предельно восстановленное. Таким образом, должен существовать внешний энергетический ресурс — исходный субстрат. С помощью ферментных систем организм извлекает энергию из этого субстрата в реакциях его ступенчатого окисления, приводящего к освобождению энергии небольшими порциями.

У прокариот известны три способа получения энергии: разные виды брожения, дыхания и фотосинтеза. В процессах брожения в определенных окислительно-восстановительных реакциях образуются нестабильные молекулы, фосфатная группа которых содержит много свободной энергии. Эта группа с помощью соответствующего фермента переносится на молекулу АДФ, что приводит к образованию АТФ. Реакции, в которых энергия, освобождающаяся на определенных окислительных этапах брожения, запасается в молекулах АТФ, получили название субстратного фосфорилиро-

вания. Их особенностью является катализирование растворимыми ферментами. Образующийся в восстановительной части окислительно-восстановительных превращений сбраживаемого субстрата восстановитель (НАД · H_2 , восстановленный ферредоксин) переносит электроны на подходящий эндогенный акцептор электрона (пируват, ацетальдегид, ацетон и др.) или освобождается в виде газообразного водорода (H_2).

Нередко в процессах брожения окислительные и восстановительные превращения могут происходить внутримолекулярно, т. е. одна часть образуемой молекулы подвергается восстановлению, другая — окислению. В ряде брожений восстановительное и окислительное превращения связаны с разными образующимися продуктами брожения, т. е. происходят межмолекулярно.

Многие прокариоты получают энергию в процессе дыхания. Они окисляют восстановленные вещества с относительно низким окислительно-восстановительным потенциалом (E_0), возникающие в реакциях промежуточного метаболизма или являющиеся исходными субстратами, например НАД · H_2 , сукцинат, лактат, NH_3 , H_2S и др.

E_0 характеризует способность определенных веществ быть донорами или акцепторами электронов. Он может быть измерен экспериментально для любой окислительно-восстановительной системы. В соответствии с полученными значениями различные вещества образуют определенную шкалу окислительно-восстановительных потенциалов, которые принято отсчитывать относительно окислительно-восстановительного потенциала реакции $H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$. Стандартное значение его при рН = 7 (E_d) составляет 420 мВ.

Высокая отрицательная величина E_0 водорода говорит о его активной восстановительной способности, т. е. способности отдавать электроны. Чем больше отрицательная величина E_0 определенной окислительно-восстановительной системы, тем выше ее восстановительная способность, и наоборот. Большая положительная величина потенциала объясняет слабую способность воды отдавать электроны и одновременно высокую способность молекулярного кислорода акцептировать электроны. Таким образом, в соответствии со значениями окислительно-восстановительных потенциалов для двух или нескольких окислительно-восстановительных систем электроны без подведения энергии извне будут перемещаться в направлении от более электроотрицательных систем к более электроположительным.

Окисление происходит в результате переноса электронов через локализованную в мембране дыхательную электронно-транспортную цепь, состоящую из набора переносчиков, и приводит в большинстве случаев к восстановлению молекулярного кислорода до H_2O . Таким образом, в процессе дыхания молекулы одних веществ

становительные процессы в этом случае всегда межмолекулярны.

Наиболее широко распространена среди прокариот способность окислять органические субстраты. Обнаружены также весьма специализированные группы прокариот, способные окислять различные неорганические субстраты (H_2 , NH_4 , NO_2 , H_2S , S_2O_3 , Fe^{2+} и др.) с соответствующим восстановлением O_2 . Наконец, прокариоты могут окислять органические и неорганические вещества с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а целого ряда органических и неорганических соединений (CO_2 , NO_3 , SO_4 и др.). Количество освобождающейся энергии определяется градиентом окислительно-восстановительных потенциалов при переносе электронов от донора к акцептору.

6.3. ПЕРВАЯ УНИВЕРСАЛЬНАЯ ФОРМА ХИМИЧЕСКОЙ ЭНЕРГИИ В КЛЕТКЕ — АТФ

У прокариот существует несколько типов богатых энергией химических соединений. Самую большую группу составляют соединения с высокоэнергетической фосфатной связью: ацилфосфаты, фосфорные эфиры енолов (фосфоенолпируват), нуклеотидтрифосфаты, аденозинфосфосульфат. Другая распространенная группа — соединения с высокоэнергетической тиоэфирной связью — ацилтиоэфиры.

Эти соединения характеризуются тем, что по крайней мере одна из входящих в состав молекулы групп имеет высокий энергетический потенциал. При переносе этой группы происходит разрыв связи, соединяющей ее с молекулой, что приводит к резкому уменьшению свободной энергии, заключенной в молекуле химического соединения. Такие связи называются *высокоэнергетическими*, или *макроэнергетическими*. Присоединение группы с высоким энергетическим потенциалом к молекуле-акцептору повышает уровень ее свободной энергии, переводя таким образом молекулу в активированную форму, в которой это соединение может участвовать в биосинтетических реакциях.

Центральное место в процессах переноса химической энергии принадлежит системе АТФ. АТФ образуется в реакциях субстратного и мембранзависимого фосфорилирования. При субстратном фосфорилировании источником образования АТФ служат реакции двух типов:

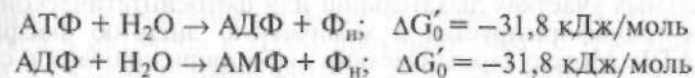
- 1) субстрат $\sim \Phi^I + \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{субстрат} + \text{АТФ}$
- 2) субстрат $\sim X + \text{АДФ} + \Phi_{II} \rightleftharpoons \text{субстрат} + X + \text{АТФ}$

¹ Символ « \sim », введенный американским биохимиком Ф. Липманом (F. Lipman), служит для обозначения макроэнергетической связи.

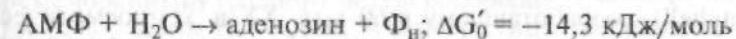
В реакциях первого типа осуществляется перенос высокоэнергетической фосфатной группы от молекулы-донора на АДФ, катализируемый соответствующими киназами. Реакциями такого типа являются реакции субстратного фосфорилирования на пути анаэробного превращения сахаров. У прокариот, имеющих ЦТК, реакция превращения сукцинил-КоА в янтарную кислоту сопровождается запасанием энергии в фосфатной связи ГТФ, который затем отдает фосфатную группу АДФ. Эту реакцию можно рассматривать как реакцию субстратного фосфорилирования второго типа.

АТФ образуется также за счет энергии в процессе мембранзависимого фосфорилирования.

Молекула АТФ содержит две макроэнергетические фосфатные связи, при гидролизе которых высвобождается значительное количество свободной энергии:



Отщепление последней фосфатной группы от молекулы АМФ приводит к значительно меньшему высвобождению свободной энергии:



Молекула АТФ обладает определенными свойствами, которые и привели к тому, что в процессе эволюции ей была отведена столь важная роль в энергетическом метаболизме клеток. Термодинамически молекула АТФ нестабильна, что вытекает из большой отрицательной величины ΔG ее гидролиза. В то же время скорость неферментативного гидролиза АТФ в нормальных условиях очень мала, т. е. химически молекула АТФ высокостабильна. Последнее свойство обеспечивает эффективное сохранение энергии в молекуле АТФ, поскольку химическая стабильность молекулы препятствует тому, чтобы запасенная в ней энергия бесполезно рассеивалась в виде тепла. Малые размеры молекулы АТФ позволяют ей легко диффундировать в различные участки клетки, где необходим подвод энергии извне для выполнения химической, осмотической, механической работ.

Если часто АТФ называют «энергетической валютой» клетки, то, продолжая эту аналогию, можно сказать, что «валютная единица» выбрана клеткой в процессе эволюции весьма рационально. Порция свободной энергии в макроэнергетической фосфатной связи АТФ — это как раз та энергетическая порция, использование которой в биохимических реакциях делает клетку высокоэффективным энергетическим механизмом.

6.4. ВТОРАЯ УНИВЕРСАЛЬНАЯ ФОРМА КЛЕТочНОЙ ЭНЕРГИИ — $\Delta\mu_{H^+}$

В течение длительного времени считали, что АТФ и другие высокоэнергетические соединения, находящиеся в равновесии с ним, представляют собой единственную форму энергии, которая может использоваться живыми клетками во всех энергозависимых процессах. Вопрос о характере связи между транспортом электронов, с одной стороны, и превращением фосфорных соединений, с другой, долгое время оставался неясным. Было установлено, что использование энергетических ресурсов (органических или неорганических соединений при дыхании, света при фотосинтезе) связано с переносом электронов по цепи, состоящей из белковых и небелковых компонентов, способных к обратному окислению — восстановлению. В результате этого переноса освобождающаяся на отдельных участках дыхательной или фотосинтетической цепи энергия трансформируется в химическую энергию фосфатных связей АТФ. Молекулярный механизм фосфорилирования, сопряженный с электронным транспортом, был неизвестен.

Позднее удалось получить экспериментальные данные о существовании еще одной формы энергии, также используемой клеткой для совершения разного рода работы. Открытие этой формы энергии принадлежит английскому биохимику Питеру Митчеллу (P. Mitchell), разработавшему в 60-х гг. XX в. хемиосмотическую теорию энергетического сопряжения, объясняющую превращение (трансформацию) энергии, высвобождающейся при электронном транспорте, в энергию фосфатной связи АТФ. П. Митчелл постулировал, что при переносе электронов по окислительно-восстановительной цепи, локализованной в мембранах определенного типа, называемых энергопреобразующими, или сопрягающими, происходит неравномерное распределение H^+ в пространстве по обе стороны мембраны (рис. 30).

Предложенная им модель предусматривает определенное расположение переносчиков электронов в сопрягающей мембране,

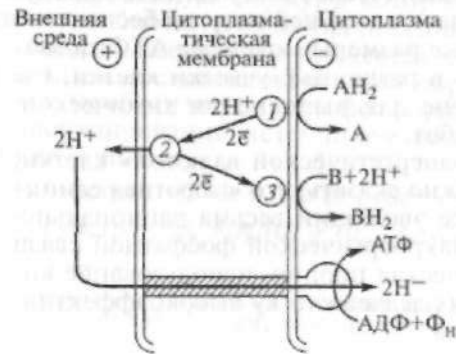


Рис. 30. Схема переноса электронов и протонов по электронотранспортной цепи и протонной АТФазе:

$АН_2$ и В — донор и акцептор электронов соответственно; А — донор, передавший электроны; $ВН_2$ — акцептор, присоединивший электроны

например ЦПМ, которые могут быть погружены вглубь мембраны или локализованы у наружной и внутренней ее поверхностей так, что образуют «петли» в цепи переноса электронов. В каждой «петле» (у прокариот электронтранспортные цепи в сопрягающих мембранах могут формировать разное число «петель») два атома водорода движутся от внутренней стороны ЦПМ к наружной с помощью переносчика водорода (например, хинона). Затем два электрона возвращаются к внутренней стороне мембраны с помощью соответствующего электронного переносчика (например, цитохрома), а два протона освобождаются во внешнюю среду.

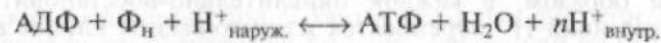
Таким образом, в каждой окислительно-восстановительной «петле» два иона H^+ переносятся из цитоплазмы клетки во внешнюю среду. Общее число протонов, перенесенных через ЦПМ и выделенных во внешнюю среду, при переносе двух электронов по электронно-транспортной цепи зависит от числа образуемых ею окислительно-восстановительных «петель». Расположение переносчиков электронов в ЦПМ прокариот таково, что при работе любой электронно-транспортной цепи (фотосинтетической или дыхательной) во внешней среде происходит накопление ионов водорода (протонов), приводящее к подкислению среды, а в клеточной цитоплазме — их уменьшение, сопровождающееся ее подщелачиванием, т. е. на мембране возникает ориентированный поперек (трансмембранный) градиент ионов водорода.

Поскольку ионы H^+ — химические частицы, несущие положительный заряд, неравномерное их накопление по обе стороны мембраны приводит к возникновению не только химического (концентрационного) градиента этих частиц, но и ориентированного поперек мембраны электрического поля (суммарный положительный заряд, где происходит накопление ионов H^+ , и отрицательный заряд по другую сторону мембраны). Таким образом, при переносе электронов на ЦПМ возникает трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода, обозначаемый символом $\Delta\mu_{H^+}$ и измеряемый в вольтах (В, мВ), который состоит из электрического (трансмембранная разность электрических потенциалов $\Delta\psi$) и химического (концентрационного) компонентов (градиент концентраций H^+ — ΔpH). Измерения показали, что на сопрягающих мембранах прокариот при работе дыхательных и фотосинтетических электронтранспортных цепей $\Delta\mu_{H^+}$ достигает 200...250 мВ, при этом вклад каждого компонента непостоянен. Он зависит от физиологических особенностей организма и условий его культивирования.

Итак, в соответствии с хемиосмотической теорией П. Митчелла энергия, освобождаемая в результате работы электронно-транспортной цепи, первоначально накапливается в форме трансмембранного градиента ионов водорода. Разрядка образующегося $\Delta\mu_{H^+}$ происходит с участием локализованного в той же мембране протонного АТФазного комплекса: ионы H^+ возвращаются по гради-

енту $\Delta\mu_{H^+}$ через H^+ — АТФазу, при этом без возникновения каких-либо промежуточных высокоэнергетических соединений из АДФ и неорганического фосфата образуется АТФ. (Сами сопрягающие мембраны в интактном состоянии непроницаемы для ионов, особенно H^+ и OH^- .) Предположительно, для синтеза одной молекулы АТФ достаточно переноса двух протонов, т. е. $H^+/АТФ = 2$. Однако не исключено, что $H^+/АТФ$ может быть больше.

Локализованная в мембране H^+ — АТФаза катализирует реакции синтеза и гидролиза АТФ в соответствии с уравнением



Реакция, протекающая слева направо, сопряжена с транспортом H^+ по градиенту $\Delta\mu_{H^+}$, что приводит к его разрядке и синтезу АТФ. Протекающая в противоположном направлении реакция гидролиза АТФ, сопровождающаяся переносом H^+ против градиента, приводит к образованию (или возрастанию) $\Delta\mu_{H^+}$ на мембране. Таким образом, АТФазный ферментный комплекс служит механизмом, обеспечивающим взаимное превращение двух форм клеточной энергии ($\Delta\mu_{H^+} \rightleftharpoons АТФ$), и сопрягающим процессы окислительной природы с фосфорилированием.

Энергия в форме $\Delta\mu_{H^+}$ используется для поглощения ДНК в процессе генетической трансформации и для переноса белков через мембрану. Движение многих прокариот обеспечивается энергией $\Delta\mu_{H^+}$. Важная роль принадлежит $\Delta\mu_{H^+}$ или одной из его составляющих в осуществлении процессов активного транспорта молекул и ионов через ЦПМ прокариот (рис. 31).

Все известные системы транспорта у прокариот можно разделить на два типа: первичные и вторичные. Разобранные выше примеры трансмембранного переноса ионов H^+ с участием окислительно-восстановительной «петли», бактериородопсина или в результате гидролиза АТФ, катализируемого H^+ — АТФазой, происходящие за счет химической энергии или электромагнитной энергии света, относятся к *первичным транспортным системам* (см. рис. 31, А). В результате их функционирования на мембране генерируется энергия в форме $\Delta\mu_{H^+}$, которая, в свою очередь, может служить движущей силой, обеспечивающей с помощью индивидуальных белковых переносчиков поступление в клетку необходимых веществ разной химической природы и удаление из нее конечных продуктов метаболизма. Механизмы, посредством которых осуществляется трансмембранный перенос веществ по градиенту $\Delta\mu_{H^+}$ или одной из его составляющих, относятся к *вторичным транспортным системам* (см. рис. 31, Б).

Как известно, в случае пассивной диффузии вещества движущей силой служит только градиент его концентрации вне клетки и внутри нее. Если подобный градиент существует и в процессе ак-

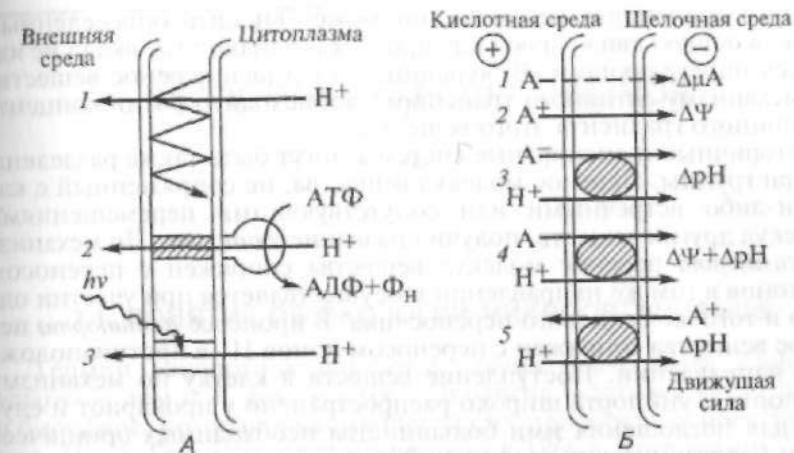


Рис. 31. Транспортные системы в клетках прокариот (по Konings, Veldkamp, 1980):

А — системы первичного транспорта: 1 — перенос электронов по окислительно-восстановительной цепи; 2 — протонная АТФаза; 3 — бактериородопсин; Б — системы вторичного транспорта: 1 — пассивный транспорт нейтральных молекул; 2 — активный перенос катионов (унипорт); 3 — симпорт анионов и протонов; 4 — симпорт нейтральных молекул и H^+ ; 5 — антипорт катионов и протонов



Рис. 32. Преобразование энергии в клетке прокариот (по Л. С. Скулачеву, 1980)

тивного транспорта вещества, он может вносить определенный вклад в общую движущую силу процесса, однако этот вклад не является определяющим. В большинстве случаев перенос вещества по механизму активного транспорта происходит против концентрационного градиента этого вещества.

Вторичные транспортные системы могут быть также разделены на три группы. Перенос молекул вещества, не сопряженный с какими-либо встречными или сопутствующими перемещениями молекул других веществ, получил название *унипорта*. По механизму *симпорта* перенос молекул вещества сопряжен с переносом протонов в том же направлении и осуществляется при участии одного и того же белкового переносчика. В процессе *антипорта* перенос вещества сопряжен с переносом ионов H^+ в противоположном направлении. Поступление веществ в клетку по механизму симпорта и унипорта широко распространено у прокариот и служит для поглощения ими большинства необходимых органических и неорганических соединений.

Для понимания движущих сил, участвующих в активном транспорте разных типов молекул (электронейтральных, несущих положительный или отрицательный заряд), следует помнить, что в цитоплазме более щелочная среда и суммарный отрицательный заряд. Незаряженные молекулы (глюкоза, галактоза, нейтральные аминокислоты) переносятся в клетку вместе с протонами за счет обоих компонентов $\Delta\mu_{H^+} = \Delta\psi + \Delta pH$.

Молекулы, имеющие отрицательный заряд (глюконат, глутамат, $H_2PO_4^-$), котранспортируются с ионами H^+ в электронейтральной форме за счет только ΔpH . Положительно заряженные молекулы и ионы переносятся через мембрану в цитоплазму по механизму унипорта с использованием в качестве движущей силы электрического компонента $\Delta\mu_{H^+}$. Таким путем осуществляется перенос в клетку, например, ионов K^+ или лизина. Примером антипортной системы может служить откачивание из цитоплазмы ионов Na^+ , происходящее в обмен на поступление в нее ионов H^+ . Движущей силой процесса является ΔpH .

Все это позволяет рассматривать энергию в форме $\Delta\mu_{H^+}$ (наряду с АТФ) как широко используемую внутри клетки. Преобразование энергии в клетке прокариот схематически изображено на рис. 32.

Как видно из этой схемы, АТФ и $\Delta\mu_{H^+}$ можно считать двумя взаимопревращаемыми «энергетическими валютами» клетки, каждая из которых способна служить источником энергии для выполнения химической, осмотической, механической работ.

Контрольные вопросы и задания. 1. Перечислите энергетические ресурсы микроорганизмов. 2. Какие химические соединения называются донорами и акцепторами электронов? 3. Назовите три способа получения энергии микроорганизмами. 4. Какой процесс носит название субстратного фосфорилирования? 5. Назовите некоторые типы богатых энергией химических соединений. 6. Чем отличается молекула АТФ от других органических соединений? 7. В чем сущность хемиосмотической теории энергетического сопряжения П. Митчелла?

Глава 7

ЭКОЛОГИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

7.1. ПОНЯТИЕ ОБ ЭКОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Термин «экология» образован двумя греческими словами: «oikos» — дом и «logos» — наука. Экология — это всеобщая наука о биосфере, которая в настоящее время приобрела особое значение. По Э. Геккелю, предложившему в 1866 г. этот термин, экология — это наука об отношениях организмов и окружающей среды.

Степень приспособляемости вида к изменениям условий среды называют *экологической валентностью*. Экологической валентностью вида микроорганизмов также называют его способность заселять среду, характеризующуюся определенными изменениями экологических факторов.

Таким образом, **экология микроорганизмов — наука о взаимоотношениях микроорганизмов друг с другом и с окружающей средой.**

Поскольку вероятность размножения некоторых патогенных микроорганизмов в окружающей среде не вызывает в настоящее время сомнений, возникают естественные вопросы: как они могут размножаться в столь различных условиях обитания, включающих организм теплокровных животных и человека, с одной стороны, и объекты окружающей среды — с другой; какие генетико-биохимические механизмы определяют столь большие адаптационные возможности бактерий, такую широкую их метаболическую пластичность?

В современный период знания по экологии пополнились своеобразными научными фактами о механизмах выживания патогенных микроорганизмов в абиотических и биотических объектах окружающей среды, что дает новое объяснение теоретических положений эпизоотического процесса. Так, сравнительно недавно эпизоотологи признавали единственным источником возбудителя инфекции организм животного. Открытия последних лет, касающиеся механизмов выживания патогенных микроорганизмов в водной среде, в корне меняют это представление. Эти и другие вопросы пока не находили отражения в традиционных курсах и учебных пособиях.

7.2. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Микроорганизмы находятся в тесной зависимости от условий окружающей среды. Благоприятные условия способствуют проявлению жизнедеятельности микроорганизмов, а неблагоприятные факторы могут привести к их гибели или изменчивости свойств. Факторы внешней среды принято делить на физические, химические и биологические.

7.2.1. ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Из физических факторов наибольшее влияние на микроорганизмы оказывают температура, влажность, излучение.

Температура. Жизнь организмов определяется температурой больше, чем каким-либо другим фактором внешней среды, в связи с тем что все организмы построены из химических компонентов и все процессы жизни происходят на основе химических реакций, подчиненных законам термодинамики. Температура действует не только на скорость химических реакций, но также является причиной структурной перестройки протеинов, фазовых перемещений жиров, изменения структуры воды. Температурная амплитуда биохимической активности относительно мала, что обеспечивается специфическими свойствами биомолекул.

По отношению к температурным условиям микроорганизмы разделяют на *мезофильные, психрофильные и термофильные*. Деление бактерий на указанные группы довольно условно, так как температурные диапазоны их роста значительно перекрываются (рис. 33).

Большинство известных видов относится к мезофилам, у кото-

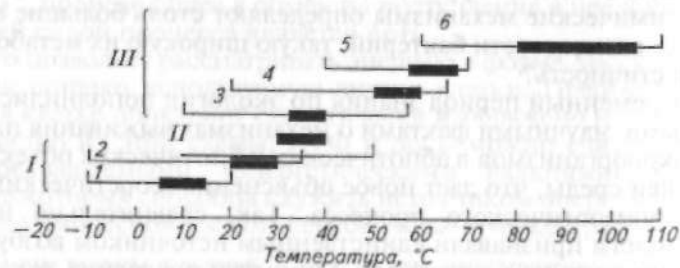


Рис. 33. Температурные границы и оптимальные зоны роста прокариот и основанная на этом их классификация:

I — психрофилы: 1 — облигатные; 2 — факультативные; II — мезофилы; III — термофилы: 3 — термотолерантные; 4 — факультативные; 5 — облигатные; 6 — экстремальные. Жирной линией выделены оптимальные температуры роста

рых оптимальные температуры роста лежат между 30 и 40 °С, а температурный диапазон, в котором возможен рост, находится между 10 и 50 °С. Типичным мезофилом является *E. coli*: нижняя граница роста 10 °С, верхняя 49 °С, оптимальная температура 37 °С при росте на богатой среде.

Психрофилы и факторы, определяющие возможность роста при низких температурах. Область температур роста психрофилов лежит в пределах от -10 до 20 °С и выше. В свою очередь психрофилы делятся на облигатные и факультативные.

Основное различие между подгруппами заключается в том, что облигатные психрофилы не способны к росту при температуре выше 20 °С, а верхняя температурная граница роста факультативных форм намного выше. Различаются они также и оптимальными температурными зонами роста, находящимися у облигатных психрофилов значительно ниже, чем у факультативных. Принципиальное же сходство между ними — способность к росту при 0 °С и минусовых температурах.

Термофилы и механизм термофилии. Группу термофилов делят на четыре подгруппы.

1. Термотолерантные виды растут в пределах от 10 до 60 °С, оптимальная область лежит при 35...40 °С.

2. Факультативные термофилы характеризуются максимальной температурой роста между 50 и 65 °С, но способны также к размножению при комнатной температуре (20 °С).

3. К облигатным термофилам относят виды, обнаруживающие способность расти при температуре около 70 °С и не растущие при температуре ниже 40 °С.

4. Наконец, недавно обнаружены прокариоты, выделенные в подгруппу экстремальных термофилов. Для них характерны следующие температурные параметры: оптимум в области 80...105 °С, минимальная граница роста 60 °С и выше, максимальная — до 110 °С. К экстремальным термофилам относятся организмы из группы архебактерий, не имеющие аналогов среди мезофилов, например представители родов *Thermoproteus*, *Puycoccus*, *Puycdictium* и др.

Появились публикации об обнаружении бактерий, способных расти при температуре воды 250...300 °С и давлении 265 атм (при этом давлении вода в жидком состоянии может находиться до 460 °С). Эти бактерии выделены из проб воды Тихого океана, поднятых с глубины 2560 м, где предположительно они существуют в горячих струях, выбрасываемых на дне океана так называемыми черными гейзерами. Давление в районе обнаружения бактерий — около 250 атм, а температура воды может превышать 350 °С. В связи с этим исследователи начинают переоценивать границы условий, при которых способны развиваться прокариоты. Высказывается предположение, что прокариоты могут существовать везде,

где есть вода в жидком состоянии и достаточное количество питательных веществ.

Высокая температура вызывает коагуляцию структурных белков и ферментов микроорганизмов. Большинство вегетативных форм гибнет при 60 °С в течение 30 мин, а при 80...100 °С — через 1 мин. Для сохранения жизнеспособности относительно благоприятны низкие температуры (например, ниже 0 °С), безвредные для большинства микробов. Бактерии выживают при температуре ниже -100 °С; споры бактерий и вирусы годами сохраняются в жидком азоте. Простейшие и некоторые бактерии (спирохеты, риккетсии и хламидии) менее устойчивы к температурным воздействиям.

Воздействие высоких температур широко используется в лабораторной практике. Стерилизация объектов проводится методами автоклавирования, кипячения, тиндализации, пастеризации, фламбирования, стерилизации сухим жаром, паром без давления.

В хирургической практике стерилизуют инструменты, растворы, перевязочный материал.

Холодоустойчивость микроорганизмов. Организмы, способные образовывать тепло внутри своего тела, задействуя различные физиологические и биохимические механизмы, называются *эндотермными (эндотермы)*, а организмы, температура тела которых полностью зависит от температуры окружающей среды, т. е. определяется внешними источниками тепла — *эктотермными (эктотермы)*.

Поддержание постоянства метаболизма у эктотермных организмов при смене температуры обитания названо *температурной компенсацией*. Генетико-биохимическая адаптация эктотермных организмов к изменению температурных условий обитания достигается разными путями: регуляцией экспрессии генов, изменениями функциональной активности ферментов, заменой одних изоферментов другими, изменениями концентрации ферментов в клетках и тканях и подвижностью жидкокристаллического состояния мембран.

Патогенные бактерии при выведении из теплокровного организма попадают в окружающую среду, где температура значительно ниже и перепад ее для бактерий может составлять до 30...35 °С. С учетом узкого диапазона активности ферментов становится понятным, что в этих изменяющихся условиях один фермент не способен функционировать. Эктотермные организмы могут синтезировать несколько форм ферментов, сходных по функции, но отличающихся молекулярной массой и приспособленностью к различным температурам. Синтез этих форм кодируется разными генными локусами, и тогда они называются *изоферментами (изозимами)*.

Возможен ли рост патогенных бактерий при низких температурах? Считалось, что патогенные микроорганизмы, будучи парази-

тами теплокровных животных и человека, температурный оптимум которых лежит в пределах 36...39 °С, не могут размножаться при низких температурах и в связи с этим не способны обитать в окружающей среде. Почти все патогенные бактерии относятся к мезофилам. Однако большое число видов бактерий, способных вызывать болезни животных, имеют широкий температурный диапазон роста (от 0 до 43...45 °С). Например, *Yersinia pestis* может расти как при -2 °С, так и при 40 °С; *Y. pseudotuberculosis* — от 0 до 40 °С; *Listeria monocytogenes* — от 4 до 40 °С; *Y. enterocolitica* — от 0,5 до 42 °С, *Bacillus anthracis* способна к споруляции при температуре от 4 до 20 и 37 °С и размножаться при 8 °С. Возбудитель холеры размножается при 5 °С, возбудитель туберкулеза — при 20...40 °С.

Обнаружение патогенных бактерий (сальмонелл, шигелл, иерсиний, стафилококков, псевдомонад, клостридий, бацилл, листерий, клебсиелл, эшерихий, микобактерий) в почве, воде, иле, животных и растительных остатках позволяет проследить определенную закономерность: при температуре ниже 20 °С и при наличии достаточной влажности жизнеспособность перечисленных бактерий увеличивается многократно. Не образующие спор бактерии не способны длительно сохраняться при низкой температуре в окружающей среде без активного роста.

Таким образом, нет сомнений в том, что большое количество видов патогенных бактерий могут размножаться при биологически низкой температуре. Однако оптимум роста таких микроорганизмов, т. е. когда скорость размножения клеток наибольшая, сдвинут все же в сторону более высоких температур (22...30 °С).

Для факультативных паразитов, способных обитать не только в организме теплокровных, но и в окружающей среде, низкая температура столь же естественна, как и температура 37...39 °С.

Снижение температуры часто является причиной возникновения у бактерий способности к прототрофному питанию. В таких условиях проявляются сапрофитные свойства чумного микроба, позволяющие ему длительно сохраняться в окружающей среде. *B. anthracis* при перенесении штаммов, культивируемых на питательных лабораторных средах при температуре 37 °С, непосредственно в бурую лесную почву, где они росли при температуре 10...12 °С, изменяли свои биохимические свойства. Природный субстрат и низкая температура индуцировали у *B. anthracis* синтез протеаз и лецитиназы, которые не свойственны микробу, обитающему при высокой температуре.

Определение активности каталазы интактных микробных клеток *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, выращенных при 10 и 37 °С, позволило установить, что низкая температура в 2...8 раз усиливает активность фермента в зависимо-

сти от вида бактерий. Усиление каталазной активности при низкой температуре является общей закономерностью.

Анализ «холодовых» и «тепловых» вариантов культур по тесту коагуляции плазмы показал, что культуры, выращенные при 10 °С на МПБ, коагулировали плазму в первые 30...60 мин, в то время как их «тепловые» варианты, выращенные при 37 °С, лишь за 4...6 ч.

Температура оказывает регулирующее влияние на некоторые особенности возбудителей. Основными свойствами бактерий, детерминируемыми хромосомным генетическим аппаратом, которые усиливаются при низкой температуре и реализуются на этапе инициации инфекции, являются подвижность, хемотаксис, высокий адгезивный потенциал, клеточная и тканевая инвазивность. При относительно высокой температуре обитания вне теплокровного организма эти свойства бактерий ослабляются.

Влажность. Важнейшим фактором поддержания жизнеспособности микробной клетки является вода, поскольку именно в растворах протекают все биологические процессы, составляющие жизнь. Нет другого природного вещества, которое могло бы сравниться с водой по месту и значимости в процессах жизнедеятельности. Вода обладает совершенно уникальными свойствами, делающими ее неизменной составной частью организмов.

В условиях дефицита влаги некоторые бактерии образуют гидрофильные слизистые капсулы, активно поглощающие влагу.

При высушивании микроорганизмов часть клеток погибает. Клетки же, перенесшие высушивание, переходят в состояние анабиоза. Возможность сохранения бактериями жизнеспособности при высушивании определяется множеством факторов, в том числе зависит от температуры, рН, солевого состава среды и т. п. Обычно формы с мелкими клетками устойчивее, чем крупноклеточные формы; кокки устойчивее палочек. Клетки с толстой клеточной стенкой, в том числе большинство грамположительных бактерий, устойчивее к высушиванию, чем грамотрицательные бактерии и тем более микоплазмы. Особенно высокой устойчивостью к высушиванию характеризуются микобактерии, клетки которых окружены массивными клеточными стенками, содержащими большое количество липидов. Бактериальные цисты и споры устойчивее к высушиванию, чем вегетативные клетки.

Во время длительного сухого хранения в хромосомном аппарате происходят некоторые генетические сдвиги, что приводит к снижению жизнеспособности и накоплению мутаций. На ряде микроорганизмов было доказано, что споры и суспензии бактерий в течение 5 сут выдержали без воды ультравысокий вакуум, приближающийся к таковому в межпланетном пространстве.

Успешное оживление после быстрого глубокого охлаждения при температуре -182°C кусочков листьев, простейших и сперма-

тозоидов позволило разработать фундаментальную теорию *витрификации* тканей, клеток и организмов. Гибель клеток происходит не в процессе охлаждения и витрификации, а в процессе согревания и *девитрификации*.

Витрификацию выдерживают только немногие мелкие организмы, быстрое охлаждение которых позволяет избегать кристаллизации воды в их теле при охлаждении и оттаивании, что нашло подтверждение в опытах с культурами бактерий кишечной флоры.

Высушивание используется в различных технологических процессах для сохранения кормов, продуктов питания. При изготовлении биологических препаратов и сохранения чистых культур микроорганизмов пользуются методом *лиофилизации* (быстрое замораживание с последующим высушиванием под низким давлением).

Действие излучения. Солнечный свет может обеспечивать выраженный антимикробный эффект. Так, более 99,9 % клеток штамма *Escherichia coli* с нарушенными репарационными механизмами погибает после облучения солнечным светом в течение 3 мин. При этом более 80 % летальных повреждений связано с действием света, длина волны которого менее 312 нм. Действие видимого света ответственно менее чем за 1 % летальных повреждений. Видимый свет, длина волны которого 450 нм, индуцирует замены пар оснований и мутации сдвига рамки у *E. coli*. Световые волны длиной 550 нм и особенно 410 нм вызывают фотолизис клеток *Mucosoccus xanthus*. Эффект определяется поглощением света железопорфиринами.

Ультрафиолетовые лучи и ионизирующее излучение. *Ближний ультрафиолет* (УФ) — излучение, длина волны которого 400...320 нм, даже в невысоких дозах оказывает на бактерий определенное воздействие. Так, при освещении ближним УФ подвижных клеток *E. coli* или *Salmonella typhimurium* сначала наблюдается увеличение частоты кувырканий клеток, т. е. *репеллентный* эффект, но затем кувырканья полностью прекращаются и в конце концов наступает паралич жгутиков, т. е. свет обуславливает нарушение механизмов движения и таксиса. В сублетальных дозах ближний УФ вызывает замедление роста культур главным образом за счет удлинения лаг-фазы. Скорость деления клеток также несколько понижается, подавляется способность бактерий поддерживать развитие фага и угнетается индукция ферментов. Эти эффекты связывают в основном с поглощением УФ-лучей 4-тиоуредином — необычным основанием, присутствующим в 8-й позиции во многих тРНК у прокариот (но не у эукариот). Возбужденный светом 4-тиоуредин образует сшивки с цитозином, находящимся в 13-м положении в тРНК, что препятствует связыванию тРНК с аминокислотами и приводит к увеличению образования гуанозинтрифосфата на рибосомах и к приостановке синтеза РНК и соответственно белка.

Средний УФ — это излучение, длина волны которого 320...290 нм, длина волны дальнего УФ — 290...200 нм. Биологические эффекты действия среднего и дальнего УФ сходны.

УФ-лучи широко применяются в производственной деятельности человека для обеззараживания воздуха в помещениях (родильные дома, операционные, животноводческие помещения, промышленные цеха производства антибиотиков, лабораторные боксы), воды, отходов производств.

Ионизирующее излучение составляет определенный компонент естественной радиации, определяемый нестабильными изотопами, постоянно находящимися в почве, атмосферных осадках. В областях залегания радиоактивных минералов естественный фон радиации повышен. Изотопы могут попадать в живые организмы, и тогда последние подвергаются внутреннему облучению. Бактерии иногда способны накапливать некоторые элементы в очень больших количествах.

Ионизирующее излучение возникает также под влиянием космических лучей; оно вызывает повреждения ДНК, которые принято подразделять на прямые и опосредованные, возникающие в связи с образованием свободных радикалов. Повреждения преимущественно представляют собой одноцепочечные или двухцепочечные разрывы молекулы ДНК.

В некоторых случаях удается обнаружить связь радиостойкости бактерий с особенностями их местообитания. Так, микроорганизмы, выделенные из радоновых минеральных источников, оказываются в 3...10 раз более резистентными к радиации, чем организмы тех же видов, выделенные из нерадиоактивной воды. В охладительных системах ядерных реакторов, где средняя доза излучения превышает 10^6 ФЭР (физический эквивалент рентгена), обитают разные бактерии, в частности представители рода *Pseudomonas*.

Ионизирующее излучение используется для стерилизации био-препаратов, перевязочного материала, инструментов.

Действие лазера вызывает у микроорганизмов в зависимости от дозы облучения изменения морфологических и биохимических свойств, вплоть до утраты жизнеспособности. Гибнут бактерии при воздействии лазерного излучения, длина волны которого около 700 нм, а энергия 200 Дж. При этом происходит денатурация белка и повреждение нуклеиновых кислот.

Ультразвук (УЗ). Поскольку бактерии обладают относительно малой массой и жесткой оболочкой, низкочастотные колебания (зона звуковых колебаний 100...10 000 Гц) действует на них в очень слабой степени. Если же бактерии погрузить в жидкость, в которой распространяются высокочастотные колебания (т. е. ультразвук), то бактерии разрушаются и погибают. Ультразвуковые колебания в жидкостях обычно создают при помощи вибрирующих никелевых или кварцевых дисков. Существует мнение, что в

большинстве случаев разрушение клеток при ультразвуковом воздействии, по-видимому, обусловлено образованием внутри клетки пены, состоящей из мельчайших пузырьков газа, находящегося обычно в растворенном состоянии в протоплазме или в жидкости на поверхности бактериальной клетки.

Бактерицидный эффект УЗ уменьшается, если подавляется кавитация (разрыв жидкости), что происходит при дегазации, погружении объекта в гель или другую вязкую среду. Бактерицидный эффект УЗ, напротив, усиливается при насыщении «озвучиваемой» эмульсии диоксидом углерода, азотом, кислородом, воздухом, так как это усиливает кавитацию.

Действие ультразвуковых волн не сводится только к механическому повреждению клеток. В результате ультразвукового воздействия наблюдаются биохимические и функциональные изменения, не приводящие к гибели организма. Так, под воздействием УЗ в клетке могут высвободиться биологически активные вещества (витамины, ферменты и пр.), а также появляться нехарактерные микроорганизму ферменты: у *Saccharomyces globosus* после 30 мин воздействия УЗ частотой 740 кГц появляется инвертаза, отсутствующая у «неозвученных» клеток; изменяется чувствительность к антибиотикам; у *S. haemoliticus*, подвергнутого воздействию УЗ частотой 800 кГц в течении 10 мин, чувствительность к пенициллину возрастает в 2...5 раз.

УЗ используют для получения отдельных клеточных компонентов, для изучения их структуры и функций, для стерилизации субстратов, повреждающихся при тепловой обработке.

К УЗ чувствительны все микроорганизмы, в том числе и споровые. Но по степени чувствительности к этому фактору они значительно различаются. Так, под воздействием УЗ легко разрушаются *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus casei*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*. Несколько более устойчивы *Sporosarcina urea*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acetobacter peroxydans*. Среди патогенных форм наибольшую устойчивость к УЗ выявили *Mycobacterium tuberculosis*.

Магнитное поле. Все живые организмы находятся в области магнитного поля Земли. Влияние дополнительных и более мощных полей иногда приводит к стимуляции их роста. Так, воздействие магнитным полем напряженностью $12 \cdot 10^3$ А/м привело к некоторому ускорению роста *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Halobacterium salinarium*. В магнитном поле напряженностью в $24 \cdot 10^3$ или $50 \cdot 10^3$ А/м наблюдали их угнетение. Замедление роста *Paracoccus denitrificans* наблюдали при $40 \cdot 10^4$... $64 \cdot 10^4$ А/м, *Staphylococcus aureus* и *Serratia marcescens* — при $120 \cdot 10^4$ А/м. Действие переменных магнитных полей обычно более эффективно, чем действие постоянных. В естественной среде обитания бактерий магнитные поля такой напряженности не встречаются.

7.2.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КИСЛОРОД

Молекулярный кислород явился мощным экологическим фактором, его накопление в атмосфере вызвало прогрессивную эволюцию одних организмов и гибель других.

Кислород широко распространен в природе, находясь как в связанном, так и в свободном состоянии. В первом случае он входит в состав молекул воды, органических и неорганических соединений. Во втором — присутствует в атмосфере в виде молекулярного кислорода (O_2), объемная доля которого составляет 21%. Кислород является обязательным химическим компонентом любой клетки. Подавляющее большинство организмов удовлетворяет свои потребности в этом элементе, используя обе формы кислорода.

Среди прокариот существуют значительные различия в отношении к молекулярному кислороду. По этому признаку они могут быть разделены на несколько групп (рис. 34). Прокариоты, для роста которых O_2 необходим, называют облигатными (обязательными) аэробами. К ним относится большинство прокариотических организмов. Среди облигатных аэробов обнаружены существенные различия в отношении к уровню молекулярного кислорода в среде. Некоторые представители этой группы не способны к росту при концентрации O_2 , равной атмосферной, но могут расти, если содержание O_2 в окружающей среде будет значительно ниже (порядка 2%). Такие облигатно-аэробные прокариоты получили название микроаэрофилов.

Степень аэробности или анаэробности среды может быть охарактеризована количественно при помощи окислительно-восстановительного потенциала, который выражают символом gH_2 . Это индекс, аналогичный pH, но pH выражает степень кислотности и щелочности, а gH_2 — степень аэробности и анаэробности. Это отрицательный логарифм концентрации атомов водорода в среде.

В водном растворе, полностью насыщенном кислородом, $gH_2 = 41$, а в условиях полного насыщения среды водородом $gH_2 = 0$. Таким образом, шкала от 0 до 41 характеризует любую степень аэробности.

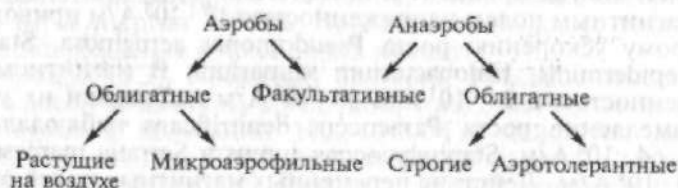


Рис. 34. Группы прокариот в зависимости от отношения к молекулярному кислороду

Облигатные аэробы (от лат. aeros — воздух) для осуществления процессов метаболизма нуждаются в молекулярном кислороде. Они не способны получать энергию путем брожения. Их ферменты осуществляют перенос электронов от окисляемого субстрата к кислороду. Аэробы развиваются, как правило, на поверхности питательных сред. К облигатным аэробам относятся *B. subtilis*, микрорококки и др.

Облигатные аэробы не способны существовать без свободного кислорода, не могут жить при низких значениях gH_2 . Нижним пределом для них является окислительно-восстановительный потенциал порядка 10. Однако и величины gH_2 выше 30 для этих организмов неблагоприятны. Облигатные аэробы защищаются от чрезмерного окисления выделением в среду сильных восстановителей.

Облигатные анаэробы не используют молекулярный кислород. Более того, для них он токсичен. Многие ферменты этих бактерий денатурируются при контакте с молекулами кислорода.

Губительное воздействие кислорода на облигатные анаэробы обусловлено тем, что в живой клетке в присутствии кислорода образуется пероксид водорода, который в больших концентрациях ядовит для бактериальной клетки. Облигатные анаэробы погибают при содержании H_2O_2 0,0003%, тогда как аэробы выдерживают концентрации до 0,015%, т. е. в 50 раз больше. Для обезвреживания пероксида водорода в клетках аэробных бактерий вырабатывается фермент каталаза, разлагающая H_2O_2 на воду и молекулярный кислород. Благодаря наличию каталазы H_2O_2 не накапливается в клетках. У анаэробов и факультативных анаэробов каталаза отсутствует, что и является одной из причин их неспособности жить в аэробных условиях.

Значительное число представителей анаэробных бактерий относится к роду *Clostridium* (*Cl. tetani* — возбудитель столбняка, *Cl. botulinum* — ботулизма, *Cl. Perfringens* — возбудитель газовой гангрены). Они широко распространены в почве, озерных отложениях. Облигатные анаэробы принадлежат также к родам *Methanobacterium*, *Vacteroides*.

Облигатные анаэробы жизнедеятельны при gH_2 не выше 18...20. Однако при этих показателях они уже не размножаются, а их метаболизм направлен на выделение в среду восстановителей для снижения окислительно-восстановительного потенциала. Размножаться анаэробы могут лишь при значениях gH_2 не выше 3...5.

Факультативные анаэробы могут жить как при наличии, так и в отсутствии кислорода. Типичными представителями этой группы являются кишечная палочка, стрептококк, стафилококк. Кишечная палочка на среде с углеводами развивается как анаэроб, сбраживая сахара, а затем начинает использовать кислород как типичный аэробный организм, окисляя до CO_2 и H_2O образовавшиеся продукты брожения (например, молочную кислоту).

Факультативно-анаэробные микроорганизмы сохраняют метаболическую активность в широком диапазоне pH_2 — от 0 до 30.

Степень аэробности среды учитывается при культивировании микроорганизмов. При силосовании (консервировании) кормов искусственно создаются анаэробные условия для обеспечения метаболических преимуществ бактериям молочнокислого и уксуснокислого брожений. Чрезмерная аэрация промышленных стоков животноводческих ферм позволяет активизировать окисление органического вещества стоков, в том числе и содержащихся в них микроорганизмов.

7.2.3. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Концентрация ионов водорода. Кислотность среды является важным фактором, определяющим существование в ней прокариот. Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизм или непосредственно, или косвенно, через влияние на ионное состояние и доступность многих ионов и метаболитов, стабильность макромолекул. Так, например, при низких значениях pH содержание таких катионов, как Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , возрастает и достигает токсических уровней. Наоборот, при высоких значениях pH содержание многих катионов, необходимых клетке (Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), резко понижается, и они становятся недоступными для организма. От значения pH зависит состояние веществ в окружающей среде. Многие органические кислоты в кислой среде находятся в недиссоциированной форме и легко проникают в клетку, становясь токсичными для нее.

Значение pH , как известно, определяет кислотность и щелочность растворов и представляет собой отрицательный логарифм концентрации ионов водорода. Концентрация ионов водорода в чистой пресной воде составляет 10^{-7} г-ион/л и, следовательно, pH пресной воды — 7,0. Те значения pH , которые меньше 7,0, относятся к кислотным, а те, которые выше 7,0, — к щелочным. Следует помнить, что pH — логарифмическая функция, поэтому раствор, который имеет pH 5,0, будет в 10 раз «кислее» раствора с pH 6,0.

Кислотность природных субстратов различна:

желудочный сок	1,0
черноземные и каштановые почвы, сок креветки	2,0
пресная вода	7,0
щелочные почвы, экскременты животных, разлагающийся белок	9,0
насыщенный раствор извести	12,0

Границы значений pH , оптимальных для роста различных представителей прокариот, находятся в пределах приблизительно от 1,0 до 11,0. В зависимости от отношения к кислотности среды прокариоты могут быть разделены на несколько групп (рис. 35).

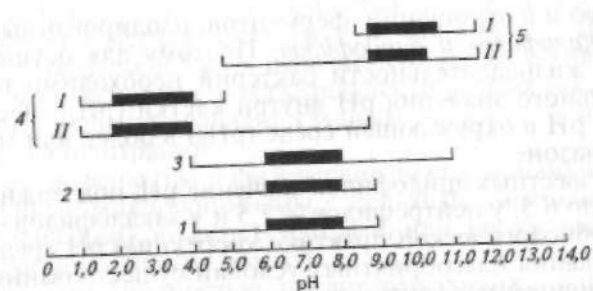


Рис. 35. Границы и оптимальные зоны роста прокариот в зависимости от pH и основанная на этом их классификация:

1 — нейтрофилы; 2, 3 — группы кислотоустойчивых и щелочустойчивых прокариот соответственно; 4 — ацидофилы; 5 — алкалофилы; I, II — облигатные и факультативные формы соответственно. Жирной линией выделен оптимальный pH роста

Для подавляющего большинства прокариот оптимальной является среда, близкая к нейтральной. Такие организмы называют *нейтрофилами*. Однако рост многих нейтрофилов возможен в средах, значение pH которых лежит в диапазоне от 4,0 до 9,0. Типичными нейтрофилами являются штаммы *Streptococcus faecalis* и многие патогенные бактерии. Многие нейтрофилы способны расти или выживать при значениях pH , лежащих за пределами указанного диапазона. Такие прокариоты считаются кислото- или щелочустойчивыми, т. е. толерантными. К *кислотоустойчивым* относятся многие грибы, микобактерии. *Щелочетолерантны*, т. е. устойчивы к значениям pH близким к 9,0...10,0, многие из энтеробактерий.

У некоторых видов бактерий адаптация к определенным значениям pH среды привела к тому, что оптимум pH для роста переместился в кислую (pH 4,0 и ниже) или щелочную (pH от 9,0 и выше) области. Такие прокариоты названы соответственно *ацидо-* или *алкалофильными* (кислото- или щелочелюбивыми).

Способность к росту при низких или высоких значениях pH обеспечивает организму определенные преимущества, так как в этих условиях мала конкуренция со стороны большинства других организмов. Однако некоторые бактерии (облигатные формы) не просто переносят высокие концентрации H^+ или OH^- , но и нуждаются в этих ионах для роста и стабильности, т. е. это результат эволюционной адаптации.

В природе можно наблюдать развитие бактерий при pH от 1,0 до 11,0, тогда как диапазон значений pH их цитоплазмы варьируется в гораздо более узких пределах. Большинство типов белков и других макромолекул бактериальной клетки стабильны и активны в ограниченном диапазоне значений pH , близком к 7,0. Это

справедливо и в отношении ферментов, изолированных из облигатных алкалофилов и ацидофилов. Поэтому для осуществления процессов жизнедеятельности бактерий необходимо поддержание стабильного значения рН внутри клетки (pH_i), несмотря на изменения рН в окружающей среде (pH_0) в более или менее широком диапазоне.

У всех известных ацидофилов значение pH_i поддерживается на уровне около 6,5, у нейтрофилов — 7,5 и у алкалофилов — 9,5.

В микробиологической практике коррекцию рН среды проводят для создания благоприятных условий существования тех или иных культивируемых микроорганизмов.

Соединения и ионы, токсичные для бактерий. Полное отсутствие в среде токсичных для организма веществ — это явление, по всей видимости, крайне редкое. Многие вещества могут быть полезными, индифферентными или вредными в зависимости от их концентрации в среде и конкретных условий существования организма. Есть и вещества, например соли золота, урана, ртути и др., для бактерий не только бесполезные, но и угнетающие их даже в очень низких концентрациях.

Действие токсичных для бактерий соединений может быть бактериостатическим или бактерицидным.

Бактериостаз (от греч. bacterion — палочка, stasis — стояние на месте) — задержка роста и размножения бактерий, вызванная действием неблагоприятных химических или физических факторов. Прекращение действия фактора приводит к возобновлению роста и деления, хотя при длительном его воздействии может начаться гибель клеток, т. е. фактор проявляет *бактерицидность* (от лат. caedere — убивать). Во многих случаях вещество в невысоких концентрациях обладает бактериостатическим, а в высоких — бактерицидным действием. Присутствие в природных средах соединений, токсичных для бактерий, приводит к уменьшению их видового разнообразия и появлению устойчивых форм.

Степень токсичности вещества для данной бактерии выражается через пороговую концентрацию, после достижения которой вещество становится бактерицидным, а также определяется его концентрационной экспонентой — n . После достижения пороговой концентрации токсичного вещества наблюдается полулогарифмическая зависимость степени отмирания клеток бактерий от времени, логарифм числа погибших клеток находится в линейной зависимости от времени воздействия. Концентрационная экспонента n рассчитывается по формуле

$$n = \frac{\log A - \log B}{\log C_1 - \log C_2}$$

где C_1 — большая и C_2 — меньшая концентрации вещества; A — время гибели определенной части клеток при концентрации C_1 , B — то же при концентрации C_2 .

Показатель n характеризует вещество, а не организм: n фенола равно 6, формальдегида и сулемы — 1, этанола — 9. Для фенола при $n = 6$ разведение в 3 раза означает снижение активности в 3^6 , т. е. в 729 раз. Различия в чувствительности разных бактерий к определенному веществу зависят главным образом от значений их пороговых концентраций.

Химические вещества и физические факторы используются для воздействия на микроорганизмы с целью полного обеспложивания (стерилизации) объекта (субстрата) или для уменьшения числа микроорганизмов в/на объекте.

Система мер, полностью предотвращающих проникновение микроорганизмов в макроорганизм при ранениях, хирургических вмешательствах, называется *асептикой*. Обезвреживание микроорганизмов в ранах при помощи химических средств (раствора йода, перекиси водорода, калия перманганата, бриллиантового зеленого и др.) называется *антисептикой* (от греч. anti — против, septicos — гнилостный). Под *дезинфекцией* понимают комплекс мер, направленных на уничтожение на объектах внешней среды или удаления из них патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Для дезинфекции используют химические средства неспецифического действия, применяемые для обработки помещений, оборудования и различных предметов. Дезинфекция позволяет уменьшить число патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды. *Стерилизацией* называют уничтожение всех видов и форм микроорганизмов в/на объекте.

В качестве химических средств асептики и антисептики, дезинфекции и стерилизации применяют кислоты, щелочи, окислители, хлорсодержащие препараты, органические соединения, соли тяжелых металлов, газы, галогены, красители, поверхностно-активные вещества, спирты и другие химические вещества и их смеси.

Антисептики (от греч. anti — против, septicos — гнилостный) — бактерициды, используемые в практической деятельности человека. Антисептики применяют в ветеринарии для обработки ран, в пищевой промышленности — для защиты продуктов от порчи, для предохранения от гниения деревянных сооружений и т. п.

Антисептики относятся к различным группам органических и неорганических веществ. Окислители действуют на сульфидрильные группы ферментов, окисляют активные группы белков.

Высокотоксичны для бактерий сильные окислители, многие из которых используют в качестве антисептиков. Это пероксид водорода, перманганат калия, галогены, озон, оксид этилена и др. Для обеззараживания питьевой воды широко применяют озон и хлор. Хлор гидролизует в воде с образованием хлорноватистой кислоты $HOCl$, которая обладает сильными бактерицидными свойствами.

Катионные антисептики — это разнообразные соединения, в молекулах которых присутствуют сильноосновные группы, связанные с липофильными участками. Уже в невысоких концентрациях эти вещества нарушают функции мембран, в частности работу мембранного АТФазного комплекса. Хлоргексидин, относящийся к этой группе веществ, находит практическое применение в ветеринарии.

Фенолы и их замещенные производные широко применяют как дезинфектанты, в меньших концентрациях — в качестве антисептиков. Препараты денатурируют белки и нарушают структуру клеточной стенки. От применения собственно фенола отказались давно вследствие его токсичности, но его производные (например, гексахлорофен, резорцин, хлорофен, тимол, салол) применяют и по сей день.

Газы как дезинфектанты известны с глубокой древности. Двуокись серы еще в античности широко применяли для обработки складов и предохранения пищевых продуктов от порчи. Не менее широкое распространение получила *дератизация* диоксидом серы. Для уничтожения спор микроорганизмов при стерилизации инструментов из пластмасс применяют оксид этилена и пропилена под давлением при 30...60 °С. Метод позволяет эффективно уничтожить большинство микроорганизмов, в том числе в тканях и жидкостях (кровь, гнойное отделяемое). Механизм действия связан со способностью оксида этилена алкилировать белки. В частности, повреждению подвергаются сульфгидрильные группы вегетативных форм и карбоксильные группы оболочек спор.

Бактериостатическим, а при высоких концентрациях бактерицидным действием обладают *красители* (риванол, бриллиантовый зеленый, трипафлавин). Они задерживают рост бактерий за счет сродства к фосфорноокислым группам нуклеопротеидов. Чувствительность различных форм бактерий к определенным красителям может существенно различаться, поэтому среды с красителями, например генциановым фиолетовым, метаниловым желтым, алizarином, оранжевым G и др., являются селективными, и их используют в качестве диагностических и дифференциальных при выделении определенных бактерий.

Тяжелые металлы в невысоких концентрациях стимулируют развитие тех или иных микроорганизмов, так как являются для них необходимыми микроэлементами, входящими в состав тех или иных ферментов. Стимуляцию развития микроорганизма иногда можно наблюдать и при невысоких концентрациях солей свинца, кадмия и других металлов, очевидно не являющихся необходимыми микроэлементами. Например, кадмий в концентрации 20 частей на 1 млн стимулировал рост *Lactobacillus acidophilus*,

а в концентрации 5...10 частей на 1 млн — рост *Streptococcus faecalis*; хотя при концентрации 40 частей угнетал развитие обеих этих бактерий. Стимуляция метаболизма микроорганизмов невысокими концентрациями токсических соединений может объясняться законом Арндта—Шульца, согласно которому аккумуляция яда в нелетальных концентрациях на поверхности клетки изменяет проницаемость мембраны, нарушает ее барьерные функции, что определяет свободное поступление питательных веществ в клетку и соответственно усиление метаболизма.

Действие ионов тяжелых металлов зависит от состава среды и природы соответствующих солей. Токсичность в значительной степени зависит от того, присутствует ли металл в растворе в виде свободного иона или в составе в основном недиссоциированной соли, а также входит ли данный элемент в состав органических или неорганических комплексных соединений.

Ионы тяжелых металлов способны соединяться с белками, нуклеотидами, коферментами, фосфолипидами, порфиринами, т. е. практически со всеми классами веществ, участвующих в метаболизме клетки. Ингибирование тяжелыми металлами активности металлоферментов может быть связано с замещением специфического катиона. Тяжелые металлы обладают также олигодинамическим действием по отношению ко многим бактериям за счет действия положительно заряженных ионов этих металлов, абсорбирующихся отрицательно заряженной поверхностью бактерий. При этом изменяется проницаемость цитоплазматической мембраны, нарушаются питание и размножение.

Спирты, или алкоголи (этанол, изопропанол и др.) как антисептики наиболее эффективны в виде 60...70%-ных водных растворов. Спирты осаждают белки и вымывают из клеточной стенки липиды. При правильном применении эффективны в отношении вегетативных форм большинства бактерий. Споры бактерий и грибов, а также вирусы к ним резистентны.

Галогены и галогенсодержащие препараты (препараты йода и хлора) широко применяют как дезинфектанты и антисептики. Препараты взаимодействуют с гидроксильными группами белков, нарушая их структуру.

Как антисептики используют *йодсодержащие препараты*: спиртовой раствор йода (5 % в этаноле); йодиол (1%-ный водный раствор содержит 0,1 % йода, 0,3 % калия йодида и 0,9 % поливинилового спирта, замедляющего выделение йода); йодонат (водный раствор комплекса поверхностно-активного вещества с йодом); йодовидон (комплекс йода с поливинилпирролидоном) и раствор Люголя применяют для обработки слизистых оболочек.

Как дезинфектанты эффективны *хлорсодержащие препараты*: газообразный хлор (взаимодействуя с водой, образует хлорновати-

стую кислоту; в присутствии органических веществ противомикробное действие уменьшается); хлорную известь (5,25 % NaClO, также образующую при растворении хлорноватистую кислоту); хлорамин Б (содержит 25...29 % активного хлора; для обеззараживания питьевой воды применяют в виде таблеток, содержащих 3 мг активного хлора).

Альдегиды алкилируют сульфгидрильные, карбоксильные и аминогруппы белков и других органических соединений, вызывая гибель микроорганизмов. Альдегиды широко применяют как консерванты. Наиболее известные — формальдегид (8 %) и глутаральдегид (2...2,5 %) — проявляют раздражающие действия (особенно пары), ограничивающие их широкое применение.

Раствор формальдегида обладает дезинфицирующим и дезодорирующим эффектами. Применяют для мытья рук, дезинфекции. Входит в состав препаратов (формидрон, мазь формалиновая). Мыльный раствор формальдегида (лизоформ) применяют для спринцеваний в гинекологической практике, для дезинфекции рук и помещений.

Уротропин (гексаметилентетрамин) в кислой среде организма расщепляется с выделением формальдегида; последний, экскретируясь с мочой, оказывает антисептическое действие. Применяют при инфекционных процессах мочевыводящих и желчевыводящих путей, кожных заболеваниях. Входит в состав комбинированных препаратов (кальцекс, уробесал).

Кислоты и щелочи применяют как антисептики. Среди кислот наиболее известны борная, бензойная, уксусная и салициловая. Применяют при поражениях, вызванных патогенными грибами и бактериями. Наиболее распространена салициловая кислота, применяемая в спиртовых растворах (1...2 %), присыпках, мазях, пастах (например, при дерматомикозах в областях, подверженных трению); оказывает также в зависимости от концентрации отвлекающее, раздражающее и кератолитическое действия. Из щелочей наиболее распространен раствор аммиака, применяемый для обработки рук хирурга (0,5%-ный раствор).

Антимикробный эффект металлов основан на способности осаждать белки и другие органические соединения. В качестве антисептиков широко применяют нитрат серебра (ляпис), сульфат меди (медный купорос) и хромат ртути (мербромин). Соединения металлов (особенно свинца, мышьяка и ртути) не рекомендуют применять для дезинфекции и антисептики, поскольку они способны накапливаться в организме.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ) (этоний, роккал, цигригель) оказывают бактерицидное действие за счет нарушения проницаемости ЦПМ, осмотического равновесия микробной клетки, что приводит к ее гибели. ПАВ являются соединениями четвертичных аммонийных оснований и используются в основном для обработки рук хирурга.

7.2.4. БАКТЕРИОФАГИ

Бактериофагами называют вирусы бактерий. Явление бактериофагии изучали Н. Ф. Гамалея (1898), Ф. Туорт (1915), Ф. д'Эрелль (1917). В результате агент, разрушающий бактерии, был назван **бактериофагом** (от греч. phagos — пожирающий).

Бактериофаг способен инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий (рис. 36).

Бактериофаги широко распространены в почве, воде, экскрементах больных и здоровых животных, человека и обнаружены более чем у 100 видов бактерий.

Хозяевами бактериофагов являются эшерихии, сальмонеллы, стафилококки, стрептококки, микобактерии, листерии, коринибактерии и другие микроорганизмы. Процесс взаимодействия фага с клеткой протекает по типу продуктивной инфекции, или лизогении. В зависимости от этого различают вирулентные и умеренные фаги. **Вирулентные фаги** при проникновении в клетку бак-

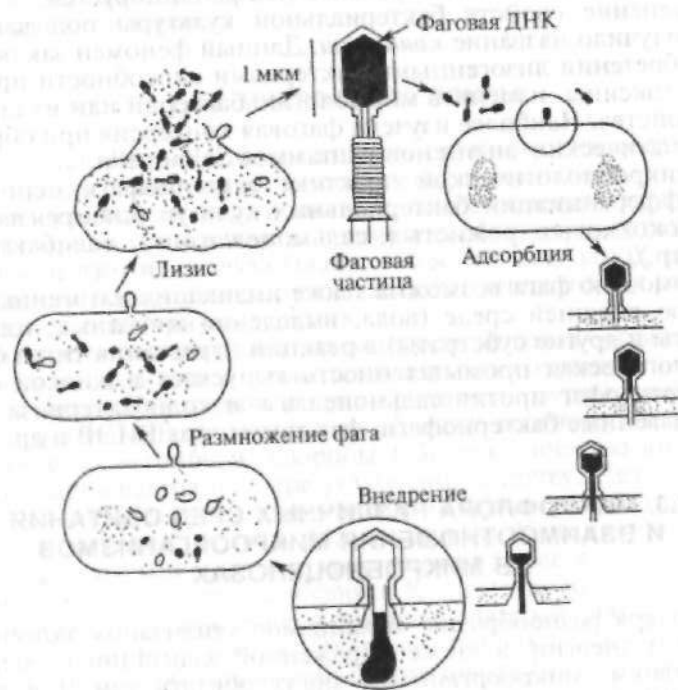


Рис. 36. Цикл развития бактериофага

терий размножаются в ней и вызывают лизис; умеренные фаги не вызывают лизиса, а остаются в состоянии лизогении.

По степени специфичности фаги разделяют на три группы: *полифаги* — лизируют родственные бактерии, *монофаги* — бактерии одного вида, а *фаговары* — только определенные варианты данного вида бактерий.

При контакте умеренного бактериофага с микробной клеткой последняя не лизируется и становится носителем бактериофага. Это явление получило название *лизогении*, а бактериальные культуры, обладающие этим свойством, называются *лизогенными*. Различают монолизогенность и полилизогенность.

Бактериальная культура, образующая один вид фага, является *монолизогенной*. Бактериальная культура, образующая несколько видов фагов, называется *полилизогенной*. Фаг, способный лизогенировать клетку-хозяина, называется *умеренным*. При лизогении бактериофаг находится в состоянии *профага*, в котором бактериальная клетка не погибает. Профаг представляет собой геном вируса, ассоциированный с бактериальной хромосомой. Профаг в отличие от генома вирулентного фага воспроизводится как часть бактериальной ДНК и синхронно с ней реплицируется.

Изменение свойств бактериальной культуры под влиянием фага получило название *конверсии*. Данный феномен заключается в приобретении лизогенными бактериями способности продуцировать токсины, изменять морфологию бактерий или их антигенные свойства. Наиболее изучена фаговая конверсия при образовании соматических антигенов у штаммов *Salmonella*.

В микробиологической практике бактериофаги используют для дифференциации бактериальных культур (сибиреязвенных, стафилококковых, рожистых, сальмонеллезных, колибактериозных и др.).

С помощью фага возможна также индикация патогенных бактерий во внешней среде (вода, выделения животных, пищевые продукты и другие субстраты) в реакции нарастания титра фага.

Биологическая промышленность выпускает в жидкой форме коли-гертнерфаг против сальмонеллеза и колибактериоза телят, сибиреязвенные бактериофаги, фаг-гамма, фаг ВИЭВ и др.

7.3. МИКРОФЛОРА РАЗЛИЧНЫХ СРЕД ОБИТАНИЯ И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В МИКРОБИОЦЕНОЗАХ

Благодаря разнообразию механизмов утилизации источников питания и энергии, а также выраженной адаптации к внешним воздействиям, микроорганизмы могут обитать там, где другие формы жизни невозможны. Естественные среды обитания большей части организмов — вода, почва и воздух. Число микроорга-

низмов, обитающих на растениях и в организмах животных, значительно меньше. Широкое распространение микроорганизмов связано с легкостью их перемещения по воздуху и воде; в частности, поверхность и дно пресноводных и соленых водоемов, а также несколько сантиметров верхнего слоя почвы изобилуют микроорганизмами, разрушающими органические вещества. Меньшее количество микроорганизмов колонизирует поверхность растений, кожу и волосяной покров, а также некоторые внутренние полости животных (например, ЖКТ, верхние отделы дыхательных путей). В зонах обитания микроорганизмы образуют *микроценозы* — сообщества со специфическими и часто необычными взаимоотношениями. Каждое микробное сообщество в конкретном ценозе образует специфические *аутохтонные микроорганизмы* (от греч. *autos* — свой, *chthon* — страна), обычно в них встречающиеся. В природных биоценозах (почва, вода, воздух) выживают и размножаются лишь те микроорганизмы, которым благоприятствует окружающая среда; их рост прекращается, как только условия окружающей среды меняются. В природе большую часть бактерий поедают хищные простейшие, но часть клеток каждого вида выживает; при наступлении благоприятных условий они дают начало новым клонам микроорганизмов.

7.3.1. МИКРОФЛОРА ПОЧВЫ

Почва состоит из минеральных и органических соединений. Она — продукт жизнедеятельности микроорганизмов, осуществляющих процесс ее формирования, самоочищения, круговорота азота, углерода, серы и железа в природе. Микроорганизмы почвы фиксируют азот из воздуха (около 100 млн т ежегодно), образуют гумус почвы и высвобождают питательные вещества для растений, выполняют санитарную функцию.

Очаговость распространения микроорганизмов — главная особенность их экологии в почве, позволяющая сохранить виды почвенных микроорганизмов и специфичность группировок по горизонтам почвы. В верхних слоях обитают актиномицеты и аэробы. В нижних — грибы и анаэробы. Общее количество микроорганизмов уменьшается по мере углубления в почву. Независимо от глубины наиболее густо всегда заселена *околокорневая* (ризосферная) зона растений (от греч. *rhiza* — одежда). Качественный состав околокорневой микрофлоры зависит от вида растений, но во всех случаях преобладает грибная флора. Количество микроорганизмов околокорневой зоны в тысячи раз превышает микробное число не занятой растениями почвы. Этот факт используется при обезвреживании почвы, обсемененной патогенными бактериями.

Микрофлора почвы включает все известные группы микроорганизмов: споровые и не образующие спор бактерии, актиномице-

ты, грибы, спирохеты, архебактерии, простейшие, сине-зеленые водоросли, микоплазмы и вирусы. В 1 г почвы насчитывается до 6 млрд микробных тел. На качественный и количественный состав микрофлоры почвы влияет тип почвы, ее плодородие, влажность, аэрация и физико-химические свойства. На микробиоценоз почвы существенно влияет деятельность человека: обработка, внесение удобрений, мелиорация, загрязнение отходами производств.

Особо опасным в санитарном отношении является загрязнение почвы необезвреженными отходами животноводства (навоз, моча, отходы боенского производства, трупы животных). Способность почвы к самоочищению ограничена, а методы обеззараживания громоздки и малоэффективны (например, 5 кг хлорной извести на 1 м² почвы).

Некоторые патогенные микроорганизмы в зависимости от экологических особенностей вегетируют в почве, которая и служит для них естественным местом обитания. Представители другой группы, в том числе и споронеобразующие микроорганизмы, длительно сохраняются в почве определенного физико-химического состава, где при благоприятном температурно-влажностном режиме размножаются. К третьей группе относятся возбудители хламидиозов, риккетсии, вирусы и особо прихотливые бактерии. Они быстро отмирают в почве.

Обеззараживающая способность разных почв неодинакова и подчас почва может служить благоприятным субстратом для патогенных микроорганизмов. Почва как субстрат, состоящий из твердой фазы и воды, служит естественным местом обитания для возбудителей многих заразных болезней: клостридиозов, сибирской язвы, псевдотуберкулеза, листериоза, лептоспироза, эризипелоида, туберкулеза, мелиоидоза, инфекции, вызванной синегнойной палочкой, дерматомикозов, микотоксикозов, холеры, иерсиниоза, сальмонеллеза.

Санитарное состояние почвы оценивают по коли-титру, количеству анаэробов, споровых и термофилов, по наличию яиц гельминтов и специфических возбудителей инфекций. Для чистой почвы титр кишечной палочки не более 1 г, умеренно загрязненной — до 50 мг, для сильно загрязненной — 1...2 мг.

Обезвреживание почвы, обсемененной патогенными микроорганизмами, проводят механической обработкой и посевом растений. Применение химических веществ приводит к утрате почвой плодородия.

7.3.2. МИКРОФЛОРА КОРМОВ

Эпифитная микрофлора. На поверхностных частях растений постоянно присутствует разнообразная микрофлора, называемая эпифитной. На стеблях, листьях, цветах, плодах наиболее часто

встречаются следующие неспорные виды микроорганизмов: *Erwinia herbicola* составляет 40 % всей эпифитной микрофлоры, *Pseudomonas fluorescens* — 40 %, молочнокислые бактерии — 10 %, им подобные — 2 %, дрожжи, плесневые грибы, целлюлозные, маслянокислые, термофильные бактерии — 8 %.

После скашивания растений и потери ими сопротивляемости, а также в силу механического повреждения их тканей эпифитная и прежде всего гнилостная микрофлора, интенсивно размножаясь, проникает в толщу растительных тканей и вызывает их разложение. Именно поэтому продукцию растениеводства (зерно, грубые и сочные корма) предохраняют от разрушительного действия эпифитной микрофлоры консервированием различными методами.

Известно, что в растениях имеется связанная вода, входящая в состав их химических веществ, и свободная — капельно-жидкая. Микроорганизмы могут размножаться в растительной массе только при наличии в ней свободной воды. Одним из наиболее распространенных и доступных методов удаления из продуктов растениеводства свободной воды и, следовательно, их консервирования является высушивание и силосование.

Сушка зерна и сена предусматривает удаление из них свободной воды. Поэтому микроорганизмы на них размножаться не могут до тех пор, пока эти продукты будут сухими. В свежескошенной неперестоявшей траве воды содержится 70...80 %, в высушенном сене только 12...16 %, оставшаяся влага находится в связанном с органическими веществами состоянии и микроорганизмами не используется.

Во время сушки сена теряется около 10 % органических веществ, главным образом за счет разложения белков и сахаров. Особенно большие потери питательных веществ, витаминов и минеральных соединений отмечаются в высушенном сене, находящемся в прокосах (валках), когда часто идут дожди. Дождевая дистиллированная вода вымывает их до 50 %.

Значительные потери сухого вещества происходят в зерне при его самонагревании. Этот процесс обусловлен термогенезом, т. е. созданием тепла микроорганизмами. Возникает он потому, что термофильные бактерии в процессе своей жизнедеятельности используют только 5...10 % энергии потребляемых ими питательных веществ, а остальная выделяется в окружающую их среду — зерно, сено.

Микрофлора силоса. При выращивании кормовых культур (кукурузы, сорго и др.) с одного гектара удается получить в зеленой массе значительно больше кормовых единиц, чем в зерне. По крахмальному эквиваленту питательность зеленой массы при сушке может снизиться на 50 %, а при силосовании — только на 20 %. При силосовании не теряются мелкие листья растений, обладающие высокой питательностью, а при высушивании они опадают.

Закладку силоса можно производить и при переменной погоде. Хороший силос представляет собой сочный, витаминный, молочно-кислый корм.

Микроорганизмы почвы попадают на поверхность наземной части растений и формируют эпифитную микрофлору, количественные и видовые характеристики которой зависят от вида растения. В состав эпифитной микрофлоры всегда входят лактобактерии, играющие важную роль в силосовании растений. Под действием ферментов — возбудителей молочнокислого и уксуснокислого брожения — происходит сбраживание сахаров корма до молочной и уксусной кислот, которые оказывают ингибирующее действие на ферментные системы микроорганизмов других групп, в том числе и гнилостных. Чистые культуры *Lactococcus plantarum*¹, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus* вносят в силосную массу для накопления антибиотических и стимулирующих организм животных веществ. Ризосферная и эпифитная микрофлора могут играть и негативную роль. Корнеплоды нередко поражаются гнилью (черной — *Alternaria radicina*, серой — *Botrytis cinerea*, картофельной — *Phytophthora infestans*). К порче силоса приводит чрезмерная деятельность возбудителей маслянокислого брожения. На вегетирующих растениях размножается спорынья (*Claviceps purpurea*), вызывающая заболевание эрготизм. Грибы вызывают токсикозы. Возбудитель ботулизма (*Clostridium botulinum*), попадая в корм с почвой и фекалиями, служит причиной тяжелого токсикоза, нередко с летальным исходом. Многие грибы (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Stachybotrys*) заселяют корма, размножаясь при благоприятных условиях, и вызывают у животных острые или хронические токсикозы, чаще проявляющиеся неспецифическими симптомами.

Сущность силосования состоит в том, что в заложенной в емкости измельченной зеленой массе интенсивно размножаются молочнокислые микробы, разлагающие сахара с образованием молочной кислоты, накапливающейся в количестве до 1,5...2,5 % к массе силоса. Одновременно размножаются уксуснокислые бактерии, превращающие спирт и другие углеводы в уксусную кислоту; ее накапливается 0,4...0,6 % к массе силоса. Молочная и уксусная кислоты являются сильным ядом для гнилостных микробов, поэтому размножение их прекращается.

Силос сохраняется в хорошем состоянии до трех лет, пока в нем содержится не менее 2 % молочной и уксусной кислот, а pH составляет 4,0...4,2. Если размножение молочнокислых и уксуснокислых бактерий ослабевает, то концентрация кислот снижается. В это время одновременно начинают размножаться дрожжи, плесени, маслянокислые и гнилостные бактерии, и силос портится.

¹ Впервые описаны как виды *Streptococcus*. — *Примеч. ред.*

Таким образом, получение хорошего силоса зависит прежде всего от наличия в зеленой массе сахароз и интенсивности развития молочнокислых бактерий.

7.3.3. МИКРОЦЕНОЗЫ ВОДОЕМОВ

В морях, реках, озерах и в других водоемах, а также в грунтовых водах содержится значительное число видов микроорганизмов. Степень распространенности микробов в воде зависит от многих условий.

У берегов Филиппин микроорганизмы обнаружены на глубине 10 462 м. При культивировании этих микробов при температуре 25 °С и давлении 1000 атм они размножались в 1000 раз быстрее, чем при обычных условиях.

Одноклеточные зеленые водоросли в фитопланктоне океанов составляют 60 % всех органических веществ, образовавшихся на нашей планете путем фотосинтеза.

Обитают микроорганизмы и в горячих источниках. Процесс фотосинтеза происходит у них при температуре 75 °С, а в щелочных водах бактерии выживают при температуре 100 °С.

В водах небольшого антарктического озера Дон Жуан солей содержится в 13 раз больше, чем в морской воде. Вода в этом озере не замерзает при температуре -24 °С, но и в этом озере нашли бактерии и дрожжи. В водах Антарктиды обнаруживается до 100 бактерий в 1 г.

Преобладающая микрофлора рек, озер, прудов — сапрофиты, т. е. гнилостные микроорганизмы. К ним относятся *Pseudomonas fluorescens*, *Flavolacterium aquatile*, *Chromobacterium violaceum*, *Proteus vulgaris*, плесневые грибы и др.

Глубокие почвенные воды, ключевая, артезианская вода почти свободны от микроорганизмов. Незначительно загрязнены микрофлорой атмосферные осадки, так как снег и вода увлекают большинство микробов воздуха вместе с пылью и после выпадения осадков воздух особенно чист.

Характер микрофлоры водоемов определяется особенностями конкретной водной среды. Микрофлору водоемов образуют две группы: аутохтонные (собственно водные) и аллохтонные (падающие извне при загрязнении) микроорганизмы.

Аутохтонная микрофлора — совокупность микроорганизмов, постоянно живущих и размножающихся в воде. Микробный состав воды напоминает микрофлору почвы, с которой вода соприкасается (придонные и прибрежные почвы).

В состав специфической водной микрофлоры входят *Micrococcus candicans* и *M. roseus*, *Sarcina lutea*, *Bacterium aquatilis communis*, *Pseudomonas fluorescens*, различные виды *Proteus* и *Leptospira*. Среди анаэробов в незагрязненных водоемах выделяют

Bacillus cereus, *Mycoplasma mycoides*, *Chromobacterium violaceum*, виды *Clostridium*.

Аллохтонная микрофлора — совокупность микроорганизмов, случайно попавших в воду и сохраняющихся в ней сравнительно короткое время.

Количественные соотношения микроорганизмов в открытых водоемах варьируются в широких пределах, что зависит от типа водоема, степени его загрязнения, смены метеорологических условий, времени года и т. д.

Микроорганизмы воды играют значительную роль в круговороте веществ, расщепляя органические продукты животного и растительного происхождения и обеспечивая питательными веществами другие организмы, живущие в воде.

Источником загрязнения воды в реках чаще всего служат бытовые и промышленные отходы. В озерах, прудах и болотах не всегда обитает большое количество микроорганизмов. В открытые водоемы большая часть микробов попадает из почвы. Поэтому в озерах, прудах, реках наивысшее содержание микрофлоры отмечается в прибрежной зоне.

В воде обитают все известные группы микробов, но наиболее существенный компонент населения водоемов — бактерии. Как известно, цитоплазматическая мембрана бактерий обладает способностью транслокации, т. е. активного переноса через клеточную стенку питательных веществ. Благодаря этому бактерии способны потреблять питательный субстрат, присутствующий в ничтожно малых концентрациях и не доступный другим организмам (1...5 мг/л), используя различные источники жизни, а также синтезировать органические вещества. Процессы окисления бактериями органических и минеральных веществ воды и сопряженного с ним бактериального синтеза являются, наряду с фотосинтезом водорослей, самыми значительными биологическими процессами, протекающими в водоемах.

Бактериями осуществляется круговорот серы в водоемах. Образование донных отложений полезных ископаемых также происходит с участием микробоорганизмов.

Микробы окисляют до минеральных соединений органические вещества, в огромных количествах попадающие в водоемы. Степень загрязнения, в том числе болезнетворными микробами, может быть препятствием для использования воды. Поэтому любой водный источник необходимо подвергать санитарно-микробиологической оценке.

Способность воды к самоочищению намного ниже, чем у почвы, и вследствие этого болезнетворные микробы не только длительно сохраняются в водоемах, но и размножаются.

Самоочищение водоемов обуславливается рядом факторов:

1) быстрым течением воды, что ведет к уменьшению концентрации органических веществ;

- 2) бактерицидным действием инсоляции;
- 3) минерализацией органических соединений микробами;
- 4) наличием пищевой цепи: бактерия — простейшие — насекомые — рыба, животные — человек;
- 5) адсорбцией твердыми частицами ила;
- 6) адсорбцией на поверхности растений;
- 7) действием фитонцидов растений.

В чистой воде преобладают кокки, в загрязненной — бактерии, в том числе споровые. Кроме того, признаком низкого санитарного качества воды является малое количество свободного кислорода в ней или он отсутствует вообще.

Для обеззараживания воды эффективны следующие методы:

- 1) отстаивание с применением коагулянтов (сернистый глинозем, сульфат закиси железа) и активного ила;
- 2) аэрация, хлорирование в аэротенках;
- 3) биологическая очистка на полях орошения;
- 4) высушивание и термическая обработка;
- 5) воздействие α -, β -, γ - и УФ-лучами.

При попадании патогенных микроорганизмов в воду на них воздействует множество разнообразных факторов: адсорбция твердыми частицами и поверхностью растений, поглощение простейшими, УФ-излучение, антибиотики и фитонциды. В открытых водоемах, особенно находящихся на неблагоприятных по инфекционным болезням территориях, обнаруживают возбудителей природно-очаговых инфекций. В донных отложениях прудов и озер нередко обитают возбудители ботулизма, злокачественного отека, эмфизематозного карбункула. Патогенные микроорганизмы водоемов могут включаться в пищевые цепи и по ним передаваться разным группам животных, птиц и рыб.

7.3.4. МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА

В воздухе всегда содержится то или иное количество микроорганизмов. По воздуху происходит их распространение. Воздушным путем могут распространяться патогенные микробы, вызывающие болезни растений, животных и человека.

Число микроорганизмов в 1 м³ воздуха в разных местах может достигать следующих показателей: в скотном дворе до 2 млн микробных тел; в жилых помещениях — 20 тыс; на улицах городов — 5 тыс; в парках — 200; в морском воздухе — 1...2 микробных тел.

Методом стеклования в воздухе обнаружено размножение микробов на органическом веществе. Исследование воздуха на наличие микроорганизмов осуществляют следующими методами: седиментационным, фильтрационным и основанным на использовании ударного действия воздушной волны.

Обеззараживание воздуха проводят разными способами: с применением газов (фенол, C₅H₆O₃); аэрозолей (формалин с креолином); УФЛ-аэроионизаторов; удалением воздуха (вентиляция).

Бактерии, водоросли, дрожжи, споры грибов встречаются в воздухе на любой высоте. В воздухе животноводческих помещений всегда обнаруживаются *E. coli*, стафилококки, грибы, протей. Нередко происходит аэрогенное перезаражение животных патогенными видами.

Контаминация воздуха патогенными микроорганизмами происходит капельным путем при кашле, чихании и фыркании животных. Кроме того, микроорганизмы попадают в воздух со слушающимися эпителием кожных покровов, из кормов и фекалий.

Аэрозоль — коллоидная система, состоящая из воздуха, капелек жидкости или твердых частиц, и включающая различные микроорганизмы. Размер аэрозольных частиц варьируется от 10 до 2000 нм. При чихании может образовываться до 40 000 капель. В зависимости от размера частиц, электрического заряда, скорости движения в воздухе различают капельную и пылевую фазы аэрозоля, а также капельные ядрышки.

Капельная фаза представлена мелкими каплями, длительно сохраняющимися в воздухе, но испаряющимися до оседания.

Пылевая фаза — крупные, быстро оседающие частицы, образующие пыль, способную подниматься в воздух.

Капельные ядрышки — мелкие капельки аэрозоля (до 100 нм); высыхая, остаются в воздухе во взвешенном состоянии и образуют устойчивую аэродисперсную систему. В них частично сохраняется влага, поддерживающая жизнеспособность микроорганизмов. Последние в составе капельных ядрышек могут переноситься на значительные расстояния.

7.3.5. МИКРОФЛОРА МОЛОКА

В молоке содержится более 200 веществ, легко доступных для микроорганизмов, поэтому они интенсивно размножаются в этой среде. В состав молока входят белки, пептоны, полипептиды, глобулины, альбумины, казеин, аминокислоты, много жирных кислот, липидов, молочного сахара (лактозы), есть витамины, гормоны, ферменты и минеральные соли. И всегда в натуральном молоке существуют микроорганизмы, так как вымя — открытый орган.

Микроорганизмы, которые постоянно обнаруживаются в молоке и не приводят к его порче, относятся к *нормальной*, а случайно попадающие в молоко и вызывающие его порчу — *анормальной* микрофлорой. В состав нормальной микрофлоры входят дрожжи (*Saccharomyces forula*). Из грибов в молоке присутствуют (*Aspergillus, Penicillium, Oidium*). Представителей рода *Penicillium* используют в производстве мягких сыров (рокфор, бри). К нормальной микрофлоре относятся возбудители гомоферментативного молочнокислого брожения (*Lactococcus lactis, Lactobacillus casei, L. acidophilus, L. bulgaricus*). В молоке всегда обнаруживается

E. coli, которая участвует в производстве сыров, получаемых из цельного необеззараженного молока.

В молоке могут обнаруживаться гнилостные, маслянокислые бактерии, протей и многие другие микроорганизмы. Источниками микрофлоры молока кроме паренхимы вымени служат молочная посуда, трубопровод, кожа вымени, руки дояра, корма, воздух животноводческих помещений. Наибольшее число микробных тел находится в сосковом канале вымени. Этому способствует наличие молока, открытость канала для микроорганизмов и положительная температура. В сосковом канале микробы формируют так называемую бактериальную пробку. Перед доением первую струйку молока с бактериальной пробкой удаляют в отдельный сосуд.

Больные инфекционными болезнями лактирующие животные выделяют возбудителей с молоком (сибирская язва, туберкулез, бруцеллез, Ку-лихорадка и др.). Нормальная, аномальная и патогенная микрофлора может размножаться в молоке при определенной температуре. Поэтому для сохранения качества молока непосредственно после получения его сразу охлаждают до температуры 10...12 °С.

У молока отмечают бактерицидную фазу — период времени, в течение которого микробы, находящиеся в нем, не размножаются благодаря наличию веществ (лизоцим, иммуноглобулины, лактоферрин), угнетающе действующих на микробные тела. Длительность бактерицидной фазы зависит от сроков охлаждения молока и находится в обратной зависимости от числа микробов в молоке, его температуры и может продолжаться до 24...48 ч.

В молоке, охлажденном до 10...12 °С, число микроорганизмов увеличивается за сутки в 10 раз, при температуре 18...20 °С — в сотни раз, при температуре 30...35 °С — в сотни тысяч раз.

Первая фаза размножения микрофлоры в молоке — фаза смешанной микрофлоры. Если температура молока превышает 10 °С, то после разрушения бактерицидных веществ находящиеся в нем гнилостные, молочнокислые и другие микробы начинают размножаться. Преобладающая роль здесь принадлежит гнилостным бактериям. На вкус такое молоко неприятное, кисловатое. При его скармливании у молодняка развиваются энтериты.

Во *второй фазе* наиболее энергично размножаются молочнокислые бактерии и стрептококки. Накапливаемая этими микробами молочная кислота (до 1 %) угнетает развитие гнилостной микрофлоры, и она в значительной степени отмирает. Казеин под влиянием молочной кислоты набухает, и молоко свертывается.

В *третьей фазе* размножаются преимущественно молочнокислые палочки, при этом концентрация молочной кислоты достигает 2,5...3,5 %, поэтому стрептококки и кишечная палочка гибнут.

В четвертой фазе концентрация молочной кислоты удерживается на высоком уровне, она подавляет развитие и самих молочнокислых бактерий, вследствие чего количество микробов в свернувшемся молоке резко снижается. В дальнейшем начинают усиленно размножаться дрожжи и молочная плесень.

При хранении молока в условиях низкой температуры (2...4 °С) в нем размножаются преимущественно флуоресцирующие бактерии. При температуре 5...10 °С начинает развиваться и гнилостная флора, поэтому молоко, хранящееся при низкой температуре, прогоркает, становится непригодным в пищу и не может скормливаться молодняку животных.

Для обеззараживания и консервирования молока используют пастеризацию, кипячение, высушивание, ультразвук и явление кавитации.

Санитарное качество молока оценивают по его кислотности, выраженной в градусах, количеству микроорганизмов в 1 мл молока, коли-титру и наличию возбудителей инфекционных болезней.

7.3.6. МИКРОФЛОРА ТЕЛА ЖИВОТНЫХ

Нормальная микрофлора организма животных. Тело представляет для микроорганизмов целый мир с множеством экологических ниш. В естественных условиях организм любого животного населен множеством микроорганизмов. Среди них могут быть случайные формы, но для многих видов тело животного является основным или единственным местом обитания. Характер и механизмы взаимодействий макроорганизма с микроорганизмами многообразны и играют решающую роль в жизни и эволюции многих видов последних. Для животного микроорганизмы также представляют важный экологический фактор, определяющий многие стороны его эволюционных изменений.

С современных позиций нормальную микрофлору рассматривают как совокупность микробиоценозов, занимающих многочисленные экологические ниши на коже и слизистых оболочках всех сообщающихся с внешней средой полостей организма. В значительной части микрофлора одинакова у всех животных в сравнимых биотопах, но в составе микробиоценоза имеются индивидуальные различия. Аутомикрофлора здорового животного остается постоянной и поддерживается гомеостазом; ткани и органы, не сообщающиеся с внешней средой, стерильны. Организм и его нормальная микрофлора составляют единую экологическую систему: микрофлора служит своеобразным «экстракорпоральным органом», играющим важную роль в жизнедеятельности животного. Будучи биологическим фактором защиты, нормальная микрофлора является тем барьером, после прорыва которого индуцируется включение неспецифических механизмов защиты. Если фак-

торы, действующие прямо и косвенно на колонизационную резистентность и функционирование нормальной микрофлоры, по своей интенсивности и длительности будут превышать компенсаторные возможности микроорганизма как экосистемы, то неизбежно возникнут микроэкологические нарушения. Степень выраженности и длительность этих нарушений будут зависеть от дозы и продолжительности воздействия.

Микрофлора кожи. Кожный покров имеет свои особенности, свой рельеф, свою «географию». Клетки эпидермиса постоянно отмирают, и пластинки рогового слоя слущиваются. Поверхность кожи постоянно «удобряется» продуктами выделения сальных и потовых желез. Потовые железы обеспечивают микроорганизмы солями и органическими соединениями, в том числе азотсодержащими. Выделения сальных желез богаты жирами.

Микроорганизмы заселяют главным образом участки кожи, покрытые волосами и увлажненные потом. На таких участках насчитывается около $1,5 \cdot 10^6$ клеток/см². Некоторые виды микроорганизмов приурочены к строго определенным зонам.

Как правило, на коже преобладают грамположительные бактерии. Типичными обитателями являются различные виды *Staphylococcus*, в частности *S. epidermidis*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Acinetobacter*.

Появление *S. aureus* свидетельствует о неблагоприятных изменениях микрофлоры организма. Представители рода *Corynebacterium* иногда составляют до 70 % всей кожной микрофлоры. Некоторые виды являются липофильными, т. е. образуют липазы, разрушающие выделения сальных желез.

Большинство микроорганизмов, населяющих кожу, не представляют какой-либо опасности для хозяина, но некоторые, и прежде всего *S. aureus*, условно-патогенные.

Нарушение нормального сообщества бактерий кожи может иметь неблагоприятные последствия для макроорганизма.

На кожных покровах микроорганизмы подвержены действию бактерицидных факторов сального секрета, повышающих кислотность (соответственно значение pH снижается). В подобных условиях живут преимущественно *S. epidermidis*, микрококки, сарцины, аэробные и анаэробные дифтероиды. Другие виды — *S. aureus*, α-гемолитические и негемолитические стрептококки — правильнее рассматривать как транзиторные. Основные зоны колонизации — эпидермис (особенно роговой слой), кожные железы (сальные и потовые) и верхние отделы волосяных фолликулов. Микрофлора волосяного покрова идентична микрофлоре кожи.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта. Наиболее активно микроорганизмы заселяют желудочно-кишечный тракт ввиду обилия и разнообразия в нем питательных веществ.

Кислая среда желудка является начальным фактором, контролирующим размножение микроорганизмов, поступающих в него с пищей. После прохождения желудочного барьера микробы попадают в более благоприятные условия и размножаются в кишечнике при достаточном количестве питательных веществ и соответствующей температуре. Подавляющее большинство микроорганизмов обитает в виде фиксированных микроколоний и ведет преимущественно иммобилизованный образ жизни, располагаясь на слизистой оболочке послойно. Первый слой — непосредственно на клетках эпителия (микрофлора слизистой оболочки), последующие слои (один над другим) — просветная микрофлора, погруженная в особое слизистое вещество, являющееся отчасти продуктом слизистой оболочки кишки, отчасти — продуктом самих бактерий.

Прикрепившись, микроорганизмы продуцируют экзополисахаридный гликокаликс, обволакивающий микробную клетку и образующий биопленку, внутри которой происходит деление бактерий и осуществляется межклеточное взаимодействие. Микрофлора толстой кишки подразделяется на М-флору (мукозную) и П-флору (полостную), обитающую в просвете кишечника. М-флора — пристеночная флора, представители которой или фиксированы на рецепторах слизистой оболочки кишечника (бифидумфлора) или опосредованно через взаимодействие с другими микроорганизмами прикрепляются к бифидобактериям.

Адгезия осуществляется через поверхностные структуры бактерий, содержащие гликолипиды (лектины), которые комплементарны рецепторам (гликопротеидам) мембран эпителиальных клеток. Лектины могут быть локализованы в мембранах бактерий, на их поверхности, а также на специфических фимбриях, которые, проходя сквозь толщу экзополисахаридного гликокаликса, фиксируют бактерии к соответствующим рецепторам эпителия слизистой оболочки.

Таким образом, на поверхности слизистой оболочки кишечника образуется биопленка, состоящая из экзополисахаридного муцина микробного происхождения и миллиардов микроколоний. Толщина биопленки колеблется от долей до десятков микрометров, при этом число микроколоний может достигать нескольких сотен и даже тысяч по высоте слоя. В составе биопленки микроорганизмы в десятки, а то и сотни раз более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов по сравнению с тем, когда они находятся в свободно плавающем состоянии, т. е. М-флора более стабильна. Главным образом, это бифидо- и лактобактерии, образующие слой так называемого бактериального дерна, препятствующего пенетрации слизистой оболочки патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Конкурируя за взаимодействие с рецепторами эпителиальных клеток, М-флора обуславливает колонизационную резистентность толстой кишки. П-флора, наряду

с бифидо- и лактобактериями, включает и других постоянных обитателей кишечника.

Облигатная микрофлора (резидентная, индигенная, аутохтонная) в норме обнаруживается у всех здоровых животных. Это микроорганизмы, максимально приспособленные к существованию в кишечнике. До 95 % приходится на анаэробную флору (бактероиды, бифидобактерии, лактобактерии) — это основная микрофлора ($10^9 \dots 10^{10}$ микробных тел в 1 г).

Факультативная микрофлора выявляется у части обследуемых. От 1 до 4 % общего количества микроорганизмов приходится на факультативные анаэробы (энтерококки, кишечные палочки) — это сопутствующая флора ($10^5 \dots 10^7$ микробных тел в 1 г).

Транзиторная микрофлора (временная, необязательная) встречается у части животных (в определенных промежутки времени). Ее присутствие определяется поступлением микробов из окружающей среды и состоянием иммунной системы. В состав ее входят сапрофиты и условно-патогенные микроорганизмы (протей, клебсиеллы, синегнойная палочка, грибы рода *Candida*) — это остаточная флора (до 10^4 микробных тел в 1 г).

В кишечник травоядных попадает большое количество клетчатки. Известно, что только некоторые беспозвоночные могут переваривать клетчатку самостоятельно. В большинстве случаев переваривание целлюлозы происходит за счет разрушения ее бактериями, а животное потребляет в качестве пищи продукты ее деградации и сами клетки микроорганизмов. Таким образом, здесь наблюдается кооперация, или симбиоз. Наибольшего совершенства этот тип взаимодействий достиг у жвачных животных. В их рубце корм задерживается достаточно долго, чтобы могли быть разрушены доступные микроорганизмам компоненты растительных волокон. В этом случае, однако, бактерии используют значительную часть растительного белка, который в принципе мог бы быть разрушен и использован самим животным. У многих животных взаимодействие с кишечной микрофлорой носит промежуточный характер. Например, в кишечнике у лошадей, кроликов, мышей корм в значительной степени используется до того, как начнется бурное развитие бактерий. Но следует отметить, что в отличие от хищников, у таких животных корм дольше задерживается в кишечнике, что способствует ее сбраживанию бактериями.

Наиболее активная жизнедеятельность микроорганизмов отмечается в толстой кишке. Анаэробы развиваются, осуществляя брожение, в процессе которого образуются органические кислоты — преимущественно уксусная, пропионовая и масляная. При ограниченном поступлении углеводов образование этих кислот энергетически выгоднее, чем продукция этанола и молочной кислоты. Происходящее здесь же разрушение белков приводит к снижению

кислотности среды. Накапливающиеся кислоты могут быть использованы животным.

В состав кишечной микрофлоры различных животных входит ряд видов бактерий, способных разрушать целлюлозу, гемицеллюлозы, пектины. У многих млекопитающих в кишечнике обитают представители родов *Bacteroides* и *Ruminococcus*; *B. succinogenes* был обнаружен в кишечнике лошадей, коров, баранов, антилоп, крыс, обезьян; *R. album* и *R. flavofaciens*, активно разрушающие клетчатку, обитают в кишечнике лошадей, коров, кроликов. К сбраживающим клетчатку кишечным бактериям относятся также *Butyrivibrio fibrisolvens* и *Eubacterium cellulosolvens*. Роды *Bacteroides* и *Eubacterium* представлены в кишечнике млекопитающих рядом видов, причем представители некоторых разрушают также белковые субстраты.

Рубец жвачных обильно заселен большим числом видов бактерий и простейших. Анатомическое строение и условия в рубце почти идеальны для жизнедеятельности микроорганизмов. В среднем, по данным различных авторов, число бактерий составляет $10^9 \dots 10^{10}$ клеток в 1 г рубцового содержимого.

Помимо бактерий расщепление питательных веществ кормов и синтез важных для организма животного органических соединений в рубце осуществляют также различные виды дрожжей, актиномицетов и простейших. Количество инфузорий в 1 мл содержимого может достигать 3...4 млн.

Со временем видовой состав рубцовых микроорганизмов претерпевает изменения.

В молочный период в рубце у телят преобладают лактобактерии и определенные виды протеолитических бактерий. Полное становление рубцовой микрофлоры завершается при переходе животных на кормление грубыми кормами. По мнению некоторых авторов, у взрослых жвачных видовой состав рубцовой микрофлоры постоянен и существенным образом не изменяется в зависимости от кормления, времени года и ряда других факторов. В функциональном отношении наиболее важное значение представляют следующие виды бактерий: *Bacteroides succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavofaciens*, *Ruminococcus album*, *Eubacterium cellulosolvens*, *Clostridium cellobioperum*, *Clostridium locheadi* и др.

Основными продуктами сбраживания клетчатки и других углеводов являются масляная кислота, диоксид углерода и водород. В превращении крахмала принимают участие рубцовые бактерии многих видов (*Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola* и др.), в том числе и целлюлозолитические, а также определенные виды инфузорий.

Основными продуктами брожения являются уксусная, янтарная, муравьиная кислоты, диоксид углерода и в некоторых случаях сероводород.

В содержимом рубца широко представлены виды бактерий, утилизирующих различные моносахара (глюкоза, фруктоза, ксилоза и др.), поступающие с кормом, а главным образом образующиеся при гидролизе полисахаридов. Кроме описанных выше, обладающих ферментами, разрушающими полисахариды и дисахариды, в рубце жвачных находится немало видов бактерий, предпочтительно использующих моносахара, главным образом глюкозу. К ним относятся: *Lachnospira multiparus*, *Selenomonas ruminantium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides coagulans*, *Lactobacillus fermentum* и др.

В настоящее время известно, что белок в рубце расщепляется под действием протеолитических ферментов микроорганизмов с образованием пептидов и аминокислот, которые, в свою очередь, подвергаются воздействию дезаминаз, в результате чего образуется аммиак. Дезаминирующими свойствами обладают культуры, относящиеся к видам: *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii*, *Bacteroides ruminicola* и др.

Большая часть потребляемого с кормом растительного белка превращается в рубце в белок микробный. Как правило, процессы расщепления и синтеза белка идут одновременно. Значительная часть рубцовых бактерий, являясь гетеротрофами, для синтеза белка использует неорганические соединения азота. Наиболее важные в функциональном отношении рубцовые микроорганизмы (*Bacteroides ruminicola*, *Bacteroides succinogenes*, *Bacteroides amylophilus* и др.) для синтеза азотистых веществ своих клеток используют аммиак.

Ряд видов рубцовых микроорганизмов (*Streptococcus bovis*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavofaciens* и др.) для построения серосодержащих аминокислот используют сульфиды при наличии в среде цистина, метионина или гомоцистеина.

В тонком отделе кишечника содержится сравнительно небольшое количество микроорганизмов. Чаще всего там обитают устойчивые к действию желчи энтерококки, кишечная палочка, ацидофильные и споровые бактерии, актиномицеты, дрожжи и др.

Наиболее богат микроорганизмами толстый отдел кишечника. Основные обитатели его — энтеробактерии, энтерококки, термофилы, ацидофилы, споровые бактерии, актиномицеты, дрожжи, плесени, большое количество гнилостных и некоторых патогенных анаэробов (*Clostridium sporogenes*, *C. putrificus*, *C. perfringens*, *C. tetani*, *Fusobacterium necrophorum*). В 1 г экскрементов травоядных может содержаться до 3,5 млрд различных микроорганизмов. Микробная масса составляет около 40 % сухого вещества фекалий.

В толстом отделе кишечника протекают сложные микробиологические процессы, связанные с расщеплением клетчатки, пектиновых веществ, крахмала. Микрофлору желудочно-кишечного тракта принято делить на облигатную (молочнокислые бактерии,

E. coli, энтерококки, *S. perfringens*, *S. sporogenes* и др.), которая адаптировалась к условиям этой среды и стала постоянным ее обитателем, и факультативную, изменяющуюся в зависимости от вида корма и воды.

Микрофлора органов дыхания. Верхние отделы дыхательных путей несут высокую микробную нагрузку — они анатомически приспособлены для осаждения бактерий из вдыхаемого воздуха. Помимо обычных негемолитических и зеленеющих стрептококков, непатогенных нейссерий, стафилококков и энтеробактерий, в носоглотке можно обнаружить менингококки, пиогенные стрептококки и пневмококки. Верхние отделы дыхательных путей у новорожденных обычно стерильны и колонизируются в течение 2...3 сут.

Исследования последних лет показали, что наиболее часто из дыхательных путей клинически здоровых животных выделяется сапрофитная микрофлора: *S. saprophiticus*, бактерии родов *Micrococcus*, *Bacillus*, коринеформные бактерии, негемолитические стрептококки, грамотрицательные кокки.

Кроме того, выделены патогенные и условно-патогенные микроорганизмы: α - и β -гемолитические стрептококки, стафилококки (*S. aureus*, *S. hycus*), энтеробактерии (эшерихии, сальмонеллы, протей и др.), пастереллы, *P. aeruginosa* и в единичных случаях грибы рода *Candida*.

Сапрофитные микроорганизмы чаще обнаруживались в дыхательных путях нормально развитых животных, чем слабо развитых.

В носовой полости обнаруживается наибольшее число сапрофитов и условно-патогенных микроорганизмов. Они представлены стрептококками, стафилококками, сарцинами, пастереллами, энтеробактериями, коринеформными бактериями, грибами рода *Candida*, *Pseudomonas aeruginosa* и бациллами. Трахея и бронхи заселены микроорганизмами аналогичных групп. В легких обнаружены отдельные группы кокков (β -гемолитические, *S. aureus*), микрококки, пастереллы, *E. coli*.

При снижении иммунитета у животных (особенно молодняка) микрофлора органов дыхания может вызвать заболевание.

Микрофлора мочеполовых путей. Микробный биоценоз органов мочеполовой системы более скудный. Верхние отделы мочевыводящих путей обычно стерильны; в нижних отделах доминируют *Staphylococcus epidermidis*, негемолитические стрептококки, дифтероида; часто выделяют грибы родов *Candida*, *Toluroopsis* и *Geotrichum*. В наружных отделах доминирует *Mycobacterium smegmatis*.

Основной обитатель влагалища — *Bacterium vaginale vulgare*, обладающая выраженным антагонизмом к другим микробам. В норме в мочеполовых путях микрофлора обнаруживается только в наружных отделах (стрептококки, молочнокислые бактерии).

Матка, яичники, семенники, мочевого пузыря в норме стерильны. У здоровой самки плод в матке стерильно до момента начала родов.

При гинекологических заболеваниях характер микрофлоры меняется.

Роль нормальной микрофлоры. Нормальная микрофлора играет важную роль в защите организма от патогенных микробов, например стимулируя иммунную систему, принимая участие в реакциях метаболизма. В то же время эта флора способна привести к развитию инфекционных заболеваний.

Нормальная микрофлора составляет конкуренцию патогенной; механизмы подавления роста последней достаточно разнообразны. Основным механизмом — избирательное связывание нормальной микрофлорой поверхностных рецепторов клеток, особенно эпителиальных. Большинство представителей резидентной микрофлоры проявляет выраженный антагонизм в отношении патогенных видов. Эти свойства особенно ярко выражены у бифидобактерий и лактобактерий; антибактериальный потенциал формируется секретацией кислот, спиртов, лизоцима, бактериоцинов и других веществ. Кроме того, при высокой концентрации указанных продуктов ингибируется метаболизм и выделение токсинов патогенными видами (например, термолабильного токсина энтеропатогенными эшерихиями).

Нормальная микрофлора — неспецифический стимулятор («раздражитель») иммунной системы; отсутствие нормального микробного биоценоза вызывает многочисленные нарушения в иммунной системе. Другая роль микрофлоры была установлена после того, как были получены гнотобиоты (*безмикробные животные*). Антигены представителей нормальной микрофлоры вызывают образование антител в низких титрах. Они преимущественно представлены иммуноглобулинами класса А (IgA), секретируемыми на поверхность слизистых оболочек. IgA обеспечивает местную невосприимчивость к проникающим возбудителям и не дают возможности комменсалам проникать в глубокие ткани.

Нормальная кишечная микрофлора играет огромную роль в метаболических процессах организма и поддержании их баланса.

Обеспечение всасывания. Метаболизм некоторых веществ включает печеночную экскрецию (в составе желчи) в просвет кишечника с последующим возвратом в печень; подобный кишечно-печеночный круговорот характерен для некоторых половых гормонов и солей желчных кислот. Эти продукты экскретируются, как правило, в форме глюкуроноидов и сульфатов, не доступных в этом виде к обратному всасыванию. Всасывание обеспечивают кишечные бактерии, вырабатывающие глюкуронидазы и сульфатазы.

Обмен витаминов и минеральных веществ. Общеизвестна ведущая роль нормальной микрофлоры в обеспечении организма

ионами Fe^{2+} , Ca^{2+} , витаминами К, D, группы В (особенно В₁, рибофлавин), никотиновой, фолиевой и пантотеновой кислотами. Кишечные бактерии принимают участие в инактивации токсичных продуктов эндо- и экзогенного происхождения. Кислоты и газы, выделяющиеся в ходе жизнедеятельности кишечных микробов, оказывают благоприятное действие на перистальтику кишечника и своевременное его опорожнение.

Таким образом, действие микрофлоры тела на организм складывается из следующих факторов.

Во-первых, нормальной микрофлоре принадлежит важнейшая роль в формировании иммунологической реактивности организма. Во-вторых, представители нормальной микрофлоры благодаря продуцированию разнообразных антибиотических соединений и выраженной антагонистической активности предохраняют органы, сообщающиеся с внешней средой, от внедрения и безграничного размножения в них патогенных микроорганизмов. В-третьих, микрофлора обладает выраженным морфокинетическим действием, особенно по отношению к слизистой оболочке тонкой кишки, что существенно отражается на физиологических функциях пищеварительного канала. В-четвертых, микробные ассоциации являются существенным звеном в печеночно-кишечной циркуляции таких важнейших компонентов желчи, как соли желчных кислот, холестерин и желчные пигменты. В-пятых, микрофлора в процессе жизнедеятельности синтезирует витамин К и ряд витаминов группы В, некоторые ферменты и, возможно, другие, пока не известные, биологически активные соединения. В-шестых, микрофлора исполняет роль дополнительного ферментного аппарата, расщепляя клетчатку и другие трудно перевариваемые составные части корма.

Нарушение видового состава нормальной микрофлоры под влиянием инфекционных и соматических заболеваний, а также в результате длительного и нерационального использования антибиотиков приводит к состоянию дисбактериоза, который характеризуется изменением соотношения различных видов бактерий, нарушением усвояемости продуктов пищеварения, изменением ферментативных процессов, расщеплением физиологических секретов. Для коррекции дисбактериоза следует устранить факторы, вызвавшие этот процесс.

Гнотобиоты и СПФ-животные. Роль нормальной микрофлоры в жизни животных, как показано выше, так велика, что возникает вопрос: возможно ли сохранение физиологического состояния животного без микробов. Еще Л. Пастер пытался получить таких животных, но низкое техническое обеспечение подобных экспериментов в то время не позволило решить поставленную задачу.

В настоящее время не только получены безмикробные животные (мыши, крысы, морские свинки, цыплята, поросята и другие

виды), но и успешно развивается новая отрасль биологии — гнотобиология (от греч. *gnotos* — познание, *bios* — жизнь). У гнотобиотов отсутствуют антигенное «раздражение» иммунной системы, что обуславливает недоразвитие иммунокомпетентных органов (тимуса, лимфоидной ткани кишечника), дефицит IgA, ряда витаминов. Как следствие, у гнотобиотов нарушаются физиологические функции: уменьшается масса внутренних органов, объем крови, понижено содержание воды в тканях. Исследования с использованием гнотобиотов позволяют изучать роль нормальной микрофлоры в механизмах инфекционной патологии и иммунитета, в процессе синтеза витаминов, аминокислот. Заселяя организм гнотобиотов теми или иными видами (сообществами) микроорганизмов, удается выявлять физиологические функции этих видов (сообществ).

Большую ценность для развития животноводства представляют СПФ-животные — свободные только от патогенных микроорганизмов и имеющие всю необходимую микрофлору для осуществления физиологических функций. СПФ-животные растут быстрее обычных, реже болеют и могут служить ядром для племенных ферм, свободных от инфекционных заболеваний. Однако для организации такой фермы необходим очень высокий уровень ветеринарно-санитарного состояния.

Дисбактериоз. На состав микробных сообществ полостей организма влияют различные факторы: качество и количество корма, его состав, двигательная активность животного, стрессы и многое другое. Наибольшее воздействие оказывают заболевания, связанные с изменением физико-химических свойств эпителиальных поверхностей, и применение *антимикробных препаратов широкого спектра, действующих на любые, в том числе непатогенные микроорганизмы.* В результате выживают более устойчивые виды — стафилококки, кандиды и грамотрицательные палочки (энтеробактерии, псевдомонады). Следствие этого — качественные и количественные изменения микробиоценоза, выходящие за рамки физиологической нормы, т. е. *дисбактериоз, или дисбиоз.* Наиболее тяжелые формы дисбактериозов — стафилококковый сепсис, системный кандидоз и псевдомембранозный колит; при всех формах доминирует поражение микрофлоры кишечника.

Термин «дисбактериоз» (гнилостная, или бродильная, диспепсия) введен А. Ниссле (A. Nissle) в 1916 г. Это динамическое нарушение микроэкологии кишечника в результате срыва адаптации, изменения защитных и компенсаторных механизмов, обеспечивающих барьерную функцию кишечника. В поддержании экологического гомеостаза участвуют четыре основные группы факторов:

1) иммунологические специфические (иммуноглобулины, прежде всего класса IgA, предохраняющие слизистую оболочку кишечника от проникновения аллергенов различной природы) и неспе-

цифические (комплемента, интерферон, лизоцим, трансферрин, лактоферрин) гуморальные факторы защиты;

2) механические факторы защиты (перистальтические движения, эпителий, обновляющийся каждые 6...8 дней, макро- и микроворсинки с покрывающей их густой сетью гликокаликса, илеоцекальный клапан);

3) химические факторы защиты (слюна, желудочный, панкреатический и кишечный соки, желчь, жирные кислоты);

4) биологические факторы защиты (нормальная кишечная микрофлора).

Проблема дисбактериоза актуальна и выступает на первый план при патологии желудочно-кишечного тракта, аллергических заболеваниях, длительной антибактериальной терапии.

Но *дисбактериоз — это не нозологическая единица, не самостоятельное заболевание*, а изменение биоценоза кишечника, приводящее к нарушению основных функций микрофлоры и возникновению клинической симптоматики дисбактериоза, не отличающейся специфичностью. Истоки этого патологического состояния подчас следует искать в раннем возрасте, а приобретенная аутофлора так существенно влияет на морфологический и физиологический статус, что многие характеристики взрослого организма в действительности определяются состоянием микрофлоры.

В настоящее время дисбактериоз является управляемой патологией не только в плане лечения, но и с точки зрения проведения первичной профилактики.

Коррекция дисбактериозов. Для коррекции дисбактериозов следует применять *зубиотики* — взвеси бактерий, способных восполнить численность недостающих или дефицитных видов. В отечественной практике широко применяют бактериальные препараты в виде высушенных живых культур различных бактерий, например коли-, лакто- и бифидобактерины (содержащие соответственно *E. coli*, виды *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*), бификол (содержащий виды *Bifidobacterium* и *E. coli*), бактисубтил (культура *Bacillus subtilis*) и др.

7.4. РОЛЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРЕВРАЩЕНИИ ВЕЩЕСТВ В ПРИРОДЕ

При самом активном, широком участии микроорганизмов в природе, главным образом в почве и гидросфере, постоянно осуществляются два противоположных процесса: синтез из минеральных веществ сложных органических соединений и, наоборот, разложение органических веществ до минеральных. Единство этих диалектически противоположных процессов лежит в основе биологической роли микроорганизмов в круговороте веществ в природе. Среди различных процессов превращения веществ в

природе, в которых микроорганизмы принимают активное участие, важнейшее значение для осуществления жизни растений, животных и человека на Земле имеет круговорот азота, углерода, фосфора, серы, железа.

7.4.1. КРУГОВОРОТ АЗОТА

В цикл превращения азота входят реакции синтеза сложных азотистых соединений и реакции минерализации органических азотсодержащих веществ до различных минеральных форм азота.

Цикл азота состоит из четырех этапов. Первый этап — это фиксация молекулярного азота, т. е. связывание свободного газообразного азота с другими элементами. Этот процесс осуществляется в основном живыми организмами и носит название *биологической азотфиксации*. К какой бы группе не относился азотфиксатор, конечными продуктами являются вещества белковой природы, аминокислоты и аммиак. Таким образом, в процессе фиксации молекулярный азот поступает в почву в виде органических и минеральных соединений. Затем органические вещества подвергаются минерализации с освобождением азота в виде аммиака. Поэтому второй этап цикла азота называют *аммонификацией*. На третьем этапе образовавшийся в процессе аммонификации аммонийный азот окисляется в нитриты и нитраты — происходит процесс *нитрификации*. Нитраты частично усваиваются корневой системой растений, а частично восстанавливаются в аммиак и молекулярный азот. Последнее составляет сущность четвертого этапа и носит название *денитрификации*. На этом цикл превращений азота завершается.

Роль микробов в круговороте азота в природе. Важнейший элемент, входящий в состав белков, а следовательно, имеющий исключительное значение для жизни — это азот. В природе содержится около 80 тыс. т молекулярного азота. Его огромные запасы позволяют получать высокие урожаи. В воздухе тоже содержится достаточно азота, т. е. его запасов хватит на миллион лет. Однако причина низких урожаев кроется в том, что растения испытывают азотистое голодание, так как они не могут усваивать молекулярный азот воздуха без помощи микроорганизмов. В живых существах, населяющих планету, содержится примерно 15...20 млрд т азота, в почвах (в 30-сантиметровом слое) на каждом гектаре накапливается в среднем 5...15 т азота. Азот, входящий в состав органических соединений почвы, не может быть использован растениями, пока его не минерализуют микроорганизмы.

Таким образом, азотистое питание растений зависит от деятельности микроорганизмов. Как уже отмечалось выше, в круговороте азота в природе с участием микроорганизмов различают

следующие этапы: фиксацию атмосферного азота, аммонификацию, нитрификацию, денитрификацию.

Фиксация азота из атмосферного воздуха осуществляется азотфиксирующими бактериями. Среди микробов, усваивающих атмосферный азот, различают две группы — свободноживущие и клубеньковые. *Свободноживущие азотфиксаторы* обитают в почве и фиксируют содержащийся в ней азот независимо от растений. Основные виды этих микробов: *Azotobacter chroococcum*, *Clostridium pasteurianum*. Азотобактер на площади в 1 га в течение года фиксирует от 20 до 50 кг газообразного азота, повышая плодородие почвы. Наиболее интенсивно этот процесс идет при хорошей аэрации почвы. *Клубеньковые бактерии* — активные фиксаторы атмосферного азота в симбиозе с бобовыми растениями.

Конечные продукты *аммонификации* — аммиак, сероводород, сероуглерод, водород, диоксид углерода, метан. Таким образом, аммонификация — это минерализация азотсодержащих органических веществ, протекающая под воздействием аммонифицирующих микробов, выделяющих протеолитические ферменты. Благодаря аммонификации представителей растительного и животного мира и продуктов их жизнедеятельности (моча, фекалии) почва обогащается азотом и другими соединениями. Одновременно с этим аммонифицирующие микробы выполняют огромную санитарную роль, очищая почву и гидросферу от разлагающегося органического субстрата.

7.4.2. КРУГОВОРОТ УГЛЕРОДА

Углерод, так же как и азот, — важнейший элемент органической жизни. Первоисточником углерода любого органического вещества служит диоксид углерода воздуха, где его содержание составляет 0,03 % от общего объема газов и является постоянной величиной. Это постоянство поддерживается как физико-химическими, так и биологическими процессами.

Роль микробов в круговороте углерода. Автотрофные микробы, используя солнечную или химическую энергию, превращают диоксид углерода в органическое вещество. Основной процесс, возвращающий диоксид углерода в атмосферу, — разложение органических соединений под влиянием микроорганизмов. Этот процесс разложения органических безазотистых соединений называется *брожением*. В природе существует много типов брожений, вызываемых определенными видами микробов. Рассмотрим только имеющие наибольшее значение для круговорота углерода типы брожения.

Брожение клетчатки. В природе огромные запасы углерода сосредоточены в клетчатке (целлюлозе) растений. После их гибели идет разложение клетчатки с высвобождением углерода в виде диоксида углерода, возвращающегося в атмосферу. Наиболее интен-

сивно клетчатка разлагается целлюлозными микробами в пищеварительном тракте травоядных животных. Различают анаэробное и аэробное брожение клетчатки.

Анаэробное брожение клетчатки осуществляется в два этапа. На первом этапе происходит ее осахаривание. На втором — сахар разлагается в зависимости от типа брожения на спирты, молочную, масляную кислоты, диоксид углерода, водород, метан и др.

В ветеринарии водородное и метановое брожение клетчатки в преджелудках крупного рогатого скота имеет особое значение. При поедании этими животными большого количества зеленой массы бобовых растений (люцерны, клевера), особенно влажной от росы или после дождя, в их преджелудках происходит весьма интенсивное брожение с образованием большого количества водорода, метана, диоксида углерода. Эти газы вызывают острое вздутие рубца — тимпанию.

Интенсивно разлагают клетчатку в навозе в анаэробных условиях термофильный микроб *C. thermocellum*, согревая его до 60...65 °С.

Аэробное брожение клетчатки наиболее интенсивно происходит под воздействием следующих трех родов микроорганизмов, широко распространенных в природе: *Cytophaga* — подвижных длинных палочек с заостренными концами, *Celvibrio* — изогнутых палочек, *Celfacilla* — коротких палочек. В аэробных условиях клетчатку разлагают также актиномицеты и плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium* и др.

Микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, выполняют огромную санитарную роль, разрушая клетчатку отмерших растений, благодаря чему в почве накапливается гумус, повышающий ее плодородие.

Спиртовое брожение вызывают дрожжевые грибы, разлагающие сахара ферментом зимазой с образованием этилового спирта и диоксида углерода по следующему пути: $C_6H_{12}O_6 = 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$.

Дрожжи широко распространены в природе, их можно обнаружить на цветах, листьях и стеблях растений, но в особенно большом количестве на плодах. Дрожжи используются в хлебопечении, изготовлении некоторых кисломолочных продуктов, например кефира. Все производство этилового спирта, различных вин, пива основано на деятельности дрожжей. В животноводстве применяют жидкие и сухие кормовые дрожжи, богатые белками, жиром и витаминами.

Saccharomyces cerevisiae — пекарские дрожжи — представляют собой овальные клетки величиной 8...10 мкм. *Torula utilis* — кормовые дрожжи — крупные округлые клетки, отличающиеся энергичным ростом, цитоплазма их богата жиром. *Torula kephir* — кефирные дрожжи — овальные и округлые клетки, образующие колонии.

Молочнокислое брожение. В результате молочнокислого брожения главным образом сахара, а также многоатомные спирты расщепляются до молочной кислоты. Схематически этот процесс можно представить так: $C_6H_{12}O_6 = 2C_3H_6O_3$.

Молочнокислое брожение — анаэробный процесс, протекающий без доступа кислорода. Оно давно и широко используется человеком для изготовления различных молочных продуктов — масла, сыра, кефира, кумыса, простокваши. Приготовление силоса, квашение и соление овощей также основано на молочнокислом брожении. Микроорганизмы, вызывающие это брожение, весьма широко распространены в природе, их обнаруживают в почве, воде, воздухе, на растениях, в животноводческих помещениях, на коже животных, в жилых помещениях.

Все молочнокислые бактерии являются антагонистами гнилостных микробов. На этом основано применение диетических кисло-молочных продуктов для профилактики желудочно-кишечных заболеваний, вызванных гнилостными микробами, у человека и новорожденных животных и лечения больных.

7.4.3. ПРЕВРАЩЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ ФОСФОРА, ЖЕЛЕЗА И СЕРЫ

Фосфор входит в состав белков и липидов. Особенно много его в ядрах клеток, головном мозге человека и животных. Микроорганизмы, участвующие в превращении фосфора, живут в почве, воде. Их роль сводится к двум процессам: минерализации фосфора, входящего в состав органических веществ, и превращению фосфорнокислых солей из слабо-растворимых в хорошо растворимые. Минерализацию фосфора вызывают гнилостные бактерии, в частности *Bacillus megatherium*. Образующаяся при этом фосфорная кислота в почве связывается с различными щелочами и превращается в слабо-растворимые и, следовательно, малодоступные для растений соли кальция, железа, магния. В дальнейшем под действием почвенных кислотообразующих бактерий, особенно нитрифицирующих, эти соли превращаются в растворимые соединения фосфорной кислоты, которые могут быть усвоены растениями.

Железо входит в состав белка гемоглобина, содержащегося в эритроцитах. Этим объясняется его важная роль в процессе дыхания человека и животных.

Основные представители железобактерий — нитчатые бактерии родов *Srenothrix*, *Chlamydothrix*, *Cladothrix*. Эти бактерии представляют собой длинные нити, покрытые общим слизистым влагалищем, в котором отлагается гидроксид железа. После отмирания бактерий образуется болотная и озерная железная руда, залегающая островами в десятки и сотни квадратных метров. Желе-

зобактериям принадлежит важная роль в образовании железомарганцевых отложений в природе.

В состав белка растительного и животного происхождения входит также сера, чем и объясняется важность этого элемента в круговороте веществ.

Бактерии, усваивающие соединения серы, называют серобактериями. Обитают они в почве, воде, навозе. При разложении в почве органических серосодержащих веществ, а также при восстановлении солей серной, сернистой и серноватистой кислот образуется сероводород, ядовитый для растений и животных. Именно серобактерии превращают этот газ в безвредные, доступные для растений соединения.

Контрольные вопросы и задания. 1. На какие группы делят микроорганизмы по их отношению к кислороду воздуха? 2. На какие группы делят микроорганизмы по их отношению к pH среды? 3. На какие группы делят микроорганизмы по их отношению к окружающей температуре? 4. В чем сущность действия УФ-излучения на микроорганизмы? 5. Как действуют на бактерии ультразвук и магнитное поле? 6. Охарактеризуйте действие различных антисептических веществ на микроорганизмы. 7. Что представляют собой бактериофаги и для чего их используют? 8. Опишите особенности микрофлоры различных природных объектов: почвы, воды, растений, воздуха, молока, тела животных. 9. Как называются этапы круговорота азота в природе? 10. В чем сущность брожения и какие соединения подвергают брожению микроорганизмы? 11. Какие соединения фосфора, железа и серы подвержены действию микроорганизмов?

Глава 8

СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТ. ГРУППЫ ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Систематика (таксономия) — наука о многообразии и взаимосвязях между организмами. Одна из задач систематики — распределение (классификация) множества организмов по группам (таксонам)¹. Но прежде чем осуществлять такое распределение, необходимо достаточно полно охарактеризовать объекты и на основании отобранной информации идентифицировать их. Последнее может привести к тому, что будут выявлены организмы с неизвестными или известными признаками и соответственно помещены в новый таксон на определенном уровне или же отнесены к известным таксонам.

Для характеристики организмов используют разнообразные признаки: морфологические, цитологические, культуральные, физиологические, биохимические, иммунологические и др. Если объем информации для характеристики объектов по существу беспределен, как бесконечен сам процесс познания природы, то для целей идентификации может быть использован ограниченный объем информации, достаточный для распределения организмов по таксономическим группам.

Специальный раздел таксономии — *номенклатура* — имеет дело с правилами присвоения наименований описанным объектам. В систематике бактерий для наименования объекта используют бинамиальную номенклатуру К. Линнея (К. Linné, 1707—1778), согласно которой биологическому виду присваивают название, состоящее из двух слов: первое определяет принадлежность организма к определенному роду, второе — виду. Бактериям названия присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

Основной таксономической категорией является *вид*. По современным представлениям, вид — это группа близких между собой организмов, имеющих общий корень происхождения и на данном этапе эволюции характеризующихся определенными морфологическими, биохимическими и физиологическими признаками,

¹ Таксон — группа организмов, обладающих заданной степенью однородности.

обособленных отбором от других видов и приспособленных к определенной среде обитания.

Важным признаком, определяющим принадлежность организмов к одному виду, является их способность скрещиваться и давать жизнеспособное потомство. Однако у прокариот размножение половым путем отсутствует, поэтому данный признак для определения видовой принадлежности к ним неприменим. Отнесение прокариотических организмов к одному или разным видам осуществляется в большей степени эмпирическим путем на основе анализа многих признаков, при этом генетическая информация, содержащаяся в нехромосомных генетических элементах, для определения видовой принадлежности не используется.

Виды объединяют в таксоны более высокого порядка — *роды*, *роды* — в *семейства*, далее следуют *порядки*, *классы*, *отделы*, *царства*. Для высших таксономических категорий удовлетворительного определения пока нет.

В микробиологии употребляются такие термины, как «штамм» и «клон». Под штаммом понимают бактериальные культуры одного вида, выделенные, например, из разных мест обитания. Различия между штаммами не выходят за пределы вида. Клон — еще более узкое понятие, это культура, выделенная из одной клетки.

Существует два типа систематики биологических объектов: *филогенетическая*, или *естественная*, в основе которой лежит установление родственных (генетических, эволюционных) связей между организмами, и *практическая*, или *искусственная*, цель которой — выявление степени сходства между организмами для быстрой их идентификации и установления принадлежности к определенным таксонам. Если существующая систематика высших организмов отражает в определенной мере эволюционные связи между ними, т. е. признаки, используемые для выявления степени сходства, отражают и степень родства между этими организмами, то попытка создания на этой же основе систематики прокариот не была успешной.

Важным шагом в развитии систематики прокариот явилось использование признаков, дающих информацию о химическом строении клетки: состав оснований ДНК, ДНК—ДНК- и ДНК—РНК-гомологии, аминокислотная последовательность белков, строение рибосом, компонентов клеточной стенки и т. д.

Наиболее полно задача быстрой идентификации прокариотических организмов решается при помощи «Определителя бактерий Берги», выпускаемого периодически Обществом американских бактериологов с привлечением крупных специалистов в области изучения тех или иных групп бактерий. Первое издание определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д. Х. Берги (D. H. Bergey, 1860—1937); девятое издание в четырех томах вышло в 1984—1989 гг.

В девятом издании «Определителя бактерий Берги» все обнаруженные организмы, отнесенные в царство Prokarya, разделены на 33 группы. Признаки, по которым осуществляется разделение на группы, как правило, относятся к категории легко определяемых и вынесены в названия групп, например: грамотрицательные аэробные палочки и кокки (группа 4), анаэробные грамотрицательные кокки (группа 8), грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры (группа 13), скользящие бактерии, образующие плодовые тела (группа 24). Основная идея классификации по Берги — легкость идентификации бактерий. Для осуществления этого используют совокупность признаков: морфологических (форма клетки; наличие или отсутствие жгутиков, капсулы; способность к спорообразованию; особенности внутриклеточного строения; окрашивание по Граму), культуральных (признаки, выявляемые при культивировании в лаборатории чистой культуры); физиолого-биохимических (способы получения энергии; потребности в питательных веществах; отношение к факторам внешней среды; нуклеотидный состав и последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК; наличие и характер минорных оснований в ДНК; нуклеотидный состав рибосомальной РНК; последовательность аминокислот в ферментных белках с аналогичными функциями).

Ценность Определителя в том, что он представляет собой наиболее полную сводку известных бактериальных форм и самое современное пособие для идентификации бактерий.

Представленная в «Определителе бактерий Берги» система классификации является строго идентификационной и не решает задачи выявления эволюционных связей между прокариотами. В то же время конечной целью является построение такой системы, в основе которой лежали бы родственные связи между прокариотическими организмами.

Важный шаг на пути создания естественной систематики прокариот связан с успехами молекулярной биологии. В 60-х гг. XX в. было установлено, что все свойства организма определяются уникальными молекулами — ДНК, поэтому бактерии могут быть классифицированы путем сравнения их геномов. По такому признаку, как генетический материал, оказалось возможным на основании выявления степени сходства делать вывод о степени родства между организмами. Первоначально для таксономических целей сравнивали молярное содержание суммы гуанина и цитозина (ГЦ) в процентах от общего количества оснований ДНК у разных объектов. Этот показатель у прокариот колеблется от 25 до 75%. Однако ГЦ-показатель дает возможность только для грубого сравнения геномов. Если организмы имеют одинаковый нуклеотидный состав ДНК, возможно и сходство и различие между ними, поскольку генетическое кодирование основано не только на опре-

деленном содержании оснований в единице кодирования (триплете), но и на их взаимном расположении¹.

Более тонкий метод оценки генетического сходства организмов — сравнение нуклеотидных последовательностей ДНК из разных источников методом ДНК—ДНК-гибридизации. Метод наиболее полезен для классификации на уровне вида, т. е. в случае высокой степени гомологии, и мало информативен для классификации объектов на уровне высоких таксонов. В то же время нередко возможно несовпадение выводов, сделанных на основании фенотипических признаков и ДНК-гибридизации. В целом значение данных о строении ДНК для систематики прокариот огромно, так как позволяет перейти от установления степени сходства к выводам о степени родства между организмами.

Все прокариотические микроорганизмы объединены в царство Prokarya, которое подразделяется на четыре отдела. Они, в свою очередь, делятся на секции, классы, порядки, семейства, роды, виды.

Отдел 1. Gracilicutes (от лат. gracilus — тонкий, стройный, cutes — кожа). Включает в себя грамотрицательные микроорганизмы. В отделе девять секций.

Секция 1. Спирохеты. Порядок Spirochaetales. Включает в себя два семейства: Spirochaetaceae (четыре рода), Leptospiraceae (один род).

Секция 2. Спиралевидные и изогнутые аэробы (микроаэрофилы). Одно семейство — Spirillaceae, в котором шесть родов. Патогенны для человека и животных микроорганизмы рода Campylobacter.

Секция 3. Грамотрицательные неподвижные изогнутые бактерии. Одно семейство — Spirosomnaceae, в состав которого входят три патогенных рода.

Секция 4. Аэробные грамотрицательные палочки и кокки. Восемь семейств, в два из которых входят патогенные микроорганизмы. Семейство Pseudomonadaceae включает в себя четыре рода, более 25 видов, среди которых имеются патогенные (*P. mallei* и др.). Семейство Neisseriaceae имеет 16 родов. Роды Neisseria и Moraxella содержат патогенные для человека и животных микроорганизмы. Роды Bordetella, Brucella и Francisella не внесены в семейства: в них входят патогенные для человека и животных виды.

Секция 5. Грамотрицательные факультативные анаэробы. Три семейства: Enterobacteriaceae, Vibrionaceae и Pasteurellaceae. Семейство Enterobacteriaceae имеет 14 родов (*Escherichia*, *Salmonella*,

¹ Колебания нуклеотидного состава ДНК у эукариотических микроорганизмов (молярная доля, %): грибы — 26...70, водоросли — 37...68, простейшие — 22...68; у высших растений и животных — 35...45. Колебания в составе оснований ДНК вирусов приблизительно такие же, как у прокариот.

Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Erwinia, Shigella, Proteus, Yersinia и др.). Семейство Vibrionaceae имеет два рода. В род Vibrio включены патогенные микроорганизмы. Семейство Pasteurellaceae имеет три основных рода: Pasteurella, Haemophilus и Actinobacillus. Содержат патогенные виды микроорганизмов.

Секция 6. Строгие анаэробы. Изогнутые грамтрицательные палочки. Одно семейство — Bacteroidaceae, в котором 13 родов, среди которых имеются патогенные.

Секция 7. Диссимилирующие и разлагающие сульфат бактерии. Семь непатогенных родов.

Секция 8. Анаэробные грамтрицательные кокки. Одно семейство — Veillonellaceae, в котором три рода.

Секция 9. Риккетсии и хламидии. Два порядка: Rickettsiales и Chlamydiales. Порядок Rickettsiales имеет три семейства: Rickettsiaceae, Bartonellaceae и Anaplasmataceae. Семейство Rickettsiaceae имеет три трибы, в которые внесено восемь родов. Семейство Bartonellaceae содержит два рода, а Anaplasmataceae — четыре. Порядок Chlamydiales имеет одно семейство Chlamydiaceae и один род — Chlamydia. Все семейства содержат патогенные микроорганизмы.

Отдел II. Firmicutes (от лат. firmis — крепкий, cutes — кожа). В отдел включены главным образом грамположительные бактерии.

Секция 12. Грамположительные кокки. Два семейства: Micrococcaceae и Deinococcaceae. Семейство Micrococcaceae имеет четыре рода: Micrococcus, Stomatococcus, Planococcus, Staphylococcus.

В секцию кроме указанных двух семейств внесены десять самостоятельных родов: Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Sarcina и др.

Секция 13. Спорообразующие грамположительные палочки и кокки. Шесть родов: Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus, Sporogarcia и др. Первые два рода имеют патогенные виды.

Секция 14. Неспорообразующие грамположительные палочки. Семь родов: Lactobacillus, Listeria, Erysipelotrix и др. Имеются патогенные.

Секция 15. Неспорообразующие внутриклеточные грамположительные палочки. 21 род: Corynebacterium, Microbacterium, Propionibacterium, Eubacterium, Azotobacterium, Bifidobacterium, Actinomyces и др.

Секция 16. Микобактерии. Одно семейство Mycobacteriaceae. Семейство имеет один род Mycobacterium, в котором 49 видов: M. tuberculosis, M. bovis, M. avium, M. paratuberculosis, M. leprae и др.

Секция 17. Nocardioforms. Девять родов: Nocardia, Pseudococcus, Pseudonocardia и др.

Отдел III. Tenericutes. Объединены грамтрицательные прокариоты без клеточной стенки, но имеющие цитоплазматическую мембрану. В отделе десятая секция — микоплазмы класса

Mollicutes (от лат. molli — мягкий, cutes — покров, кожа). В классе один порядок — Mycoplasmatales и три семейства: Mycoplasmataceae, Acholeplasmataceae, Spiroplasmataceae. В основном патогенные микоплазмы включены в семейство Mycoplasmataceae.

Секция 11. Эндосимбионты.

Отдел IV. Mendosicutes. Прокариоты, среди которых нет патогенных бактерий; метанобразующие, сероокисляющие, галофилы, микоплазмоподобные, термоацидофильные и другие наиболее древние по происхождению бактерии (архебактерии).

Контрольные вопросы и задания. 1. На какие отделы подразделяется царство прокариот? 2. Что называется таксономией? 3. По каким признакам характеризуют микроорганизмы? 4. Что является основной таксономической категорией? 5. Что называют штаммом и клоном? 6. Назовите два типа систематики биологических объектов.

9.1. РАЗВИТИЕ УЧЕНИЯ ОБ ИНФЕКЦИИ

В глубокой древности люди замечали контагиозность таких болезней, как оспа, холера, чума, и даже использовали искусственное заражение, чтобы обеспечить легкое переболевание и формирование невосприимчивости в дальнейшем. В Африке с доисторических времен некоторые племена применяли «штрихование» по сагиттальной линии лба крупного рогатого скота кинжалом, смоченным плевральной жидкостью павшего от перипневмонии животного.

Гиппократ (ок. 460—377 гг. до н. э.) важную роль в возникновении заразных болезней отводил особым испарениям — «миазмам». Его теория заражения загнившей дождевой водой господствовала около полутора тысячелетий. В 1546 г. Фракасторо выдвинул учение о контагии (заразе). Это учение гласило, что заразные болезни распространяются путем передачи «контагии» от больного организма здоровому при соприкосновении или через воду, корм, воздух. Гипотеза Фракасторо подтверждена после создания микроскопа, обнаружения микроорганизмов и наконец после выделения Л. Пастером, Р. Кохом болезнетворных микроорганизмов.

Всем ученым казалось, что вопрос о причине возникновения и распространения инфекционных болезней был решен, поэтому большинство практиков на заре выявления основных возбудителей были склонны видеть причиной инфекционных болезней лишь микробы.

Методически важным моментом в понимании этиологии инфекций является полное представление о роли возбудителя в возникновении болезней. В наиболее упрощенной схеме возбудитель выступает в роли причины инфекций. В конце XIX в. бурное развитие микробиологии и возможность в большинстве случаев выделить живого возбудителя привели к признанию микроба безусловной и единственной причиной инфекции. Возникло научное направление, получившее название «монокаузализм». В дальнейшем новые данные свидетельствовали, что не всякое заражение вызывает заболевание. Зародилось и получило признание новое

учение — «кондиционализм». Подтверждением жизненности этого учения служит факт бессимптомного носительства патогенных микробов при многих инфекциях. Для объективного решения вопроса о причастности того или иного возбудителя к развитию инфекции необходимо глубоко изучить специфический характер его взаимодействия с организмом, находящимся в меняющихся условиях среды.

Обнаруживая несоответствие между признанием патогенного микроба причиной инфекционной болезни и неспособностью этой причины самостоятельно обусловить во всех случаях возникновение заболевания, некоторые исследователи делают вывод о необходимости комплекса условий, совместное действие которых может вызвать соответствующие следствия. В этом комплексе условий выделяется главное, которое и признается причиной. Признать эту гипотезу верной сложно, так как выделение главного осуществляется исследователем и носит субъективный характер. Любое условие само по себе не может быть причиной заболевания. Причина, на наш взгляд, — взаимодействие многих слагаемых, но прежде всего двух: патогенного микроорганизма и реактивной системы макроорганизма. Это взаимодействие протекает в условиях внутренней среды, и крайней степенью его проявления является инфекционное заболевание.

Рассмотрим три примера взаимодействия.

1. Нередки случаи, когда выделение патогенного возбудителя из организма больного животного служит почти безусловным основанием для постановки диагноза в соответствии с видом обнаруженного микроба даже при отсутствии характерных клинических признаков.

2. Есть случаи выделения двух или более возбудителей из одного организма. Данные бактериологического, серологического, вирусологического исследований отражают широту распространения возбудителей.

3. Аллергическая и серологическая диагностика также не отражает причинно-следственной взаимосвязи, и при ряде инфекций следует устанавливать диагноз не по наличию антител, а по степени возрастания титра антител при выявлении характерных клинических признаков.

Напрашивается вывод: для объективного решения вопроса о причастности того или иного возбудителя к развитию патологического процесса необходимо более глубоко изучить специфический характер его взаимодействия с организмом, пользуясь по возможности большим числом объективных показателей (клинических, гематологических, иммунологических, биохимических и др.).

Преувеличение этиологической роли возбудителя, отождествление его с причиной инфекции привело к переоценке значения

ряда лечебных средств и противозпизоотических мер (дезинфекция), направленных главным образом на возбудитель. Но эти меры не могут заменить целесообразных воздействий на резистентность организма.

Примеры показывают, что односторонние научные концепции причинности, влияя на мировоззрение ученых и практиков, приводят к абсолютизации отдельных патогенетических факторов в возникновении инфекции и недооценке других.

Для конкретного и объективного понимания сущности возникновения инфекционных болезней необходимо рассмотреть свойства микроба вызывать заболевание и способности макроорганизма противостоять заражению во взаимодействии.

Инфекция (от лат. *infecere*) означает «отравлять, заражать», или *inficio* — вношу что-либо извне, заражаю. Смысл термина «инфекция» различен. Под инфекцией в одном случае понимают заразное начало, т. е. возбудитель, а в другом случае это слово употребляется как синоним понятия «заражение, или заразная болезнь». Чаще всего термин «инфекция» употребляется для обозначения заражения и инфекционной болезни.

Инфекция — эволюционно сложившееся взаимодействие паразита и хозяина, проявляющееся в форме заболевания или заразносительства (персистенции) в конкретных условиях окружающей среды. Инфекция — частный случай паразитизма, широко распространенный в мире растений, животных, микроорганизмов.

Инфекционные болезни имеют следующие отличительные особенности:

- 1) причина — живой возбудитель;
- 2) наличие инкубационного периода, который зависит от вида микроба, вирулентности, дозы, чувствительности макроорганизма. Это период времени от проникновения возбудителя в организм хозяина, его размножения и накопления до предела, обуславливающего болезнетворное действие его на организм (длится от нескольких часов до нескольких месяцев);
- 3) заразительность (контагиозность), т. е. способность возбудителя передаваться от больного животного здоровому (есть и исключения — столбняк, злокачественный отек);
- 4) специфические реакции организма, т. е. образование антител или толерантность (отсутствие иммунного ответа);
- 5) невосприимчивость после переболевания.

Эти особенности наблюдаются при многих болезнях: сибирской язве, эмфизематозном карбункуле, столбняке, туберкулезе и др. Учитывая изложенное, следует заметить, что инфекция — явление сложное не только в частном случае с одним макроорганизмом, но и с точки зрения эволюции.

Проблемы инфекции давно привлекают ученых, большинство которых рассматривают инфекцию как биологическое явление —

взаимодействие паразита и хозяина. Они считают, что каждая инфекционная болезнь эволюционирует от опасной в безвредную за счет взаимного приспособления организмов. Каждая болезнь, по их мнению, в перспективе разрешается симбиозом.

Различают три периода эволюции инфекционных болезней, связанных с эволюцией жизни на Земле:

- 1) приобретение микроорганизмами паразитических свойств в млекопитающем-хозяине;
- 2) возникновение воздушных инфекций при окончании ледникового периода;
- 3) появление трансмиссивных заболеваний, связанное с потеплением климата.

Существенным вкладом в учение о происхождении заразных болезней является теория о природной очаговости трансмиссивных болезней, разработанная советским ученым Е. Н. Павловским. По определению Е. Н. Павловского, «природная очаговость трансмиссивных болезней — это явление, когда возбудитель, специфический его переносчик и животные (резервуар возбудителя) в течение смены своих поколений неограниченно долгое время существуют в природных условиях в составе различных биоценозов, независимо от человека как по ходу своей уже прошедшей эволюции, так и в настоящий ее период». Эта теория позволила решить проблемы эпизоотологии и эпидемиологии ряда болезней: чумы, туляремии, вирусных энцефалитов и др.

Одним из перспективных теоретических подходов к решению проблемы инфекционных заболеваний является экологический подход. Ф. М. Бернет пишет: «Чтобы понять и в конечном счете успешно бороться с инфекционными болезнями, гораздо полезнее изучать, каким образом патогенный вид выживает в природе, чем понимать процесс инфицирования. Можно до бесконечности выявлять, обнаруживать инфицированных и больных животных, оставляя без внимания возбудитель во внешней среде. Однако меры, приводящие к гибели возбудителя во внешней среде, прекращают цепь перезаражений».

Н. Н. Сиротин считает, что эволюция инфекций связана с развитием реактивности организма и шла по линии от простого паразитизма и вульгарного сепсиса к эндотоксическим инфекциям с образованием гранулем, а также к токсическим и аллергическим болезням.

Он постулирует следующие положения:

- 1) филогенетически у низших беспозвоночных животных инфекция протекает в виде простого паразитизма, не оставляя патогистологических следов;
- 2) у высших беспозвоночных инфекция протекает по типу вульгарного сепсиса и инфицированных гранулем;

3) у низших животных (рыбы, рептилии) нет реакции на токсины и нет аллергических заболеваний (есть вульгарный сепсис и гранулема);

4) низшие теплокровные (птицы) уже чувствительны к бактериальным токсинам, и у них выражена аллергическая защита;

5) у млекопитающих хорошо сформирована иммунная система и выражены гуморальные факторы защиты, клеточная реакция организма посредством нервной регуляции.

Таким образом, степень развития инфекции находится в прямой зависимости от уровня эволюционного развития хозяина. В наше время проблемой стали болезни, этиологически обусловленные не патогенной микрофлорой, а сочетанием бактерий, микоплазм и вирусов, многие из которых ранее не считались болезнетворными или вообще не были известны.

Появление новых нозологических форм обусловлено рядом причин: концентрацией животных, снижением общей резистентности организмов, бесконтрольным применением антибиотиков.

Задача ветеринарной науки и практики — изучение особенностей микробиоза и изыскание путей повышения резистентности животных. Огромное количество видов микроорганизмов населяют тело животного. Абсолютное их большинство относится к неболезнетворным (сапрофитам). Нормальная микрофлора играет барьерную, а нередко антагонистическую роль в защите хозяина от болезнетворных микробов. Отсутствие нормальной микрофлоры приводит к свободному их проникновению к чувствительным органам.

Все микробы-паразиты, очевидно, происходят от свободно живущих сапрофитов, которые используют для питания мертвые органические остатки, населяя тело животного. Возникновение паразитических видов относят к пермскому периоду палеозойской эры; их эволюцию представляют следующей схемой: автотрофы → сапрофиты → паразиты.

Однако не всегда можно провести четкую границу между сапрофитами и паразитами (например, возбудители клостридиозов). В мире микробов выделяют группы факультативных, облигатных и случайных паразитов.

Факультативные паразиты живут и размножаются как в организме хозяина, так и во внешней среде. Облигатные паразиты (вирусы, риккетсии, хламидии, некоторые микоплазмы и простейшие) утратили способность к сапрофитическому образу существования из-за отсутствия у них ряда ферментных систем. Случайные паразиты обитают в природе в сапрофитной форме, но проникая в организм хозяина, вызывают инфекционный процесс. Существуют переходные формы микроорганизмов — условно-патогенные виды.

Предполагается, что все известные виды облигатных паразитов прошли эволюционный этап факультативного паразитизма. Взаимоотношения хозяина и паразита, прошедшие длительный путь эволюции, продолжают непрерывно изменяться. Популяции микробов и животных находятся в сложной зависимости.

Животные окружены микроорганизмами, в том числе болезнетворными. Почему болезнетворные микроорганизмы не приводят к гибели животных чувствительных видов? Патогенные микроорганизмы используют особи животных для увеличения численности своего вида. Гибель животного приводит к гибели заселяющей его микропопуляции возбудителя.

Изменчивость микробов позволяет им сохранить свой вид при совершенствовании механизма иммунологической реактивности животных, распространении в их популяции устойчивых и невосприимчивых особей. Такое соотношение называют эволюционной мудростью, что означает сохранение популяции хозяина ради сохранения популяции паразита.

Создание такого равновесия в системе «хозяин — паразит» зависит от давности их совместной эволюции. Паразитирование микробов в организме хозяина становится возможным при соответствии типа обмена веществ хозяина пищевым потребностям паразита (табл. 4).

4. Биохимическое соответствие системы «хозяин — паразит»

Тип обмена веществ хозяина	Тип пищевой потребности паразита			
	д	м	б	а
А	-	-	-	+
Б	-	-	+	-
В	-	-	-	-
Г → Д	+	-	-	-

Примечание: «-» болезнь не возникает; «+» болезнь развивается.

Исход взаимодействия организмов хозяина и паразита может быть различным: инфекционное заболевание, микробоносительство или без специфических изменений со стороны хозяина. Взаимодействие происходит между защитными силами организма и специфическими факторами возбудителя (рис. 37).

Вне всякого сомнения, благоприятный исход взаимодействия для хозяина зависит от высокого уровня защитных сил макроорганизма и недостаточной активности возбудителя. Практическое использование этого фактора включает меры, направленные на повышение иммунологического состояния животного и санитарные мероприятия, приводящие к уменьшению популяции возбудителя, снижению его патогенности.

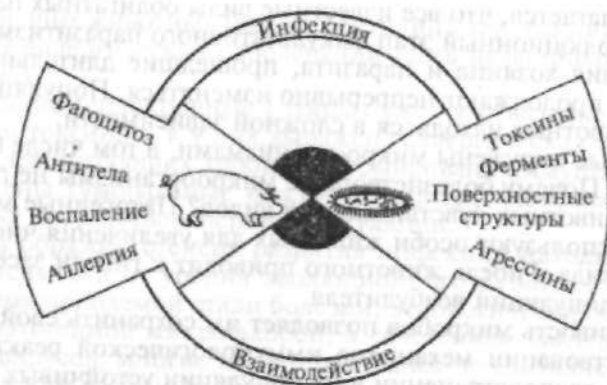


Рис. 37. Факторы взаимодействия организмов хозяина и паразита

9.2. ПАТОГЕННОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Патогенность — это потенциальная способность микроорганизмов вызывать инфекционный процесс. Патогенность является видовым признаком болезнетворных микробов и характеризуется выраженной специфичностью, т. е. способностью микробов данного вида вызывать определенные патологические изменения в организме конкретного животного.

Патогенность как видовой признак микроба генетически детерминирована и кодируется многими генами. В то же время степень выраженности патогенных, как и других биологических свойств микробов, проявляется в фенотипе по-разному. Отдельные штаммы микробов одного вида могут значительно различаться по степени патогенности. Для количественного выражения патогенности применяется термин «вирулентность». Следовательно, **вирулентность** — степень патогенности, это штаммовый признак патогенного микроба. Среди представителей некоторых видов патогенных микроорганизмов могут встречаться высоковирулентные штаммы, способные вызывать гибель животного при заражении несколькими микробными клетками, и штаммы с пониженной вирулентностью, смертельные дозы которых выражаются сотнями тысяч и миллионами клеток.

Вирулентность микробов определяют экспериментальным путем на восприимчивых животных. Единицей измерения вирулентности является условно принятая единица, так называемая минимальная смертельная доза, — D_{lm} (Dosis letalis minima). Это то наименьшее число живых микробов, которое при определенном способе заражения вызывает за определенное время смертельное

заболевание восприимчивого животного стандартных массы и возраста.

Поскольку животные обладают индивидуальной чувствительностью к патогенному микробу, то для более точной характеристики вирулентности микроба устанавливают абсолютную смертельную дозу (это то наименьшее количество микробов, которое вызывает гибель 100 % взятых в опыт животных) или среднюю смертельную дозу (LD₅₀ — dosis letalis 50 %, доза, вызывающая гибель половины зараженных животных). Последняя единица является наиболее объективным критерием вирулентности патогенных микробов, так как обеспечивает наименьшую ошибку в оценке этого свойства.

Вирулентность не является стабильным признаком микроба. Она может изменяться в зависимости от возраста культуры, условий ее выращивания, состава питательной среды. С другой стороны, вирулентность микроба определяется резистентностью макроорганизма, и, следовательно, может изменяться в зависимости от вида и возраста животного, условий его содержания. Так, к возбудителю пневмонии из лабораторных животных чувствительность проявляют белые мыши, морские свинки и кролики. Однако если для гибели мышей достаточно ввести одну-две клетки пневмококка, то смертельное заболевание у морских свинок и кроликов развивается лишь при заражении их большой дозой этих бактерий.

Вирулентность микроба проявляется также в зависимости от пути поступления его в организм. Например, у морских свинок, наиболее чувствительных к микобактериям туберкулеза лабораторных животных, смертельное заболевание развивается при введении через дыхательный тракт одной-двух клеток возбудителя туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*), а при заражении через кишечник смертельная доза увеличивается до нескольких тысяч клеток. При подкожном введении микобактерий туберкулеза у животных развивается форма заболевания с локализацией процесса в лимфатических узлах, отличающаяся сравнительно легким течением и заканчивающаяся, как правило, выздоровлением, в то время как при внутривенном заражении той же дозой возникает остро протекающая генерализованная форма инфекции (диссеминированный милиарный туберкулез) почти всегда со смертельным исходом.

Возможность изменения вирулентных свойств микроорганизмов указывает на необходимость соблюдения стандартных условий постановки опыта при определении их вирулентности.

Стабильные изменения вирулентности, как в сторону ее повышения, так и в сторону снижения, могут возникать спонтанно или же индуцироваться целенаправленно. Искусственное повышение вирулентности микробов достигается последовательными пассажами через организм восприимчивых животных, воздействием

мутагенов. Снижения вирулентности можно добиться, пассируя микробы через организм невосприимчивых животных, длительно культивируя их на синтетических питательных средах, а также путем воздействия различных факторов: иммунных сывороток, специфических бактериофагов, антимикробных препаратов, дезинфицирующих веществ, повышенной температуры.

9.2.1. ФАКТОРЫ, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ПАТОГЕННОСТЬ И ВИРУЛЕНТНОСТЬ

Патогенность и вирулентность обуславливаются комплексом свойств микроба, сформировавшихся в процессе приспособления к паразитированию в макроорганизме. Возникновение патогенности у микробов связано с приобретением ряда свойств, обеспечивающих способность проникать и распространяться в макроорганизме, противостоять его защитным приспособлениям и вызывать поражение жизненно важных систем.

При становлении патогенности первоначально, по-видимому, возникла инвазивная способность, позволившая микробу проникать в новую среду обитания — организм хозяина. В последующем появилась антифагоцитарная способность, обеспечивающая защиту микроба от клеток фагоцитарной системы организма. Инвазивные и антифагоцитарные свойства, обуславливающие агрессивность микроорганизмов, обеспечивают выживание проникших в организм микробов, их размножение, т. е. увеличение численности популяции, что имеет важное значение для дальнейшего развития инфекционного процесса. Способность вызывать специфические поражения связана с приобретением патогенными микробами токсигенных свойств. Все свойства, определяющие патогенность, проявляются микробами посредством продуцируемых биологически активных веществ, которые квалифицируются как факторы патогенности и разделяются на три категории: 1) факторы патогенности с инвазивной функцией; 2) факторы патогенности с антифагоцитарной функцией; 3) факторы патогенности с токсической функцией.

Факторы патогенности с инвазивной функцией. Для того чтобы проникнуть в макроорганизм, патогенный микроб должен преодолеть его слизистые оболочки, кожные покровы и другие тканевые барьеры. В основе прохождения через ткани лежит молекулярное взаимодействие ферментных систем возбудителя с веществами, из которых построены тканевые структуры макроорганизма. Патогенные микробы продуцируют ферменты, способные деполимеризовать основные вещества тканей, увеличивая тем самым их проницаемость и способствуя проникновению и распространению возбудителя. Перечень и действие ферментов патогенности разнообразны.

Фермент *гиалуронидаза* вызывает гидролиз гиалуроновой кислоты — основного компонента соединительной ткани. Гиалуронидазная активность обнаружена у патогенных микроорганизмов с внеклеточным характером паразитизма: стафилококков, гемолитических стрептококков группы А, пневмококков и др.

Фермент *нейраминидаза* отщепляет от разных гликоконъюгатов — гликопротеидов, гликолипидов и олигосахаридов производные нейраминовой кислоты — сиаловые кислоты, в связи с чем этот фермент еще называют *сиалидазой*. Сиаловые кислоты в составе функционально важных гликоконъюгатов содержатся в большом количестве в тканях, клетках, слизистых секретах и других биологических жидкостях организма. Они определяют вязкость биологических жидкостей, заряд клеток, принимают участие в межклеточных контактах, в процессах рецепции и биологического узнавания. Поэтому выработка нейраминидазы может привести к разнообразным нарушениям и патологическим изменениям. Нейраминидазу продуцируют многие бактерии: стрептококки, бактерии и др.

Фермент *коллагеназа*, продуцируемый возбудителями анаэробных инфекций, вызывает интенсивное разрушение тканевых белков, коллагеновых структур, что ведет к расплавлению мышечной ткани и способствует распространению микробов в тканях.

Фермент *лецитиназа*, вырабатываемый возбудителями анаэробной инфекции, стафилококками и другими микроорганизмами, вызывает гидролиз лецитина, входящего в состав клеточных и митохондриальных мембран.

Фермент *фибринолизин*, продуцируемый стафилококками, стрептококками, бактериями чумы, растворяет образующиеся при воспалении сгустки фибрина, препятствующие распространению микробов в организме.

Вырабатываемый патогенными стафилококками фермент *коагулаза* коагулирует плазму крови. Это способствует образованию вокруг стафилококковых поражений фибриновых барьеров, которые создают условия для длительного сохранения бактерий в тканях. Отложение под влиянием коагулазы фибрина на поверхности клеток стафилококка затрудняет их фагоцитоз и лизис.

Факторы патогенности с антифагоцитарной функцией. Непременным условием развития инфекционного процесса является персистенция микроба в организме в течение определенного периода времени. Она зависит от способности микроба противостоять защитным силам организма, в частности конститутивным факторам, особое место среди которых занимает фагоцитоз. При отсутствии способности преодолевать фагоцитарный барьер микробы подвергаются завершённому фагоцитозу, сопровождающемуся их гибелью.

В ходе эволюции патогенные микробы приобрели специальные приспособления, обеспечивающие их защиту от фагоцитоза. Ан-

тифагоцитарные свойства микробов связаны с их способностью образовывать вещества, блокирующие процесс фагоцитоза на различных стадиях. Одни из них подавляют реакцию хемотаксиса фагоцитов, другие блокируют прикрепление микробных клеток к фагоцитам и их поглощение, третьи противодействуют внутриклеточному перевариванию поглощенных микробов, и наконец, некоторые из этих веществ (лейкоцидины) вызывают лизис фагоцитов. Большая часть приспособлений направлена на преодоление узнавания и поглощения микробной клетки фагоцитом.

Агрессины — это вещества, подавляющие фагоцитоз и бактериолиз. Утрата агрессивности приводит к переходу бактерий из S- в R-форму. Агрессины в чистом виде обладают иммуногенной активностью. При добавлении агрессивности к живым патогенным микробам повышается их вирулентность. Они обладают специфичностью.

В отличие от инвазивной функции, осуществляемой продуктами метаболизма, антифагоцитарные функции выполняют определенные *поверхностно-расположенные морфологические структуры* микробной клетки. Особое место среди них принадлежит капсуле и капсулоподобным покровам. Из патогенных бактерий капсулу образуют пневмококки, возбудители сибирской язвы, чумы, туляремии, анаэробной инфекции.

Существование корреляции между капсулообразованием и вирулентностью особенно четко прослеживается у сибиреязвенных бацилл.

Штаммы *Bacillus anthracis*, образующие капсулу, отличаются высокой вирулентностью и вызывают тяжелые заболевания преимущественно с летальным исходом, в то время как бескапсульные варианты этих бацилл являются авирулентными. У пневмококков наблюдается даже некоторая зависимость вирулентности от величины капсулы. Из трех типов пневмококков, играющих роль в патологии, наиболее вирулентны пневмококки третьего типа, продуцирующие самую крупную капсулу.

Значение капсулы в антифагоцитарном эффекте прежде всего сводится к экранированию поверхностных клеточных структур — пептидогликана у грамположительных и липополисахарида у грамотрицательных бактерий, с которыми взаимодействует система комплемента (белок сыворотки крови сложного строения), играющая важную роль на стадии узнавания. Бактериальная клетка распознается фагоцитом как чужеродная после присоединения к соответствующим структурам комплемента. Капсула экранирует области связывания комплемента, блокируя тем самым процесс узнавания. Кроме того, благодаря высокой степени гидрофильности, обусловленной входящими в ее состав поверхностно-активными веществами, капсула препятствует поглощению микробной клетки фагоцитами. Бескапсульные варианты микро-

бов, отличающиеся выраженной гидрофобностью, более активно фагоцитируются клетками хозяина.

Антифагоцитарное действие слизи связано с гликолипопротеидом, в частности с его полисахаридным компонентом, и направлено против макрофагов. Ингибирующее фагоцитоз действие гликолипопротеида, по-видимому, обусловлено тем, что связывание полисахаридной части молекулы с поверхностью макрофага не обеспечивает контакта между взаимодействующими клетками вследствие хорошей отделяемости слизи от микробной клетки. Липидная часть гликолипопротеидного полимера, как полагают, несет ответственность за функцию подавления нейтрофилов, приводящую к развитию нейтропении (снижение числа нейтрофилов), часто возникающей при псевдомонадной инфекции.

Роль факторов патогенности с функцией защиты от фагоцитоза могут выполнять также другие *поверхностно-расположенные компоненты* микробной клетки, объединяемые общим названием — оболочечные антигены: Vi-антиген — у возбудителя сальмонеллеза, M-антиген — у гемолитического стрептококка, липидная фракция — у микобактерий туберкулеза. У бактерий чумы имеются три субстанции с антифагоцитарными свойствами, обеспечивающие защиту возбудителя от различных клеточных фагоцитарных систем. С V- и W-антигенами связана резистентность *Yersinia pestis* к моноцитам. Бактерии, содержащие эти субстанции, будучи поглощенными моноцитами, интенсивно размножаются в них, а после освобождения из моноцитов образуют фракцию F-1, приобретая устойчивость к полиморфно-ядерным лейкоцитам.

Факторы патогенности, обеспечивающие защиту микробной клетки от фагоцитоза, характеризуются, как правило, хорошо выраженными антигенными свойствами, и выработка антител против этих субстанций лежит в основе иммунитета при ряде инфекций.

Факторы патогенности с токсической функцией. Факторы патогенности с инвазивной и антифагоцитарной функциями играют роль на начальных стадиях развития инфекции. Выработка этих факторов и их воздействие на клетки и ткани является пусковым моментом в возникновении инфекционного процесса.

Дальнейшее же развитие процесса, формирование специфических патологических поражений при многих инфекциях определяется преимущественно группой факторов с токсической функцией. Считается, что *токсигенность* — способность *вырабатывать токсические вещества* — является более поздним эволюционным приобретением патогенных микробов по сравнению с агрессивными факторами.

Микробные токсины имеют различную химическую структуру и различаются по характеру биологического действия. В основу предложенной ранее классификации токсинов положен принцип

локализации их в микробной клетке. Все токсические вещества микроорганизмов делятся на внеклеточные и внутриклеточные (экзотоксины и эндотоксины).

Экзотоксины являются продуктами метаболизма микробной клетки и выделяются в окружающую среду. Экзотоксины продуцируют стафилококки, стрептококки, возбудители столбняка, ботулизма, анаэробной инфекции, сибирской язвы, чумы и др. Получают экзотоксины сравнительно простыми методами. Культуру токсигенного микроба выращивают в течение определенного времени на соответствующей питательной среде, а затем освобождают культуральную жидкость от микробных клеток путем фильтрации через бактериальные фильтры или центрифугированием. Полученный фильтрат или супернатант помимо токсина содержит также другие продукты метаболизма и называется нативным токсином.

Путем осаждения сульфатом аммония, кислотами, спиртом, ультрафильтрацией, электродиализом из него получают очищенный токсин. В очищенном виде получены столбнячный, ботулинический токсины, стафилококковые энтеротоксины и др.

Эндотоксины являются составной частью микробной клетки и освобождаются только при ее распаде. Эндотоксины содержат многие грамотрицательные бактерии: возбудители сальмонеллез, колиэнтеритов, бруцеллеза, туляремии. Для получения эндотоксинов используют сложные методы, основанные на экстрагировании микробной массы различными химическими растворителями. Нередко экстрагированию предшествует дезинтеграция клеток тем или иным способом: механическим растиранием, попеременным замораживанием и оттаиванием, озвучиванием ультразвуком, разрушением под высоким давлением.

Деление токсинов на экзо- и эндотоксины является несколько условным, так как согласно полученным в последние годы данным некоторые субстанции со свойствами экзотоксинов могут быть прочно связаны с определенными структурными компонентами микробной клетки (например, у чумных бактерий), а эндотоксины в процессе роста культуры частично выделяются в окружающую среду. Однако несмотря на то что наименование экзо- и эндотоксины утратило в настоящее время свой первоначальный смысл, эти две категории токсичных субстанций четко различаются между собой многими физико-химическими и биологическими свойствами. Экзотоксины представляют собой *вещества белковой природы*. По химической структуре они делятся на простые и сложные. Простые экзотоксины синтезируются микробной клеткой в форме единой полипептидной цепи. К простым относятся дифтерийный, столбнячный, ботулинический токсины. Сложные экзотоксины состоят из двух и более компонентов. Сложную структуру имеют холерный энтеротоксин (холероген), токсин си-

биреязвенных бацилл, α -токсин возбудителя анаэробной инфекции.

Химической природой экзотоксинов объясняется их малая устойчивость к факторам внешней среды, в частности к повышенной температуре. Большинство экзотоксинов (дифтерийный, столбнячный и др.) *термолабильны*, разрушаются при 60 °С в течение 20...60 мин. Исключение составляют ботулинический токсин, энтеротоксины стафилококка, кишечной палочки, выдерживающие кипячение в течение нескольких минут. Эти токсины не разрушаются под влиянием пищеварительных ферментов и при пероральном введении вызывают отравление организма.

Экзотоксины легко диффундируют в окружающую среду из микробных клеток. Обладают высокой активностью. Избирательно поражают отдельные органы и ткани. Выражены антигенные свойства; вызывают образование в организме антитоксинов. Протеины обладают свойствами ферментов; некоторые получены в кристаллическом состоянии. Термолабильны. Неустойчивы к протеолизическим ферментам (38...40 °С). Под действием 0,3...0,4%-ного формалина переходят в анатоксины.

Эндотоксины прочно связаны с неразрушенным телом микробной клетки; менее токсичны. Избирательного действия не наблюдается или оно слабо выражено. Слабые антигены; антисыворотки обладают невысокой активностью. Протеины или различные химические комплексы — глюколипоиды, полисахаридолипоидопротеиды. Термостабильны. Устойчивы к действию протеолизических ферментов. Более устойчивы к формалину.

Отличительной особенностью большинства экзотоксинов является выраженная *органотропность*, проявляющаяся в избирательном поражении определенных органов и тканей. Высокая специфичность действия экзотоксинов обуславливает характерную клиническую картину заболевания. В основе патогенетического действия токсинов лежит их способность разрушать определенные клеточные структуры или нарушать определенные клеточные функции. Органотропность и специфичность действия экзотоксинов связаны с наличием на поверхности чувствительных клеток организма специфических рецепторных структур, к которым присоединяются молекулы токсина, и особенностями строения токсинов.

Роль клеточных рецепторов для большинства известных бактериальных экзотоксинов (столбнячного, ботулинического, холерного и др.) выполняют молекулы ганглиозидов. Ганглиозиды представляют собой гликофинголипиды, содержащие сиаловые кислоты, причем непосредственное участие в связывании с токсином принимает углеводная часть ганглиозидной молекулы. Именно поэтому воздействие нейраминидазой, расщепляющей сиало-

вые кислоты, снижает степень связывания ганглиозида с токсином, а ганглиозиды, лишенные остатков сиаловой кислоты, не обладают токсинсвязывающей способностью.

Соединение токсина с рецептором клетки осуществляется посредством определенного участка молекулы.

Токсины представляют собой биологически активные макромолекулярные системы с двумя четко разграниченными функциями. Одна часть молекулы содержит *активированные группы*, ответственные за специфическое патогенетическое действие токсина. Другая часть несет *акцепторные группы*, ответственные за присоединение токсина к определенным рецепторным структурам на чувствительной клетке.

Взаимодействие токсина с чувствительной клеткой, приводящее к развитию интоксикации, осуществляется в несколько последовательных этапов и связано с его *активацией*.

Многие экзотоксины, как простые так и сложные, синтезируются патогенными бактериями в виде неактивных предшественников, именуемых *протоксинами*, и проявляют биологическую активность только после активации. Процесс активации протоксинов *in vivo* осуществляется по типу ограниченного протеолиза, по видимому под действием протеаз, вырабатываемых либо самой бактериальной клеткой, либо тканью-мишенью.

У простых токсинов в результате протеолиза происходит расщепление одноцепочечной молекулы с образованием бифункциональной системы, состоящей из активаторного и акцепторного фрагментов.

В отличие от названных энтеротоксинов действие энтеротоксинов, вырабатываемых *Staph. aureus*, *Cl. perfringens*, *B. cereus*, вызывающих пищевые отравления, сопровождающиеся также рвотой и диареей, не ограничивается одними лишь изменениями в проницаемости кишки. Например, энтеротоксины стафилококка представляют собой нейротоксины и действуют через алиментарный тракт на центральную и вегетативную нервную систему.

Многие патогенные микроорганизмы, как, например возбудители ботулизма, анаэробной инфекции, стафилококки, стрептококки, секретируют в культуральную среду токсичные вещества, обладающие способностью в опытах *in vitro* лизировать эритроциты и получившие в связи с этим название *гемолизины*. При внутривенном введении мышам эти токсины оказывают летальное действие.

Экзотоксины чрезвычайно токсичны, действуют в малых дозах. Токсические свойства их измеряют в D_{1m} и LD₅₀, которые определяют в экспериментах на чувствительных животных. Наиболее сильным из бактериальных токсинов является ботулинический. В 1 мг чистого токсина ботулина содержится около 1 000 000 D_{1m} для морских свинок.

Токсичность связана с наличием в структуре токсинов активного центра, блокирование которого путем обработки формалином (0,3...0,4%-ный раствор формалина при 38 °С в течение 30 дней) приводит к утрате токсических свойств. Такие обезвреженные токсины именуется *анатоксинами* (токсоидами). Они широко применяются в качестве вакцин для профилактики заболеваний, в патогенезе которых основную роль играет токсический фактор (дифтерия, столбняк и др.).

У всех экзотоксинов хорошо выражены антигенные и иммуногенные свойства, которые сохраняются после их детоксикации. Антитела против экзотоксинов обладают защитным действием и составляют основу антитоксического иммунитета. Для лечения столбняка, ботулизма и других инфекций используют антитоксические сыворотки, содержащие антитела — антитоксины.

Эндотоксины входят в состав внешнего слоя клеточной стенки грамотрицательных бактерий. По химической природе они представляют собой *липополисахариды* (ЛПС) и являются структурным компонентом соматического O-антигена, который кроме ЛПС включает также протеин.

В состав ЛПС входит липид А и полисахаридная область, состоящая из базальной структуры и O-специфических боковых цепей.

Липид А, являющийся существенной частью эндотоксина, ответственной за его токсические свойства, имеет сходную структуру и химический состав у различных видов грамотрицательных бактерий и состоит из ацетилглюкозамина и длинноцепочечных жирных кислот.

O-полисахариды боковых цепей ЛПС, в отличие от базальной структуры полисахарида и липида А, характеризуются чрезвычайным разнообразием и определяют серологическую специфичность различных бактерий.

Наиболее изучены эндотоксины энтеробактерий: сальмонелл, эшерихий. Кроме токсичности они обладают *пирогенностью* — способностью вызывать повышение температуры тела. За пирогенность, равно как и за токсичность, ответственна липидная фракция токсина. Пирогенный эффект эндотоксина связан с высвобождением под его влиянием эндогенного пирогенного вещества из полиморфно-ядерных лейкоцитов и макрофагов.

Эндотоксины имеют характеристики, часто прямо противоположные таковым экзотоксинов. Эндотоксины *термостабильны*, некоторые из них выдерживают длительное кипячение и даже автоклавирование при 120 °С в течение 30 мин. При обработке формалином эндотоксины обезвреживаются лишь частично. Эндотоксины по сравнению с экзотоксинами менее токсичны: LD₅₀ для среднего эндотоксинового препарата составляет от 200 до 400 мг на мышь.

Органотропность у эндотоксинов выражена слабо. При введении в организм в больших дозах все эндотоксины вызывают общее отравление с однотипной клинической картиной: слабость, одышку, диарею, понижение температуры тела. Сходное биологическое действие эндотоксинов различного происхождения, очевидно, объясняется отсутствием специфики в структуре липида А, ответственного за их биологическую активность.

В отличие от экзотоксинов эндотоксины обладают относительно слабыми антигенными свойствами. Антисыворотки к эндотоксинам не полностью нейтрализуют их токсические свойства. Объясняется это тем, что эндотоксины индуцируют образование антител к полисахаридной части, а токсичность их обусловлена липидным компонентом.

Одной из особенностей эндотоксинов энтеробактерий является их способность вызывать в небольших дозах временное повышение устойчивости организма к инфекции. Роль эндотоксина в увеличении резистентности неспецифична: липополисахарид, полученный из одного вида бактерий, вызывает формирование устойчивости к заражению другими видами как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. В механизме развития устойчивости основное значение принадлежит активации макрофагальной системы организма и индукции выработки интерферона. Явление неспецифической стимуляции защитных систем играет существенную роль, так как в естественных условиях постоянно происходит иммунизация человека и животных эндотоксинами кишечных бактерий.

Генетический контроль токсигенности. Токсигенные свойства микроорганизмов находятся под контролем так называемых тох-генов, локализованных в хромосоме или внехромосомных генетических структурах. Синтез эндотоксинов кодируется генами бактериальной хромосомы. Контролирующие синтез экзотоксинов гены могут содержаться как в хромосоме, так и в профагах или плаزمиде. Хромосомными генами детерминируется, в частности некротоксин возбудителя анаэробной инфекции (*S. perfringens*).

Утрата бактериями тох-генов лишает их токсигенности и сопровождается снижением или полной утерей патогенности.

Адгезивность как фактор патогенности. Для проявления повреждающего действия микроб должен проникнуть в ткани хозяина. В ходе эволюции патогенные микроорганизмы приспособились к проникновению в макроорганизм через определенные ткани, где они находят благоприятные условия для своего развития и которые именуется входными воротами инфекции.

Одни виды микробов могут вызывать заболевания только при проникновении в организм через строго определенные ворота. Некоторые виды микроорганизмов, например возбудители чумы, туляремии, сибирской язвы, могут вызывать заболевания, прони-

кая в организм через различные входные ворота, чем обуславливается специфика клинических форм заболевания.

Внедрение микроба в организм хозяина осуществляется через наружные покровы — кожу и слизистые мембраны, выполняющие роль барьеров для микроорганизмов. Неповрежденная кожа непроницаема для микроорганизмов, и внедрение микробов через кожу в подкожные слои почти всегда осуществляется через раны.

В то же время многие вирулентные микробы довольно легко преодолевают защитный барьер слизистых оболочек. Поэтому большинство микробных инфекций связано со слизистыми оболочками. Эволюционно сложившиеся взаимоотношения между патогенными микробами и эпителиальными клетками слизистых оболочек макроорганизма могут быть разделены на три категории: закрепление и размножение микробов на поверхности эпителия; внедрение и размножение микробов внутри эпителиальных клеток; проникновение микробов через эпителий в расположенные под ним ткани.

Во всех случаях взаимодействие микробов с эпителиальными клетками начинается с прикрепления их к эпителию. Прикрепление, или *адгезия*, микробов к эпителиальным клеткам является пусковым механизмом инфекционного процесса (рис. 38).

Процесс адгезии специфичен. Во-первых, наблюдается избирательность прикрепления микробов к эпителиальным клеткам в определенных участках организма: в респираторном, алиментарном и мочеполовом трактах. Во-вторых, имеет место избирательность прикрепления определенных штаммов микроба к эпителию хозяина, у которого они вызывают заболевание; штаммы, вызывающие заболевание у людей, более активно прикрепляются к соответствующим эпителиальным клеткам человека, чем к аналогичным клеткам животного, и наоборот.

Специфичность адгезии обусловлена наличием комплементарных макромолекулярных структур у взаимодействующих (прока-

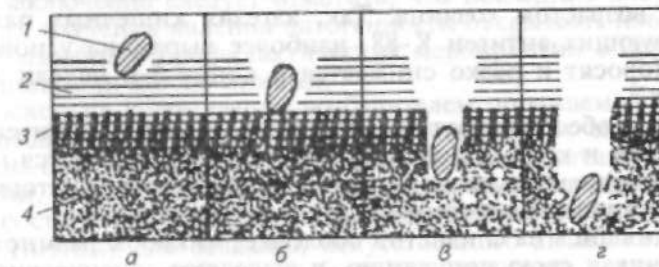


Рис. 38. Схема взаимодействия (а...г) патогенных микроорганизмов с эпителиальными клетками:

1 — микробная клетка; 2 — гликокаликс; 3 — щеточная кайма; 4 — эпителий

риотической и эукариотической) клеток. Структуры микробной клетки, ответственные за распознавание и прикрепление, называются *адгезинами*, или *лигандами*, а структуры клеток хозяина — *рецепторами*. Локализуются и адгезины, и рецепторы на поверхностных мембранах клеток. Адгезины у многих бактерий (протеев, вибрионов, кишечных палочек, дифтерийных палочек и др.) входят в состав клеточных органелл, таких как фимбрии и фибриллы. У микробов, лишенных таких органелл, например у микоплазм, адгезины находятся в выростах цитоплазматической мембраны. Большая часть известных адгезинов имеет белковую природу, а функцию рецепторов для них выполняют углеродсодержащие детерминанты.

Доказательства специфического взаимодействия между комплексными структурами патогенных микробов и эпителиальных клеток слизистых оболочек получены при изучении энтеро-патогенных штаммов кишечных палочек. В отличие от непатогенных эшерихий, являющихся нормальными обитателями толстой кишки и не способных прикрепляться к эпителию тонкой кишки, энтеро-патогенные кишечные палочки обладают способностью колонизировать тонкую кишку, продуцировать энтеротоксин и вызывать диарею. Адгезивную функцию у энтеро-патогенных кишечных палочек выполняют локализованные в фибриллах антигены, обозначаемые К-88 у патогенных для поросят штаммов, F-41 и К-99 — у патогенных для телят и CFA/I и CFA/II — у патогенных для человека штаммов. Штаммы кишечных палочек, утратившие эти антигены, не способны заселять кишечник и вызывать заболевания.

Численность прикрепляющихся к эпителиальным клеткам бактерий зависит от числа рецепторов на поверхности эпителия. Количество же и строение рецепторов эпителиальных клеток значительно колеблется в пределах вида, у отдельных особей они вообще отсутствуют.

Адгезия микроорганизмов к клеткам эпителия может изменяться с возрастом хозяина. Так, адгезия кишечных палочек, продуцирующих антиген К-88, наиболее выражена у новорожденных поросят и резко снижается к концу 5-й недели жизни животных.

Адгезины обеспечивают прикрепление микробов к эпителиальным клеткам и колонизацию ими эпителия, что является непременным условием реализации поражающего действия патогенами, паразитирующими на поверхности слизистых оболочек.

Закрепившись на слизистой оболочке, микробы размножаются, увеличивая свою популяцию, и выделяют токсические продукты, которые оказывают повреждающее действие на организм. При этом продуцируемые микробами токсины могут обуславливать местное повреждение или, поступая через слизистую обо-

лочку в кровь, вызывать повреждение определенных органов и тканей.

Процесс взаимодействия микробов с эпителиальными клетками можно рассмотреть на примере возбудителей кишечных инфекций, среди которых встречаются представители, паразитирующие на поверхности эпителия, внутри эпителиальных клеток и субэпителиально. Все возбудители кишечных инфекций прежде всего прилипают к гликокаликсу, покрывающему исчерченную каемку энтероцитов (клетки цилиндрического эпителия), разрушают его и вступают в контакт с микроворсинками щеточной каемки (см. рис. 38, а).

Последующие этапы взаимодействия с эпителиальными клетками у разных бактерий происходят по-разному.

Местом локализации сальмонелл служит подвздошная кишка. Механизм проникновения этих бактерий в эпителиальные клетки сходен с таковым шигелл, однако в отличие от последних сальмонеллы почти не оказывают повреждающего действия на исчерченную каемку энтероцитов. После проникновения в энтероцит сальмонеллы вместе с вакуолью переносятся в базальную часть клетки, откуда, не задерживаясь, поступают в подлежащие ткани и регионарные лимфатические узлы. Здесь они интенсивно размножаются и с лимфой поступают в кровяное русло, разносятся по всему организму, обсеменяя многие органы и ткани.

Таким образом, адгезины и адгезия играют важную роль в развитии начальной стадии всех инфекций, связанных со слизистыми оболочками, независимо от того, сопровождаются ли они колонизацией возбудителем эпителия или же процесс взаимодействия микроба с эпителиальными клетками ограничивается лишь проникновением его через эпителий в подлежащие ткани. Мутантные варианты патогенных бактерий, лишенные адгезинов, не обладают патогенными свойствами. Это позволяет рассматривать адгезивность наряду с агрессивностью и токсигенностью как фактор патогенности микроорганизмов.

В заключение следует отметить, что последние достижения в области изучения явления патогенности открывают новые подходы к разработке профилактических мероприятий в борьбе с инфекционными заболеваниями.

Поскольку колонизация возбудителем поражаемой ткани, сопровождающаяся размножением и увеличением его популяции, связана преимущественно с адгезивной и антифагоцитарной функциями, то, следовательно, основу антибактериального иммунитета составляют антитела, способные нейтрализовать эти функции. Поэтому для создания искусственного антибактериального иммунитета успешно могут быть использованы извлеченные из микробной клетки компоненты, обеспечивающие прикрепление возбудителя к соответствующей ткани и защиту его от фагоцитоза. Принимая во внимание особую роль адгезивной функции на на-

чальных этапах развития респираторных и энтеральных инфекций, представляется весьма перспективным для их профилактики введение очищенных адгезинов бактерий, готовых антител против них или же растворимых аналогов рецепторов к адгезинам.

Немаловажную роль в возникновении и развитии инфекции играют так называемые ворота инфекции, т. е. место проникновения болезнетворного микроба в организм. Например, возбудитель столбняка постоянно обитает в пищеварительном тракте некоторых животных, не причиняя вреда организму. Однако, попадая в мышцы при ранениях, вызывает тяжелую болезнь. Таким образом, в одном месте микроб может быть индифферентным, а в другом (в том же количестве) — губительным для организма.

Из ворот инфекции микробы с кровью и лимфой, другими жидкостями распространяются по организму, но концентрируются там, где условия для них наилучшие.

Решающим моментом, определяющим место концентрации микроба, является его *органоотропность*. Например, при бруцеллезе у беременных животных возбудитель концентрируется в матке благодаря наличию в ней вещества эритрола, являющегося для бруцелл лимитирующим фактором роста. Местом локализации возбудителя определяются пути его выделения из организма. Например, сальмонеллы выделяются с фекалиями (при кишечной форме), при септицемии возбудитель выделяется с молоком, мочой, слюной. Возбудители дерматомикозов разносятся с чешуйками кожи, волосами. Знание путей выделения возбудителя при той или иной инфекции определяет направленность санитарных мер.

Для уяснения сущности инфекции важное значение имеет также изучение поведения возбудителя в организме инфицированного животного и ответные реакции со стороны организма.

Знание патогенеза болезни позволяет специалисту избрать правильный метод лечения больных животных.

На возникновение и проявление инфекции оказывают влияние экологические и биологические факторы. К экологическим относятся: общность территории, кормовые связи популяции, миграция животных; к биологическим — комплементарность и чужеродность антигенных структур возбудителя тканевым структурам хозяина. Биологические факторы находятся вне среды нашего влияния, хотя отдельные моменты удачного вмешательства имеют (создание групп животных и птиц, устойчивых к той или иной инфекции).

9.2.2. УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Наряду с патогенными микробами — возбудителями классических инфекций, существуют так называемые условно-патогенные микроорганизмы. К ним относятся представители нормаль-

ной микрофлоры животных (*E. coli*, *S. faecalis*, *S. epidermidis*, *P. vulgaris* и др.), обитающие на коже и слизистых оболочках органов и систем, сообщающихся с внешней средой. В здоровом организме нормальная микрофлора создает конкурентные условия для патогенных микробов, подавляя их рост и размножение, и оказывает стимулирующее влияние на развитие и функционирование иммунной системы. Присущие им потенциально патогенные свойства условно-патогенные микробы проявляют при ослаблении защитных сил организма, когда они могут вызывать различные заболевания.

Впервые на возможность проявления патогенных свойств нормальной микрофлорой человека указал И. И. Мечников. В последние годы во всех странах участились случаи вызываемых условно-патогенными микробами инфекционных процессов, характеризующихся тяжелым течением, трудно поддающихся лечению и отличающихся высокой летальностью. В этиологии этих заболеваний наряду с кокками (стафилококки, стрептококки) ведущее место занимает грамотрицательная флора: кишечная палочка, клебсиеллы, протей, псевдомонасы, листерии.

Одной из причин роста заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами, явилось нарушение сложившегося в ходе эволюции равновесия между макроорганизмом и населяющей его микрофлорой, а также между отдельными видами, составляющими эту флору. Подобные сдвиги в микробной экологии животных могут быть обусловлены применением антибиотиков, особенно широкого спектра действия, иммунодепрессантов, повышением общего уровня радиации и другими факторами.

Под воздействием этих факторов наблюдаются изменения видового состава нормальной микрофлоры на коже и слизистых оболочках, уменьшение концентрации облигатных (постоянных) и увеличение частоты встречаемости и концентрации факультативных (непостоянных) ее представителей, селективное размножение более патогенных, обладающих лекарственной устойчивостью форм.

Потенциально патогенные свойства проявляются почти у всех представителей нормальной микрофлоры животных. Так, из облигатной микрофлоры кишечника одни лишь бифидобактерии считаются непатогенными. Бактероиды, лактобактерии, энтерококки, эшерихии описаны как этиологические факторы при различных заболеваниях. Например, кишечная палочка (постоянный обитатель толстой кишки) может явиться причиной цистита, холецистита, пиелита, септицемии.

Более частой причиной воспалительных процессов являются обитающие в различных участках тела представители факультативной микрофлоры, среди которых преобладают потенциально патогенные формы.

У многих представителей нормальной микрофлоры обнаружены факторы, определяющие их потенциальную патогенность. К ним относятся прежде всего поверхностные структуры, обуславливающие адгезивные свойства (K-антиген у эшерихии) и подавляющие защитные функции организма (капсулы — у лактобактерии, клебсиелл, стафилококков; слизи — у псевдомонасов; Vi-антиген — у эшерихии и цитробактеров). Многие представители нормальной микрофлоры продуцируют также ферменты, способствующие распространению микробов в тканях: гиалуронидазу, нейраминидазу, фибринолизин и др.

Патогенность представителей нормальной микрофлоры может увеличиваться благодаря существующему в естественных условиях обмену генетической информацией, определяющему возможность передачи факторов патогенности нормальным обитателям организма от проникших патогенных бактерий. В частности, установлена передача при помощи плазмид способности синтезировать K-антиген и продуцировать энтеротоксин непатогенным кишечным палочкам от энтеропатогенных.

Таким образом, микрофлора, населяющая открытые полости организма, может играть роль как биологического барьера, так и потенциального резервуара инфекции. Проявление же защитных или патогенных свойств ее представителями зависит от состояния организма и барьерных функций слизистых оболочек и кожи. В настоящее время условно-патогенные микроорганизмы занимают значительное место в инфекционной патологии животных.

Контрольные вопросы и задания. 1. Дайте определение инфекции. 2. Назовите отличительные особенности инфекционных болезней. 3. Что называют патогенностью и вирулентностью? 4. Перечислите факторы патогенности бактерий. 5. В чем отличие экзо- и эндотоксинов бактерий? 6. Что называют адгезией бактерий? 7. В чем заключается современная роль условно-патогенных бактерий?

Глава 10

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

10.1. ЧТО ТАКОЕ БИОТЕХНОЛОГИЯ, ЕЕ ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Биотехнология представляет собой область знаний, которая возникла и оформилась на стыке микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, химической технологии и ряда других наук. Рождение биотехнологии обусловлено потребностями общества в новых, более дешевых продуктах для медицины и ветеринарии, а также в принципиально новых технологиях. Биотехнология (от греч. *bios* — жизнь, *teken* — искусство, мастерство, *logos* — наука, умение, мастерство) — это получение продуктов из биологических объектов или с применением биологических объектов. В качестве биологических объектов могут быть использованы организмы животных и человека (например, получение иммуноглобулинов из сывороток вакцинированных лошадей или людей; получение препаратов крови доноров), отдельные органы (получение гормона инсулина из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней) или культуры тканей (получение лекарственных препаратов). Однако в качестве биологических объектов чаще всего используют одноклеточные микроорганизмы, а также животные и растительные клетки. Выбор этих объектов обусловлен следующими обстоятельствами:

1) клетки являются своего рода «биофабриками», вырабатывающими в процессе жизнедеятельности разнообразные ценные продукты (белки, жиры, углеводы, витамины, аминокислоты, антибиотики, гормоны, антитела, антигены, ферменты, спирты и пр.). Эти продукты, крайне необходимые в жизни человека, пока недоступны для получения «небиотехнологическими» способами из-за сложности технологии процессов или экономической нецелесообразности, особенно в условиях крупномасштабного производства;

2) клетки чрезвычайно быстро воспроизводятся, что позволяет за относительно короткое время искусственно нарастить на сравнительно дешевых и недефицитных питательных средах в промышленных масштабах огромное количество биомассы микробных, животных или растительных клеток;

3) биосинтез сложных веществ (белков, антибиотиков, антигенов, антител и др.) значительно экономичнее и технологически

доступнее, чем химический синтез. Коэффициент полезного действия «работы» клетки равен 70 %, а самого совершенного технологического процесса — значительно ниже;

4) возможность проведения биотехнологического процесса в промышленных масштабах, т. е. наличие соответствующего технологического оборудования и аппаратуры, доступность сырья, технологии переработки и др.

Клетки животных и растений, микробные клетки в процессе жизнедеятельности (ассимиляции и диссимиляции) образуют новые продукты и выделяют метаболиты, обладающие разнообразными физико-химическими свойствами и биологическим действием. Обычно продукты жизнедеятельности одноклеточных делят на четыре категории: 1) сами клетки как источник целевого продукта (например, выращенные бактерии или вирусы используют для получения живой или убитой корпускулярной вакцины; дрожжи как кормовой белок или основу для получения гидролизатов питательных сред и т. д.); 2) крупные молекулы (макромолекулы), которые синтезируются клетками в процессе выращивания: ферменты, токсины, антигены, антитела, пептидогликаны и др.; 3) первичные метаболиты — низкомолекулярные вещества, необходимые для роста клеток (аминокислоты, витамины, нуклеотиды, органические кислоты); 4) вторичные метаболиты (идиолиты) — низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста клеток (антибиотики, алкалоиды, токсины, гормоны).

Биотехнология использует эту продукцию клеток как сырье, которое в результате технологической обработки превращается в конечный продукт. С помощью биотехнологии получают множество продуктов, используемых в различных отраслях: медицине (антибиотики, витамины, ферменты, аминокислоты, гормоны, вакцины, антитела, компоненты крови, диагностические препараты, иммуномодуляторы, алкалоиды, белки, нуклеиновые кислоты, нуклеозиды, нуклеотиды, липиды, антимаболиты, антиоксиданты, противоглистные и противоопухолевые препараты); ветеринарии и сельском хозяйстве (кормовой белок, кормовые антибиотики, витамины, гормоны, вакцины, биологические средства защиты растений, инсектициды); пищевой промышленности (аминокислоты, органические кислоты, пищевые белки, ферменты, липиды, сахара, спирты, дрожжи); химической промышленности (ацетон, этилен, бутанол); энергетике (биогаз, этанол).

Следовательно, биотехнология направлена на создание диагностических, профилактических и лечебных медицинских и ветеринарных препаратов, на решение продовольственных вопросов (повышение урожайности, продуктивности животноводства, улучшение качества пищевых продуктов — молочных, кондитерских,

хлебобулочных, мясных, рыбных); на обеспечение многих технологических процессов в легкой, химической и других отраслях промышленности. Необходимо отметить также все возрастающую роль биотехнологии в экологии, так как очистка сточных вод, переработка отходов и побочных продуктов, их деградация (фенол, нефтепродукты и другие вредные для окружающей среды вещества) осуществляются при помощи микроорганизмов.

В настоящее время в биотехнологии выделяют медико-фармацевтическое, продовольственное, сельскохозяйственное и экологическое направления. В соответствии с этим биотехнологию можно разделить на медицинскую, сельскохозяйственную, промышленную и экологическую. Медицинская в свою очередь подразделяется на фармацевтическую и иммунобиологическую, сельскохозяйственная — на ветеринарную и биотехнологию растений, а промышленная — на соответствующие отраслевые направления (пищевая, легкая промышленность, энергетика и т. д.).

Биотехнологию также подразделяют на традиционную (старую) и новую. Последнюю связывают с генетической инженерией. Общеизвестное определение предмета «биотехнология» отсутствует и даже ведется дискуссия о том, наука это или производство.

Видимо, правильно будет определить биотехнологию как сферу деятельности, которая на основе изучения процессов жизнедеятельности живых организмов, главным образом клеток микроорганизмов, животных и растений, использует эти процессы и сами объекты для промышленного производства продуктов, необходимых в жизни человека, а также получения биоэффектов, ранее не встречавшихся в природе (например, получение рекомбинантных бактерий, трансгенных растений и животных).

В биотехнологии, как ни в какой другой области знаний, тесно увязываются, интегрируются наука и производство.

Промышленное производство в биотехнологии по сути основано на нескольких принципах: брожении (ферментации), биоконверсии (превращении одного вещества в другое), культивировании растительных и животных клеток, бактерий и вирусов, генетических манипуляциях. Реализация этих научных принципов в производстве потребовала разработки промышленного оборудования и аппаратуры, отработки и оптимизации технологических процессов, разработки способов оценки и контроля продукции на всех ее стадиях.

Современная биотехнологическая промышленность располагает крупными заводами, опытно-конструкторскими учреждениями, научно-исследовательскими институтами. Фундаментальными проблемами биотехнологии заняты научно-исследовательские институты РАН, РАМН и ряд прикладных отраслевых институтов.

10.2. КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнология возникла в древности (примерно 6000...5000 лет до н.э.), когда люди научились выпекать хлеб, варить пиво, готовить сыр и вино. Этот первый этап развития биотехнологии был сугубо эмпирический и продолжал оставаться таким, несмотря на совершенствование технологических процессов и расширение сфер использования биотехнологических приемов, вплоть до открытия Л. Пастером в XIX в. природы процесса брожения. С этого момента начался второй, научный, этап традиционной биотехнологии. В этот период получены и выделены ферменты, открыты многие микроорганизмы; разработаны способы их выращивания в массовых количествах; получены культуры животных и растительных клеток и разработаны способы искусственного их культивирования; в результате изучения физиологии, биохимии и генетики микробных и животных клеток получены многие продукты микробиологического синтеза, необходимые для медицины, сельского хозяйства и промышленности. Сформировалась вначале техническая микробиология, а затем биотехнология. Однако промышленное производство сводилось в основном к получению продуктов на основе природных штаммов.

На смену старой традиционной биотехнологии пришла новая биотехнология, основанная на применении искусственно получаемых штаммов — суперпродуцентов, использовании иммобилизованных ферментов, применении культур животных и растительных клеток, широком использовании генетической инженерии для получения клеток-рекомбинантов, моноклональных антител и других биологически активных веществ.

Новая биотехнология возникла, таким образом, на основе достижений молекулярной биологии и микробиологии, генетики и генетической инженерии, иммунологии и химической технологии. Основой ее явилась генетическая инженерия, индустрия рекомбинантных ДНК.

10.3. МИКРООРГАНИЗМЫ, КЛЕТКИ И ПРОЦЕССЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

В природе существует огромное число микроорганизмов. Все они способны синтезировать продукты или осуществлять реакции, которые могут быть полезны для биотехнологии. Однако практическое применение нашли не более 100 видов микроорганизмов (дрожжи, бактерии, грибы, вирусы, водоросли), так как остальные мало изучены.

Дрожжи широко используют в хлебопечении, пивоварении, виноделии, получении соков, кормового белка, питательных сред

для выращивания бактерий и культур животных клеток. Из 500 известных видов дрожжей используется только несколько видов — *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *S. uvarum*.

Среди бактерий чаще применяют в биотехнологии представители следующих родов: *Acetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*. Например, молочнокислые бактерии (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*) используют для сбраживания сахаров; псевдомонады — например *P. denitrificans* — для получения витамина B₁₂, *Corynebacterium glutamatum* — для синтеза аминокислот и др.).

Продуцентами разнообразных антибиотиков в биотехнологии служат актиномицеты (род *Streptomyces*), грибы (*Penicillium chrysogenum*, *Cephalosporium acremonium* и др.).

Многие микроорганизмы — бактерии, дрожжи, вирусы — используют в качестве реципиентов чужеродного генетического материала с целью получения рекомбинантных штаммов — продуцентов биотехнологической продукции. Получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, продуцирующие интерфероны, инсулин, гормон роста, антигены вируса СПИДа; штаммы *B. subtilis*, вырабатывающие интерферон; штаммы дрожжей, продуцирующих интерлейкин-2, антиген вируса гепатита В; рекомбинантные вирусы осповакцины, синтезирующие антигены гепатита В, вируса бешенства, клещевого энцефалита и др.).

Для получения вакцин и диагностических препаратов используют также патогенные микроорганизмы (возбудители брюшного тифа, коклюша, дифтерии, столбняка и др.).

Широкое применение в биотехнологии нашли культуры животных и растительных клеток. Известно, что строение, физиология и биотехнология животных и растительных клеток более сложные, чем бактериальных клеток. Культуры животных и растительных клеток могут служить продуцентами более широкого ассортимента сложной и ценной продукции, однако процесс культивирования растительных и животных клеток очень трудоемкий и дорогостоящий. Из культур тканей растений можно получать разнообразные соединения, используемые в медицине (алкалоиды, противовоспалительные вещества, противолейкозные и противоопухолевые, противобактериальные средства, препараты для лечения заболеваний сердца и почек, ферменты, витамины, опиаты и др.); в сельском хозяйстве, химической и других отраслях промышленности. Животные клетки используют как для получения продуктов их жизнедеятельности, так и для выращивания в клетках вирусов с целью получения из них вакцин и диагностических препаратов.

Технология получения продуктов микробного или клеточного синтеза. Основным условием успешного проведения технологического процесса является выбор или получение высокопродуктивного штамма-продуцента и поддержание его в активном состоянии.

Вторым важным условием считается подбор питательных сред, обеспечивающих максимальное накопление биомассы или целевого продукта; питательные среды должны состоять из дешевого, недефицитного и доступного сырья, поскольку при промышленном культивировании микроорганизмов потребляются огромные их количества. В крупномасштабном производстве для приготовления питательных сред служит обычно сравнительно дешевое сырье (меласса, парафины нефти, дрожжи, уксусная кислота, природный газ). Более ограниченное применение, главным образом при получении медицинских препаратов, находят казеин, препараты крови, среды из мясных гидролизатов.

Для выращивания клеток животных применяют питательные среды, имеющие сложный состав. Они komponуются из высококачественного сравнительно дорогого сырья (аминокислоты, соли, ростовые факторы). В последнее время для культивирования клеток успешно разрабатываются питательные среды из гидролизатов казеина, дрожжей, мышц и крови.

Для получения продукции в максимальных количествах активный штамм-продуцент выращивают на оптимальной питательной среде в оптимальных условиях культивирования (посевная доза, температура, pH, окислительно-восстановительный потенциал, аэрация, массообменные характеристики, питательные и ростовые добавки, сроки культивирования). Выращивание проводят в ферментаторах (культиваторах), вместимость которых может варьироваться от 2 л до 100...400 м³ в зависимости от потребности в продукте. Для получения культур животных клеток объем ферментаторов пока не превышает 3 м³. В настоящее время биотехнологическая промышленность оснащена ферментаторами с программным управлением, позволяющими вести процесс в автоматическом режиме. Процесс культивирования ведется в асептических условиях, чтобы получить чистые культуры целевых микроорганизмов или культуры клеток.

Помимо суспензионного (глубинного) культивирования в ферментаторах иногда применяют поверхностное культивирование на плотных питательных средах (бактерии, грибы) или в монослое (культуры животных клеток). Последний способ осуществляется в роллерных (вращающихся) установках.

Полученную биомассу микроорганизмов или культуры клеток подвергают затем переработке, сущность которой определяется технологией получения целевого продукта. Наиболее типовыми являются следующие процессы: 1) концентрирование биомассы (сепарирование, центрифугирование) и приготовление из нее жидкого (суспензии, пасты) или сухого продукта; 2) высушивание, которое проводится лиофильным способом из замороженного состояния или путем распыления в потоке теплого воздуха. Для этого существуют специальные лиофильные аппараты (в том числе ленточные автоматические сушилки большой мощности) и

распылительные сушилки, в том числе экологически чистые, так как процесс ведется в замкнутом цикле. Последние имеют большую мощность, однако не позволяют сушить термолабильные продукты; 3) сбор центрифугата после отделения биомассы и выделение из него целевого продукта, например антигенов, токсинов, инсулина и др. Иногда предварительно прибегают к дезинтеграции (разрушению) клеток механическим способом, ультразвуком или за счет осмоса, чтобы увеличить выход целевого продукта.

В тех случаях, когда из биомассы или центрифугата (культуральной жидкости) необходимо выделить активную субстанцию — витамин, аминокислоту, антиген, антитело, фермент и пр., применяют физические или физико-химические методы очистки. Выбор их определяется свойствами выделяемого вещества (природа, молекулярная масса, устойчивость к внешним воздействиям, химическое средство и т. д.). Из физических методов на первичных стадиях чаще всего применяют сепарирование, центрифугирование (ультрацентрифугирование), а из физико-химических — осаждение нейтральными солями, спиртом, ацетоном, а также ультрафильтрацию, хроматографию, электрофорез. Методы выделения и очистки, как правило, многоступенчатые. Чистоту получаемого продукта характеризуют наличием в нем примесей и выражают коэффициентом очистки, который представляет отношение числа активных единиц продуктов на 1 мг белка или азота (так называемая удельная активность) в очищенном препарате к удельной активности исходного (неочищенного) продукта.

Обычно в препаратах активная субстанция не всегда находится в предельно очищенном состоянии, поскольку в производственных условиях при переработке больших объемов сырья и существующих методах очистки этого добиться пока не удается. Поэтому иммунобиологические препараты, полученные как традиционным методом, так и способом генетической инженерии, содержат, как правило, примеси питательных сред, на которых выращивали микроорганизмы, а также продукты метаболизма и неспецифические компоненты — продукты распада микробной клетки. К примесям относятся белки, полисахариды и их комплексы, нуклеиновые кислоты, соли и другие низкомолекулярные вещества. Они не только бесполезны для препаратов, но иногда вызывают нежелательные побочные реакции организма при применении препаратов (местные реакции, повышение температуры тела, аллергические проявления). В принципе необходимо стремиться к получению препаратов, содержащих активную субстанцию в предельно очищенном состоянии.

После получения активной субстанции из нее конструируют конечный препарат. В соответствии с назначением и способом применения он может быть в жидком или сухом состоянии (ра-

створ, суспензия, порошок) или в виде мазей. Препарат может быть предназначен для наружного, парентерального или энтерального, аэрозольного применения. В зависимости от этого препарат может быть стерильным и нестерильным.

Конечный препарат обычно содержит помимо примесей, от которых не удалось освободиться, необходимые добавки: консервант (антисептик для поддержания стерильности препарата при хранении), стабилизатор (обычно инертные белки, аминокислоты для повышения устойчивости лабильного активного начала при хранении), активаторы (например, адьюванты и иммуномодуляторы в вакцинах). В конечной композиции препарату придают желаемую лекарственную форму (жидкость, порошок, таблетки, мази) и фасуют (ампулы, флаконы, тубы), этикетировывают, снабжают инструкцией по применению.

Каждая серия препарата проходит стандартизацию в соответствии с технической документацией (технические условия, технологический регламент на изготовление) на производстве и в Государственном институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича или в Фармакологическом комитете в зависимости от назначения препарата.

10.4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ В BIOTEKHOLOGII

Генетическая инженерия — основа биотехнологии. Основным методом генетической инженерии по существу является генетическая рекомбинация, т. е. обмен генами между двумя хромосомами, которая приводит к возникновению клеток или организмов с двумя и более наследственными детерминантами (генами), по которым родители различались между собой. Метод рекомбинации заключается в следующем: выделение ДНК организмов или клеток из разных видов; получение гибридных молекул ДНК; введение рекомбинантных (гибридных) молекул в живые клетки; создание условий для экспрессии и секреции продуктов, кодируемых генами.

Гены, кодирующие те или иные структуры, выделяют (клонировать) из хромосом или плазмид, прицельно выщипывают из этих генетических образований при помощи ферментов рестрикции или синтезируют химически. Набор ферментов (известно более 500 рестриктаз), способных резать ДНК по определенным связям (сайтам), является важным инструментом генетической инженерии. В последнее время обнаружены ферменты, расщепляющие по определенным связям РНК наподобие рестрикции ДНК. Эти ферменты названы *рибозимами*. Их роль еще пока не выяснена.

При помощи химического синтеза могут быть получены сравнительно небольшие гены. Для этого вначале расшифровывают число и последовательность аминокислот в белковой молекуле вещества и по этим данным узнают очередность нуклеотидов в гене, поскольку каждой аминокислоте соответствуют три нуклеотида (кодон). При помощи синтезатора химическим путем создают ген, аналогичный природному гену.

Полученный целевой ген при помощи ферментов лигаз сшивают с другим геном, который используется в качестве вектора для встраивания гибридного гена в клетку. В качестве вектора могут служить плазмиды, бактериофаги, вирусы человека, животных и растений.

Число плазмид в бактериальной клетке может колебаться от одной до нескольких сотен, причем чем больше размеры имеет плаزمиды, тем меньше ее копий в клетке. Путем амплификации генов, т. е. увеличения числа копий определенного гена в клетке, можно резко повысить производство кодируемого клеткой вещества. Амплификацией удается добиться получения до 3000 копий плазмидных генов на клетку.

Бактериофаг как вектор используют аналогично. Целевой ген встраивают в геном фага, и он реплицируется вместе с генами вируса при размножении последнего в бактериальной клетке. Чаще всего используют фаг λ , который содержит ДНК, состоящую из 50 тыс. пар нуклеотидов. Преимущество фага λ перед плазмидами в том, что фаговый вектор позволяет клонировать большие фрагменты чужеродной ДНК.

В случае использования в качестве векторов вирусов человека, животных и растений чужеродный ген встраивают в ДНК вируса, и он реплицируется вместе с размножением последнего в клетке. Применяют в качестве вектора космиды, представляющие собой гибриды плазмиды с фагом. Космиды используют для клонирования больших (до 45 тыс. пар нуклеотидов) фрагментов ДНК эукариот.

Для РНК-содержащих вирусов передача генетической информации возможна с помощью ревертазы (обратной транскриптазы), передающей информацию о структуре белка от РНК к ДНК, которая является комплементарной иРНК.

На рис. 39 показана принципиальная схема получения рекомбинантных молекул ДНК и рекомбинантных бактерий. Экспрессируемый ген в виде рекомбинантной ДНК (плазмиды, фаг, космида, вирусная ДНК) встраивают в бактериальную или животную клетку, которая приобретает новое свойство — способность продуцировать не свойственное этой клетке вещество, кодируемое экспрессируемым геном. Для лучшего проникновения вектора через стенку бактерий иногда прибегают к воздействию на стенку (например, хлоридом кальция), чтобы увеличить ее проницаемость.

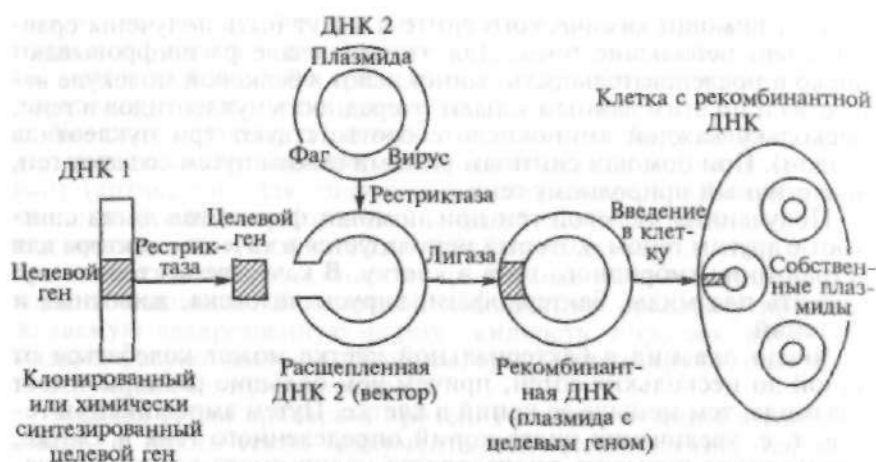


Рис. 39. Схема получения рекомбинантных ДНК и рекомбинантных штаммов микроорганизмов

В качестве реципиентов экспрессируемого гена чаще всего используют *E. coli*, *B. subtilis*, псевдомонады, дрожжи, вирусы. Реципиента подбирают не только с учетом возможности встройки чужеродного гена, но и уровня выраженности (экспрессии) синтеза вещества, кодируемого геном; возможности его секреции в окружающую среду; легкости и доступности массового культивирования; экологической безопасности. Некоторые штаммы рекомбинантных бактерий способны переключать на синтез чужеродного вещества, экспрессируемого геном, до 50 % своего синтетического потенциала. Такие штаммы — суперпродукты целевых продуктов — уже получены и применяются в биотехнологической промышленности; они носят название промышленных штаммов. В качестве примера можно привести штаммы — суперпродукты интерферона, интерлейкина, белков ВИЧ и др.

Некоторые штаммы микроорганизмов хорошо экспрессируют чужеродные гены, но плохо секретируют продукт в окружающую среду. В таких случаях приходится применять дезинтеграцию (разрушение) клетки с целью высвобождения из нее синтезированного продукта.

В некоторых случаях, несмотря на наличие экспрессии и секреции, продукт не удается получить, вернее собрать, из-за разрушения в процессе синтеза или после него протеазами и другими ингибиторами. Это прежде всего относится к низкомолекулярным пептидам.

С целью повышения уровня секреции целевого белка пользуются следующим приемом: к гену целевого белка присоединяют

ген белка, хорошо секретируемого клеткой реципиента. Образующийся в результате такой манипуляции химерный белок, хорошо секретируемый клеткой, собирают и от него отщепляют целевой белок. Возможно также к гену целевого белка присоединить ген-индикатор, т. е. ген, кодирующий легко узнаваемый белок, в результате чего получают химерный индикаторный белок, а из него — целевой белок. В качестве индикатора можно использовать, например галактозидазу.

10.5. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Из многих сотен препаратов, полученных методом генетической инженерии, в практику внедрена только часть: интерфероны, интерлейкины, фактор VIII, инсулин, гормон роста, тканевый активатор плазминогена, вакцина против гепатита В, моноклональные антитела для предупреждения реакций отторжения при пересадках почки, диагностические препараты для выявления ВИЧ и др. Это обстоятельство можно объяснить несколькими причинами. Во-первых, длительное время к этим препаратам и рекомбинантным штаммам микроорганизмов относились настороженно, опасаясь, что может произойти неуправляемое распространение экологически опасных рекомбинантных микроорганизмов. Однако в наши дни эти опасения практически сняты. Во-вторых, использование рекомбинантных штаммов-продуцентов предусматривает разработку сложных технологических процессов по получению и выделению целевых продуктов. На разработку технологии получения препаратов методом генетической инженерии, доклинические и клинические их испытания обычно затрачивается значительно больше средств, чем на получение штамма. В-третьих, при получении препаратов методом генетической инженерии всегда возникает вопрос об идентичности активной субстанции, вырабатываемой рекомбинантным штаммом-продуцентом, природному веществу, т. е. требуется проведение исследовательских работ, направленных на доказательство идентичности, а также иногда на решение дополнительных задач по приданию продукту природного характера.

Однако метод генетической инженерии относится к числу перспективнейших при получении многих белковых биологических веществ, представляющих ценность для медицины. В области создания биологически активных веществ медицинского назначения при помощи метода генетической инженерии исследования продолжают на следующем этапе — создаются препараты второго поколения, т. е. аналоги природных веществ, обладающих большей эффективностью действия. При определении целесообразности и экономичности методов генетической инженерии для

получения медицинских или других препаратов по сравнению с традиционными способами учитываются многие обстоятельства, в первую очередь доступность этого метода, экономичность его, качество получаемого препарата, новизна, безопасность проведения работ и др.

Препараты, разрабатываемые методами современной биотехнологии

Тип препарата	Применение
Антикоагулянты и тромболитики	Тканевый активатор пламиногена, факторы VIII и IX
Колонистимулирующие факторы (КСФ)	Соматомедин С, гранулоцитарный КСФ, макрофагальный КСФ
Иммуноцитокнины	Интерфероны, интерлейкины, фактор некроза опухолей, миелопептиды, пептиды вилочковой железы
Гормоны	Гормон роста, инсулин, эритропоэтин
Ферменты	Липазы, протеазы
Вакцины	Против ВИЧ-инфекции, гепатита В, малярии и др.
Диагностикумы	Для выявления ВИЧ-инфекции, гепатита В, сифилиса и др.
Рецепторы	T-4 лимфоцитов (белок CD-4) и др.
Моноклональные антитела (не для диагностических целей)	Для иммунотерапии опухолей, предупреждения реакций отторжения
Прочие	Триптофан, белок А, альбумин, поведенческие пептиды и др.

Метод генетической инженерии является единственным при получении препаратов, если природный микроорганизм или животные и растительные клетки не культивируются в промышленных условиях. Например, возбудитель сифилиса или малярийный плазмодий практически не растет на искусственных питательных средах. Поэтому для получения диагностических препаратов или вакцин прибегают к клонированию или синтезу генов протективных антигенов, их встраиванию в легко культивируемые бактерии. При выращивании этих рекомбинантных бактерий-реципиентов получают нужные антигены, на основе которых создают диагностический препарат или вакцину. Таким образом уже производится вакцина против гепатита В. Ген HBs-антигена вируса гепатита встроен в дрожжевую клетку; при выращивании дрожжей образуется HBs-антиген, из которого готовят вакцину.

Метод генетической инженерии предпочтительнее также в том случае, когда микроорганизм высокопатогенен и опасен при промышленном производстве. Например, для получения из ВИЧ диагностических препаратов и вакцин предпочитают не выращивать вирус в больших количествах, а необходимые антигены получают методом генетической инженерии. К настоящему вре-

мени практически все основные антигены ВИЧ получены путем выращивания рекомбинантных штаммов *E. coli* или дрожжей, способных продуцировать эти антигены. На основе рекомбинантных белков созданы диагностические препараты для обнаружения СПИДа.

Метод генетической инженерии используют в том случае, когда исходное сырье для получения препарата традиционным способом является дефицитным или дорогостоящим. Например, лейкоцитарный α -интерферон получают из лейкоцитов донорской крови человека. Из 1 л крови получают две-три дозы высококонцентрированного интерферона. На курс лечения онкологического больного требуются сотни доз препарата. Следовательно, массовое производство и применение лейкоцитарного интерферона из крови нереально. Производство лейкоцитарного интерферона методом генетической инженерии значительно экономичнее и не требует дефицитного сырья (крови). Препарат получают путем выращивания рекомбинантных штаммов бактерий (*E. coli*, псевдомонад), способных продуцировать интерферон в результате встройки им гена α -интерферона. Из 1 л культуры рекомбинантных бактерий получают 100...150 доз лейкоцитарного интерферона с активностью 10^6 МЕ.

Получение природного инсулина — гормона для лечения больных диабетом, основанное на извлечении его из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней, сдерживается дефицитом сырья, кроме того, гормон имеет животное происхождение. Разработанный генетической инженерией метод получения человеческого инсулина путем выращивания рекомбинантного штамма *E. coli* решил проблему обеспечения больных этим жизненно важным препаратом. Такая же ситуация наблюдается и в отношении гормона роста человека, получаемого из гипофиза умерших людей. Этот гормон необходим для лечения карликовости, быстрого заживления ран и т. д. Генетическая инженерия решила эту проблему: достаточно 1000 л культуры рекомбинантного штамма *E. coli*, чтобы получить требуемое количество гормона.

Контрольные вопросы и задания. 1. Что следует понимать под биотехнологией? 2. Чем объяснить предпочтительное использование микроорганизмов в биотехнологических технологиях? 3. Изложите схематично технологию получения продуктов микробного (клеточного) синтеза. 4. В чем сущность применения генетической инженерии в биотехнологии?

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Положение микроорганизмов в системе живого мира	13
Глава 2. Мир прокариот	19
2.1. Размеры микроорганизмов	19
2.2. Строение прокариотической клетки	20
2.2.1. Форма прокариот	20
Глава 3. Микроскопические мицелиальные грибы	25
Глава 4. Химический состав, структура и функции компонентов прокариотической клетки	29
4.1. Химический состав прокариотической клетки	29
4.2. Морфология бактерий	33
4.2.1. Клеточная стенка	34
4.2.2. Капсулы, слизистые слои, чехлы	46
4.2.3. Жгутики и механизмы движения	48
4.2.4. Мембраны	54
4.2.5. Цитоплазма и рибосомы	59
4.2.6. Генетический аппарат и репликация хромосомы	59
4.2.7. Рост и способы размножения	63
4.2.8. Внутрицитоплазматические включения	66
Глава 5. Общая характеристика конструктивного метаболизма прокариот	75
5.1. Взаимосвязь энергетического и конструктивного метаболизма	75
5.2. Потребности прокариот в питательных веществах	77
5.2.1. Источники углерода	77
5.2.2. Азот	78
5.2.3. Потребности в источниках серы и фосфора	79
5.2.4. Ионы металлов и факторы роста	80
5.3. Синтез прокариотами основных клеточных компонентов	80
5.3.1. Биосинтез углеводов, липидов и аминокислот	80
5.3.2. Биосинтез мононуклеотидов	82
Глава 6. Энергетический метаболизм прокариот	84
6.1. Энергетические ресурсы	84

6.2. Общая характеристика энергетических процессов	85
6.3. Первая универсальная форма химической энергии в клетке — АТФ	88
6.4. Вторая универсальная форма клеточной энергии — $\Delta\mu_{H^+}$	90
Глава 7. Экология микроорганизмов	95
7.1. Понятие об экологии микроорганизмов	95
7.2. Влияние факторов внешней среды на микроорганизмы	96
7.2.1. Влияние физических факторов	96
7.2.2. Молекулярный кислород	104
7.2.3. Влияние химических факторов	106
7.2.4. Бактериофаги	113
7.3. Микрофлора различных сред обитания и взаимоотношения микроорганизмов в микробиоценозах	114
7.3.1. Микрофлора почвы	115
7.3.2. Микрофлора кормов	116
7.3.3. Микробиоценозы водоемов	119
7.3.4. Микрофлора воздуха	121
7.3.5. Микрофлора молока	122
7.3.6. Микрофлора тела животных	124
7.4. Роль микроорганизмов в превращении веществ в природе	134
7.4.1. Круговорот азота	135
7.4.2. Круговорот углерода	136
7.4.3. Превращение микроорганизмами фосфора, железа и серы	138
Глава 8. Систематика прокариот. Группы прокариотических микроорганизмов	140
Глава 9. Основы учения об инфекции	146
9.1. Развитие учения об инфекции	146
9.2. Патогенность и вирулентность микроорганизмов	152
9.2.1. Факторы, обуславливающие патогенность и вирулентность	154
9.2.2. Условно-патогенные микроорганизмы	166
Глава 10. Основы биотехнологии	169
10.1. Что такое биотехнология, ее цели и задачи	169
10.2. Краткая история развития биотехнологии	172
10.3. Микроорганизмы, клетки и процессы, применяемые в биотехнологии	172
10.4. Генетическая инженерия и ее применение в биотехнологии	176
10.5. Биологические препараты, полученные методом генетической инженерии	179