

Hans G. Schlegel

**Allgemeine
Mikrobiologie**

6., überarbeitete Auflage
unter Mitarbeit von Karin Schmidt

Г. Шлегель
**ОБЩАЯ
МИКРОБИОЛОГИЯ**

Перевод с немецкого
Л. В. Алексеевой,
канд. биол. наук Г. А. Куреллы
и канд. мед. наук Н. Ю. Несытовой

под редакцией
чл.-корр. АН СССР Е. Н. Кондратьевой

1985
Georg Thieme Verlag Stuttgart New York



Москва «Мир» 1987

ББК 28.07
Ш68
УДК 576.80.85

Предисловие редактора перевода

Шлегель Г.
Ш68 **Общая микробиология: Пер. с нем.—М.: Мир, 1987.— 567 с., ил.**

Книга представляет собой перевод шестого издания известного учебника микробиологии, написанного автором из ФРГ; в нем четко, ясно и компактно изложены современные сведения об организации и жизнедеятельности микроорганизмов. Шестое издание значительно переработано и дополнено по сравнению со вторым, перевод которого был выпущен в 1972 году издательством «Мир».

Предназначена для микробиологов—научных сотрудников и работников микробиологической промышленности, преподавателей и студентов биологических факультетов.

Ш $\frac{2003000000-355}{041(01)-87}$ 142—87 г, ч 1.

ББК 28.07

Микробиология в настоящее время по праву может считаться одной из основных дисциплин биологии, поскольку без знания особенностей микроорганизмов нельзя понять всего многообразия жизни на Земле, условий ее появления и эволюции. Огромное значение имело и продолжает иметь исследование микроорганизмов для развития таких наук, как биохимия, молекулярная биология, генетика, биофизика, экология и ряд других.

Возникновение и быстрое развитие биотехнологии, приобретающей все большее значение в народном хозяйстве, базируется прежде всего на использовании микроорганизмов как продуцентов множества полезных веществ, как-то: кормового белка, многих ферментов, антибиотиков, стероидных препаратов, аминокислот, витаминов и других. Возможности микроорганизмов в этом отношении чрезвычайно велики. На использовании микроорганизмов основаны методы генетической инженерии, позволяющие создавать новые штаммы, обладающие полезными свойствами и образующие ряд важных веществ.

Большое значение имеет разработка способов рационального использования биохимической активности микроорганизмов для повышения плодородия почв, добычи полезных ископаемых, восполнения энергетических ресурсов и очистки окружающей среды от многих загрязняющих веществ.

Вместе с тем остается необходимым изыскание эффективных способов борьбы с некоторыми микроорганизмами, вызывающими заболевания человека, животных и растений, а также порчу промышленных изделий и нежелательные изменения в окружающей среде. Таким образом, круг проблем, требующих интенсивного и глубокого изучения свойств микроорганизмов, весьма широк и может быть решен лишь усилиями специалистов разного профиля, но хорошо знакомых также с биологией этих мельчайших живых существ.

Быстрое накопление знаний в разных областях микробиологии, как и во многих других науках, определяет потребность в постоянном обновлении учебных пособий для студентов, которым читаются соответствующие курсы.

За последние годы появилось значительное число руководств по микробиологии, где в той или иной степени отражены последние достижения этой науки. Одно из них—новое издание книги профессора Геттингенского университета (ФРГ) Г. Г. Шлегеля «Общая микробиология», которая впервые была опубликована в 1969 году и за прошедшее время

Редакция литературы по биологии

© 1976, 1985, Georg Thieme Verlag
© перевод на русский язык, «Мир», 1987

переиздавалась восемь раз. Одно из ее изданий было переведено на русский язык и опубликовано издательством «Мир» в 1972 году. Этот учебник оказался весьма полезным пособием для студентов-биологов университетов и ряда других вузов, в которых имеются курсы микробиологии.

Достоинства учебника Г. Г. Шлегеля состоят в том, что при кратком изложении основ микробиологии автор сумел показать все разнообразие и важность этой науки. Особенно большое внимание в учебнике уделено рассмотрению физиологии и процессов метаболизма разных групп бактерий, являющихся важнейшими объектами микробиологии.

По сравнению с прошлыми изданиями книга дополнена рядом новых данных, касающихся недавно открытых форм микроорганизмов (архебактерий и других), биохимии, молекулярной биологии, генетики и экологии разных микробов, а также их практического значения. Материал изложен четко, хорошо систематизирован и легко воспринимается. Этому способствует наличие большого числа рисунков и таблиц. По своему содержанию учебник близок к курсу общей микробиологии, читаемому для студентов-биологов в университетах. Но есть все основания полагать, что он будет также полезен для аспирантов, научных сотрудников и специалистов, работающих в разных областях микробиологической промышленности.

Е. Н. Кондратьева

Предисловие к 6-му изданию

В настоящем 6-м издании по-новому построено только несколько глав, так как для 5-го издания многие главы были написаны заново или расширены. Во всех главах учтены успехи сравнительной биохимии, физиологии и экологии микроорганизмов. Большинство изменений касается анаэробных бактерий, в частности архебактерий. Становится все более очевидным, что взаимодействие организмов в биосфере нельзя понять без детального знания физиологии бактерий; бактерии одни могли бы поддерживать круговорот веществ на нашей планете, тогда как эукариоты на это не способны.

Я снова должен выразить благодарность коллегам и студентам за профессиональную критику и многочисленные предложения. Ответы на анкеты издательства и благожелательные, конструктивные критические замечания оказались очень полезными. К сожалению, не было возможности учесть все предложения, существенно расширить отдельные главы или снабдить каждую главу заключением и перечнем вопросов для закрепления прочитанного. Это задача семинаров, проводимых параллельно с лекциями, и неспешного самостоятельного изучения материала. Последнее существенно облегчается тем, что книга снабжена обширным предметным указателем и списком учебников, монографий и обзорных статей.

Помимо коллег, упомянутых еще в предисловии к 1-му изданию, большую помощь мне оказали Б. Фридрих и М. Когут, а также Й. Р. Андресен и Б. Бовин. Много рисунков сделала К. Шмидт; без ее помощи в переработке и редактировании это новое издание не появилось бы. Ей же следует переадресовать благодарность читателей за то, что сохранена низкая стоимость книги. Выраженную мною еще в 1968 г. признательность издательству «Георг Тиме» и на сей раз в полной мере подтверждаю.

Мне хотелось бы еще поблагодарить мою семью и прежде всего жену, а также моих детей, которые, несмотря на то что я был так занят своей работой (или именно поэтому?), нашли себе хорошую дорогу в жизни.

Геттинген, октябрь 1984 г.

Х. Г. Шлегель

Предисловие к 1-му изданию

Микробиология занимается преимущественно изучением грибов, бактерий и вирусов. Различные представители этих групп по своему морфологическому и физиологическому многообразию не уступают объектам таких «классических» разделов биологии, как ботаника и зоология. Изучение микроорганизмов внесло за последние годы огромный вклад в решение важнейших проблем общей биологии. Микроорганизмы весьма удобны для работы; быстрый рост, высокая способность к адаптации и ряд других ценных свойств сделали их излюбленным объектом для биохимиков и генетиков.

В распоряжении изучающих микробиологию имеется ряд превосходных учебников, таких как «Общая микробиология» Стейниера с соавторами, «Жизнь бактерий» Тимана и «Микробиология» Дэвиса с соавторами (см. список литературы). Однако среди многочисленных руководств не было такого, где бы в сжатой форме были изложены основные сведения по общей микробиологии, необходимые не только микробиологам, но и лицам, изучающим ботанику, зоологию, фармакологию, сельское хозяйство, медицину, химию и физику. Настоящая книга рассчитана именно на этот широкий круг читателей. Мы поставили себе целью дать общий обзор по микробиологии наряду с некоторыми специальными сведениями в надежде пробудить интерес к дальнейшему изучению предмета. При этом мы исходили из того, что читатель уже обладает определенными знаниями в области биологии, например усвоил то, что сообщается в кратких руководствах по ботанике и зоологии, вышедших в той же серии изданий. Кроме того, мы стремились побудить читателя к обстоятельному изучению смежных дисциплин, в первую очередь общей биохимии. Важнейшие метаболические реакции представлены нами лишь в самом общем виде; достаточно подробно описаны только те метаболические процессы, которые типичны для микроорганизмов.

Для того чтобы полнее отразить основные взаимосвязи, мы сосредоточили главное внимание на физиологии бактерий. Понимание молекулярных взаимодействий делает биологию более простой и легче обзорной. Многочисленные внешние проявления жизни и биохимические процессы удается свести к неким общим причинам, к ограниченному числу элементарных структур и процессов, а также типов строения и метаболизма. В свою очередь знание этих последних позволяет установить определенные эвристические принципы, полезные и для описательного подхода. Таким образом, проникновение в глубину способствует и большей широте охвата изучаемых проблем.

Благодарности. За многообразную помощь, критику и советы, которые я получил со стороны моих сотрудников, я хочу здесь выразить особую признательность Д. Клаусу, У. Эберхардту, Г. Готтшальку и Н. Пфеннигу. Значительное участие в работе приняла д-р К. Шмидт. Без ее участия в составлении эскизов рисунков, в проработке текста и его редактировании своевременное завершение рукописи оказалось бы невозможным. Я благодарен Л. Шнелльбехеру за своевременное и компетентное выполнение рисунков и М. Велскоп — за перепечатку текста и составление предметного указателя.

Я признателен также всем коллегам, предоставившим в мое распоряжение неопубликованные фотографии или высококачественные фотокопии уже опубликованных иллюстраций. Бесплатное разрешение воспроизвести эти иллюстрации тоже должно быть упомянуто с благодарностью.

И наконец, следует отметить особую заслугу издательства «Георг Тиме», взявшего на себя труд издать серию весьма недорогих, хорошо оформленных кратких учебников по биологическим наукам.

Геттинген, ноябрь 1968 г.

Х. Г. Шлегель

1. Положение микроорганизмов в природе

1.1 Три царства: животные, растения и протисты

Различия во внешнем виде и в строении животных и растений, служившие вплоть до прошлого столетия основой классификации живых существ, видны с первого взгляда. Эти различия определяются принципиальной разницей в способе питания. **Животные** питаются готовыми органическими веществами (С-гетеротрофно), которые внутри их тела, в пищеварительном тракте, перевариваются и всасываются. В процессе эмбрионального развития животного пищеварительная полость образуется у него путем втягивания стенки зародыша на стадии гастрюляции: этот процесс должен обеспечить образование внутренних всасывающих поверхностей. Такой структурный принцип характерен для всего животного царства, от кишечнополостных (Hydrozoa; пример – гидра) до высших позвоночных.

Растения с их совершенно иным С-автотрофным способом питания устроены совсем иначе. Они синтезируют вещества, необходимые для построения тела, прямо из неорганических соединений, используя солнечный свет как источник энергии. Фотосинтетически активные клетки и ткани с поглощающими свет пигментами (хлорофиллами и каротиноидами) ориентированы у растений во внешнюю среду и образуют большие наружные поверхности. Другие важнейшие различия между животными и растениями касаются клеточных оболочек, способности к активному передвижению и способности синтезировать определенные вещества.

Царства животных и растений могли быть разграничены достаточно четко, до тех пор пока мало что было известно о микроорганизмах. Даже грибы имели столько общих с растениями признаков, что, несмотря на гетеротрофность, их можно было относить к растениям. Труднее было решить, к какому царству следует отнести бактерий, слизевиков и другие одноклеточные организмы. Для **третьего царства живых существ** было предложено собирательное название **протисты** (Геккель, 1866 г.).

Царство протистов охватывает организмы, отличающиеся от животных и растений слабой морфологической дифференцировкой, – это главным образом одноклеточные. По строению своих клеток протисты могут быть подразделены на две четко разграниченные группы. У **высших протистов** клетки сходны с животными и растительными клетками; это эукариоты. К ним относятся водоросли, грибы и простейшие.

К группе **низших протистов** принадлежат бактерии, в том числе цианобактерии (сине-зеленые водоросли); это прокариоты, которые по строению своих клеток существенно отличаются от всех других организмов. К бактериям относятся также риккетсии – облигатные внутриклеточные паразиты. Название «микроорганизмы» указывает лишь на малую величину всех этих существ, которые в действительности являются протистами. **Вирусы**, как неклеточные частицы, можно противопоставить всем организмам; они не способны размножаться самостоятельно, их репродукция может происходить только внутри живых клеток.

1.2 Прокариоты и эукариоты

Элементарной физической единицей живого является клетка; это наименьшая жизнеспособная единица. По своему химическому составу все живые существа очень сходны. Основные компоненты всякой клетки – это дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), рибонуклеиновые кислоты (РНК), белки, липиды и фосфолипиды. Изучение тонкого строения различных типов клеток позволило, однако, выявить заметные различия между бактериями и цианобактериями, с одной стороны, и животными и растениями (включая также их микроскопически малых представителей) – с другой. Различия между теми и другими настолько глубоки, что эти две группы организмов противопоставляются друг другу как прокариоты и эукариоты. Прокариот мы вправе рассматривать как реликтовые формы, сохранившиеся с самых ранних времен биологической эволюции, а появление эукариотических форм, возникших из прокариот, – как величайший скачок в истории жизни.

Эукариоты имеют истинное ядро. Оно содержит преобладающую часть генома эукариотической клетки. Геном в основном представлен набором хромосом, которые в ходе процесса, называемого митозом, удваиваются и распределяются между дочерними клетками. В хромосомах ДНК находится в связи с гистонами. В эукариотической клетке имеются и другие органеллы, содержащие ДНК, – митохондрии и (у растений) хлоропласты, но в этих органеллах находится лишь очень малая часть клеточного генома, которая представлена молекулами ДНК, замкнутыми в кольцо. Рибосомы в эукариотической клетке более крупные (80S), чем у прокариот.

Прокариоты не имеют окруженного мембраной ядра. ДНК в виде замкнутой в кольцо молекулы свободно располагается в цитоплазме. Эта «бактериальная хромосома» содержит всю необходимую для размножения клетки информацию. Кроме того, в прокариотической клетке могут содержаться очень небольшие кольцевые молекулы ДНК – плазмиды; без них, однако, клетка может обойтись. Прокариотическая клетка органелл не содержит; подразделение клетки на компартменты менее выражено, чем у эукариот. Рибосомы меньше (70S). У прокариот рибосомы, ферменты белкового синтеза и состав клеточной стенки имеют ряд особенностей, благодаря которым на клетку могут специфически

воздействовать многие антибиотики. О других различиях будет сказано позже (разд. 2.2).

Прокариоты морфологически относительно слабо дифференцированы, поэтому среди них можно различить лишь ограниченное число форм. В основном это либо сферические формы, либо прямые и изогнутые палочки. С таким внешним «единообразием» удивительно контрастирует чрезвычайное многообразие и пластичность метаболических процессов. В то время как животные и растения нуждаются в молекулярном кислороде, многие группы прокариот способны жить без доступа воздуха (в анаэробных условиях), получая необходимую для роста энергию в результате брожения или анаэробного дыхания. Другие группы прокариот обладают способностью использовать энергию света и строят нужные им вещества либо из органических соединений, либо из углекислоты (двуокиси углерода). Некоторые бактерии могут получать энергию путем окисления различных неорганических соединений или элементов. Среди бактерий широко распространена также способность к фиксации молекулярного азота.

Благодаря такой физиологической разносторонности и гибкости, а также высокой скорости синтетических процессов и роста, простому строению клеток и несложной структуре генетического аппарата прокариоты в последние десятилетия стали излюбленным объектом при изучении многих проблем общей биологии. Именно это обстоятельство (наряду с недостатком места) явилось причиной того, что в нашей книге главное место будет отведено биологии бактерий.

1.3 Участие в круговороте веществ

В соответствии со своей ролью и функцией в балансе природы организмы разделяются на три группы. Зеленые растения синтезируют органические вещества, используя энергию солнца и углекислоту, поэтому их называют **продуцентами**. Животные являются **потребителями (консументами)**; они расходуют значительную часть первичной биомассы для построения своего тела. Тела животных и растений в конце концов подвергаются разложению, при котором органические вещества превращаются в минеральные, неорганические соединения. Этот процесс, называемый **минерализацией**, осуществляют в первую очередь грибы и бактерии; в балансе природы они служат **деструкторами**. Таким образом, биоэлементы участвуют в циклических процессах. Здесь уместно коротко остановиться на биогеохимических круговоротах углерода, азота, фосфора и серы.

Круговорот углерода. В круговороте углерода микроорганизмы выполняют функцию, очень важную для поддержания жизни на Земле. Они обеспечивают минерализацию углерода, переведенного зелеными растениями в органические соединения, и тем самым поддерживают весьма неустойчивое равновесие (рис. 1.1). Атмосферный воздух содержит чуть больше 0,03% двуокиси углерода (12 мкМ/л). Фотосинтетиче-

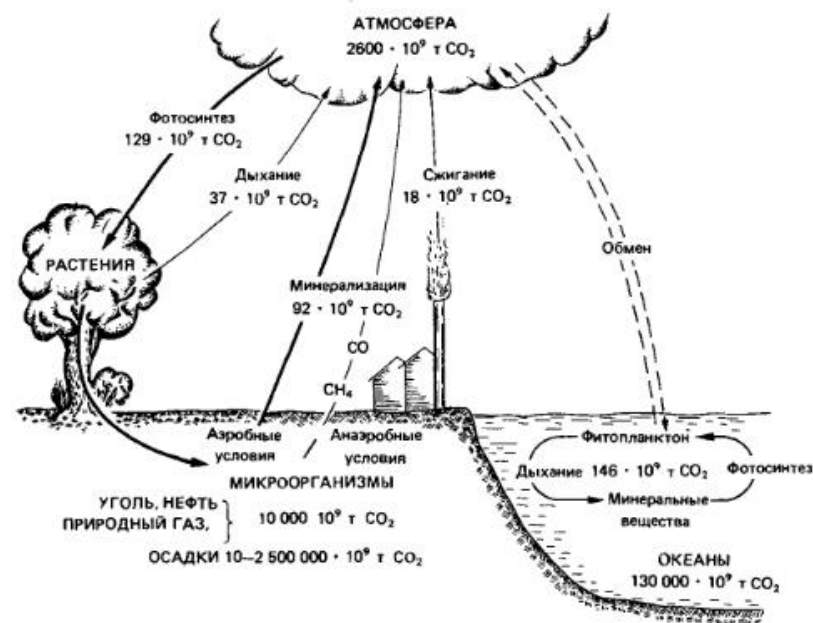


Рис. 1.1. Круговорот углерода в биосфере. Цифры около стрелок указывают годовой оборот CO_2 (фиксация, образование, обмен). Фотосинтетическая фиксация углекислоты зелеными растениями быстро истощила бы ее запасы в атмосфере, если бы органические соединения не разлагались микроорганизмами и не окислялись до CO_2 , что восполняет запас углекислоты в воздухе. Сжигание углеродсодержащего ископаемого топлива (нефти, природного газа, угля) приводит к постепенному росту содержания CO_2 в атмосфере.

ская же продуктивность зеленых растений так велика, что запас CO_2 в атмосфере был бы исчерпан примерно за 20 лет. Это относительно короткий срок в человеческих масштабах времени; ведь считается, что запасов энергии и угля на Земле хватит на срок от 1000 до 3000 лет. Даже если учесть запасы CO_2 в океанах, то этого газа хватило бы лишь примерно на 2000 лет.

Зеленым растениям пришлось бы вскоре прекратить фиксацию CO_2 , если бы низшие животные и микроорганизмы не обеспечивали возвращение этого газа в атмосферу в результате непрерывной **минерализации органического материала**. В общем балансе веществ на земном шаре почвенным бактериям и грибам принадлежит не меньшая роль, чем фотосинтезирующим зеленым растениям. Взаимозависимость всех живых существ на Земле находит наиболее яркое выражение в круговороте углерода.

Следует отметить еще одну особенность процесса минерализации: небольшая часть минерализованного углерода (1–1,5%) поступает в атмосферу не в виде CO_2 , а в форме метана. Этот газ образуется из орга-

нических веществ в местах, недоступных для кислорода воздуха (в почве тундр, на рисовых полях, в рубце жвачных), попадает затем в атмосферу и окисляется там ОН-радикалами через окись углерода (СО) до CO_2 . В процессе образования метана, так же как и других газов, встречающихся в следовых концентрациях (H_2 , СО, N_2O , NO_2), участвуют главным образом бактерии.

Моря на первый взгляд кажутся огромным резервом углекислоты. Однако следует учесть, что скорость обмена CO_2 атмосферы с CO_2 морей, где более 90% этого вещества находится в форме HCO_3^- , очень мала; за один год таким образом обменивается только десятая часть атмосферной двуокиси углерода. К тому же в газообмене моря с атмосферой участвует лишь тонкий поверхностный слой воды. Огромные количества CO_2 , находящиеся в океанах ниже слоя температурного скачка, выходят на поверхность лишь в немногих областях (Западная Африка, Чили) и обогащают там атмосферу (до 0,05%). Уже на протяжении многих лет содержание двуокиси углерода в воздухе неуклонно возрастает. С одной стороны, это следует отнести за счет сжигания нефти и угля; в 1976 г. на Земле было израсходовано (в основном сожжено) около $3,2 \cdot 10^9$ т нефти. С другой стороны, повышение концентрации CO_2 в атмосфере связано, вероятно, с уменьшением фотосинтетической фиксации углерода в результате сведения больших лесных массивов и деградации почвы. Следует подчеркнуть, что Мировой океан представляет собой мощную буферную систему, которая стремится поддерживать содержание CO_2 в атмосфере на определенном уровне.

В результате фотосинтетической фиксации CO_2 зелеными растениями образуются в первую очередь сахара и другие родственные им соединения. Основная масса фиксированного углерода как у древесных, так и у травянистых растений на время откладывается в форме полимерных углеводов. Примерно 60% двуокиси углерода, фиксируемой на суше, идет на образование древесины. Древесина состоит на 75% из полисахаридов (целлюлоза, гемицеллюлозы, крахмал, пектины и арабиногалактаны) и содержит лишь немногим больше 20% лигнина и лигнанов; белка в ней очень мало (1%). У злаков и других травянистых растений содержание полисахаридов еще выше.

Преобладание полисахаридов среди продуктов ассимиляции зеленых растений обуславливает большую роль сахаров в питании всех живых организмов, нуждающихся в органической пище. Глюкоза и другие сахара в форме полимеров — это количественно преобладающие субстраты для процессов минерализации в природе; в виде мономеров они служат предпочитаемыми питательными веществами для большинства гетеротрофных микроорганизмов.

Круговорот азота (рис. 1.2). Центральное место в круговороте азота занимает аммоний. Он является продуктом разложения белков и аминокислот, попадающих вместе с остатками животного и растительного происхождения в почву. В хорошо аэрируемых почвах аммоний подвергается нитрификации; бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* окис-

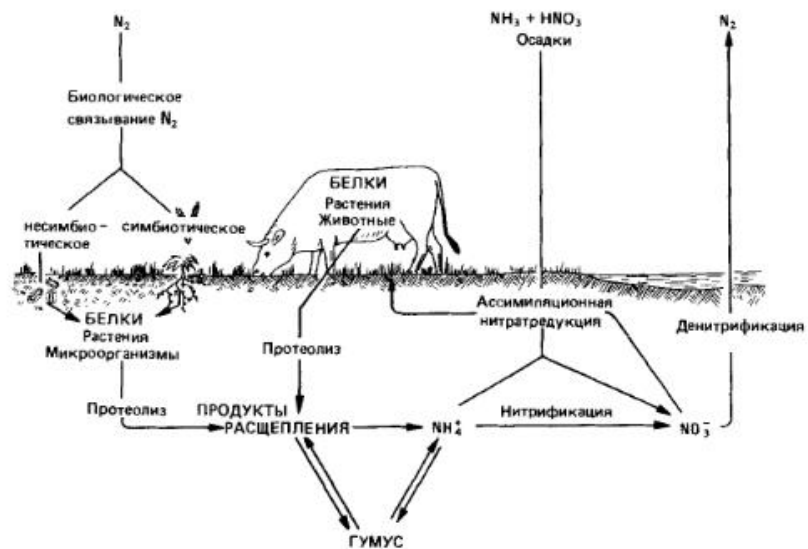


Рис. 1.2. Круговорот азота.

ляют его до нитрита и нитрата. В качестве источника азота растения могут использовать и ассимилировать как аммоний, так и нитрат. В отсутствие кислорода из нитрата образуется молекулярный азот (денитрификация). Бактерии, участвующие в этом процессе, используют при этом нитрат в качестве окислителя (акцептора водорода), т.е. «дышат» с помощью NO_3^- вместо O_2 ; в этом случае говорят о «нитратном дыхании». Денитрификация ведет к потере азота почвой. Наряду с этим бактерии способны и к фиксации молекулярного азота. Связывающие азот бактерии живут или свободно в почве (вне симбиоза), или в симбиозе с высшими растениями (симбиотические азотфиксаторы). Основную роль в круговороте азота наряду с животными и растениями играют бактерии.

Круговорот фосфора. В биосфере фосфор представлен почти исключительно в виде фосфатов. В живых организмах фосфорная кислота существует в форме эфиров. После отмирания клеток эти эфиры быстро разлагаются, что ведет к освобождению ионов фосфорной кислоты. Доступной для растений формой фосфора в почве служат свободные ионы ортофосфорной кислоты (H_3PO_4). Их концентрация часто очень низка; рост растений, как правило, лимитируется не общим недостатком фосфата, а образованием малорастворимых его соединений, таких как апатит и комплексы с тяжелыми металлами. Запасы фосфатов в месторождениях, пригодных для разработки, велики, и в обозримом будущем производство сельскохозяйственной продукции не будет ограничиваться недостатком фосфора; однако фосфат должен быть переведен в раство-

риму форму. Во многих местах фосфат из удобрений попадает в проточные водоемы и озера. Так как концентрация ионов железа, кальция и алюминия в водоемах невысока, фосфат остается в растворенной форме, что приводит к эвтрофикации водоемов, особенно благоприятной для развития азотфиксирующих цианобактерий. В почвах же из-за образования нерастворимых солей фосфаты чаще всего быстро становятся недоступными для усвоения.

Круговорот серы (рис. 1.3). В живых клетках сера представлена главным образом сульфгидрильными группами в серосодержащих аминокислотах (цистеин, метионин, гомоцистеин). В сухом веществе организмов доля серы составляет 1%. При анаэробном разложении органических веществ сульфгидрильные группы отщепляются *десульфурезами*; образование сероводорода при минерализации в анаэробных условиях называют также десульфурованием. Наибольшие количества встречающегося в природе сероводорода образуются, однако, при диссимиляционном восстановлении сульфатов, осуществляемом сульфатредуцирующими бактериями (см. разд. 9.2 и рис. 9.4).

Этот сероводород, образующийся в отсутствие молекулярного кислорода в осадках водоемов, может быть окислен анаэробными фототрофными бактериями (*Chromatiaceae*, разд. 12.1; 12.1.2) до серы и сульфата. Когда сероводород проникает в зоны, содержащие O_2 , он

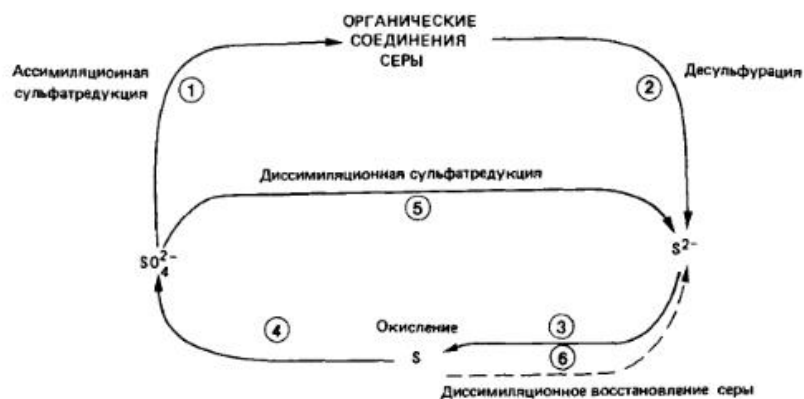


Рис. 1.3. Круговорот серы. 1. Сульфат восстанавливается до сульфида в ходе ассимиляционной сульфатредукции, и на какое-то время сера аккумулируется в живых организмах в органической связанной форме — в белках. 2. Сера освобождается в процессе разрушения белков и отщепления S^{2-} от аминокислот. 3 и 4. Сульфид в аэробных условиях может окисляться либо абиотически до серы или сульфата, либо с помощью бактерий (*Beggiatoa*, *Thiothrix*) через серу до сульфата. Свободная сера в аэробных условиях окисляется тиобациллами до сульфата (4). В анаэробных условиях сульфид может быть окислен фототрофными бактериями до серы (*Chlorobium*) или до сульфата (*Chromatium*). В анаэробных условиях возможно диссимиляционное восстановление сульфата до сульфида (сульфатредуцирующими бактериями — *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*) (5) и серы до сульфида (бактериями *Desulfuromonas*) (6).

Таблица 1.1. Распределение биоэлементов в морской воде (Kalle K., "Das Meerwasser als Mineralstoffquelle der Pflanzen." Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. IV. Springer, Berlin, 1958, с сокращениями)

Элемент	Содержание в сухом веществе организмов (N), г/100 г	Содержание в морской воде (A), г/м ³	Отношение A/N
Калий	1	390	390
Углерод	30	28	~1
Кремний	0,5	0,5	1
Азот	5,0	0,3	0,06
Фосфор	0,6	0,03	0,05
Сера	1	900	900
Железо	1	0,05	0,05
Ванадий	0,003	0,0003	0,1

окисляется либо абиотическим образом, либо аэробными серобактериями до сульфата (разд. 11.2). Сера, необходимую для синтеза серосодержащих аминокислот, растения и часть микроорганизмов получают путем ассимиляционной сульфатредукции; животные же получают восстановленные соединения серы с пищей.

Фосфор и азот как факторы, лимитирующие продукцию биомассы. Элементами, которые ограничивают рост растений и тем самым продукцию биомассы, являются фосфор и азот. Они играют такую роль и на суше, и в океанах. На этот счет имеются точные данные для морской воды. Основываясь на данных табл. 1.1, можно рассчитать, сколько биомассы может быть создано (в граммах сухого вещества) из элементов, содержащихся в одном кубометре морской воды. Из 28 г углерода (C) может образоваться 60–100 г биомассы, из 0,3 г азота (N) — 6 г, а из 0,03 г фосфора (P) — только 5 г. Отсюда следует, что продукцию биомассы в конечном счете лимитируют фосфаты. Таким образом, в морской воде даже азотфиксирующие организмы — цианобактерии — не имеют селективного преимущества перед другими.

1.4 Микроорганизмы на службе человека

Несведущий в микробиологии видит практическое значение микроорганизмов в первую очередь во вреде, который они причиняют человеку, животным и растениям. Этими болезнетворными (патогенными) микроорганизмами и их специфическими особенностями занимаются такие науки, как медицинская и ветеринарная микробиология, а также фитопатология. Хотя микроорганизмы и в других сферах природы, и в промышленности выступают иногда в роли **вредителей**, их роль как **полезных** организмов существенно преобладает. Они уже давно завоевали себе прочное место в домашнем хозяйстве, а в промышленности они совершенно необходимы. Их используют в самых различных отрас-

лях – от первичной переработки сельскохозяйственных продуктов до катализа сложнейших этапов химических синтезов.

Классические микробиологические производства. На примере пивоварения и виноделия с использованием дрожжей, выпечки хлеба и приготовления молочных продуктов с помощью молочнокислых бактерий, а также получения пищевого уксуса при участии уксуснокислых бактерий становится очевидным, что микроорганизмы относятся к старейшим культурным «растениям». В Японии и Индонезии соевые бобы издавна перерабатываются с помощью мицелиальных грибов, дрожжей и молочнокислых бактерий. Если не считать получения этанола, в промышленном производстве индивидуальных веществ микроорганизмы начали использоваться лишь в последние шестьдесят лет. Уже в период первой мировой войны с помощью управляемого дрожжевого брожения получали глицерин. Молочная и лимонная кислоты, в больших количествах необходимые для пищевой промышленности, производятся с помощью молочнокислых бактерий и гриба *Aspergillus niger* соответственно. Из дешевых, богатых углеводами отходов путем брожения, осуществляемого клостридиями и бациллами, можно получать ацетон, бутанол, 2-пропанол, бутандиол и другие важные химические соединения.

Производство антибиотиков. С появлением антибиотиков наступила новая эпоха в медицине и фармацевтической промышленности. Благодаря открытию пенициллина и других продуктов метаболизма грибов, актиномицетов и иных микроорганизмов человечество приобрело высокоэффективное оружие для борьбы с бактериальными инфекциями. Успешно продолжают поиски новых антибиотиков. Теоретически перспективным кажется и путь применения антибиотиков для борьбы с вирусными болезнями и с опухолями вирусного происхождения.

Новые микробные производства. Классические виды брожения дополняются новыми применениями микробов в химических производствах. Из грибов получают каротиноиды и стероиды. Когда выяснилось, что *Corynebacterium glutamicum* из сахара и соли аммония с большим выходом синтезирует глутаминовую кислоту, были получены мутанты и разработаны методы, с помощью которых можно в больших масштабах производить многие аминокислоты, нуклеотиды и реактивы для биохимических исследований. Микроорганизмы используются химиками в качестве катализаторов для осуществления некоторых этапов в длинной цепи реакций синтеза; микробиологические процессы по своей химической специфичности и по выходу продукта превосходят химические реакции; ферменты, применяемые в промышленности, – амилазы для гидролиза крахмала, протеиназы для обработки кож, пектиназы для осветления фруктовых соков и другие – получают из культур микроорганизмов.

Монопольное положение микроорганизмов. Следует отметить, что некоторые виды сырья, доступные в особенно больших количествах, такие как нефть, природный газ или целлюлоза, могут использоваться ми-

кроорганизмами и перерабатываться ими в клеточный материал (биомассу) или в промежуточные продукты, выделяемые клетками. Микроорганизмы, таким образом, незаменимы при «облагораживании» этих необычных видов сырья для биотехнологических процессов; освоение такого сырья биологическими технологиями только начато.

Современные достижения геной инженерии. Изучение механизмов передачи генов у бактерий и участия в этом процессе внехромосомных элементов открыло возможность включения чужеродной ДНК в бактериальные клетки. Генетические манипуляции позволяют вносить небольшие отрезки носителей генетической информации высших организмов, например человека, в бактерию и заставлять ее синтезировать соответствующие белки. Вполне осуществимо производство гормонов, антигенов, антител и других белков с помощью бактерий. Делаются также попытки передать растениям способность к азотфиксации и лечить болезни, связанные с биохимическими дефектами.

Непосредственная применимость основополагающих научных знаний. Попытка перечислить в этом разделе все виды технологии и продукты промышленной микробиологии, а также иные, пока лишь предполагаемые, области ее применения завела бы нас слишком далеко. Связь между фундаментальными исследованиями и практикой в микробиологии, как и во всех естественных науках, очень тесна: «Нет прикладных наук... но каждая наука имеет много практических приложений» (Л. Пастер) [“Il n’y a pas des sciences appliquées... Mais il y a des applications de la science” (Pasteur)].

1.5 Общие свойства микроорганизмов

Признак, получивший отражение в самом названии «микроорганизмы» – это **малая величина особи**. Она не только послужила причиной отделения этих организмов от животных и растений: с нею существенно связаны также особенности морфологии микробов, активность и пластичность их метаболизма и распространение их в природе, а также удобство обращения с ними в лаборатории.

Размеры особи и соотношение между поверхностью и объемом. Диаметр большинства бактерий не превышает тысячной доли миллиметра. Эта величина – 1 микрометр (микрон), или 10^{-3} мм, – и стала «аршином» микробиолога. Данные о тонкой структуре клетки приводятся в нанометрах: $1 \text{ нм} = 10^{-3} \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ мм}$. Размеры мелких цианобактерий, дрожжей и простейших находятся в пределах 10 мкм. У этих столь малых организмов соотношение между поверхностью и объемом очень велико. Если куб с длиной граней 1 см (объемом 1 см^3) разбить на кубики с длиной граней 1 мкм, мы получим 10^{12} кубиков объемом по 1 мкм^3 каждый. Суммарная поверхность этих кубиков в 10 000 раз больше, чем поверхность исходного куба. Объем 1 мкм^3 характерен для средней бактериальной клетки.

Большое отношение поверхности к объему приводит к интенсивнейшему взаимодействию с внешней средой; с этим связан очень быстрый

Таблица 1.2. Интенсивность дыхания микроорганизмов и тканей (Q_{O_2} , мкм O_2 на 1 мг сухого вещества в 1 ч) и время генерации бактерий (время удвоения) при температурах, оптимальных для их роста

Биологический материал	Температура, °C	Q_{O_2}	Организм	Температура, °C	Время генерации, мин
<i>Azotobacter</i>	28	2000	<i>Bacillus megaterium</i>	40	22
<i>Acetobacter</i>	30	1800	<i>B. subtilis</i>	40	26
<i>Pseudomonas</i>	30	1200	<i>Escherichia coli</i>	40	21
Пекарские дрожжи	28	110	<i>B. stearothermophilus</i>	60	11
Почки и печень	37	10–20	<i>B. megaterium</i>	70	13
Корни, листья	20	0,5–4	<i>B. coagulans</i>	70	14
			<i>B. circulans</i>	70	14

обмен веществами между средой и клеткой многих микроорганизмов. Правило Рубнера (1893) гласит, что энергетический обмен животного в покое пропорционален не массе, а поверхности его тела. Если это правило, в соответствии с его смыслом, распространить на отдельные ткани и малые клетки, то следует ожидать, что уровни метаболической активности будут различаться на несколько порядков. Как видно из табл. 1.2, интенсивность метаболизма, измеренная по потреблению O_2 , действительно зависит от размеров тканей и клеток. Соответственно высоки и скорости прироста микроорганизмов. Тому, кто размышляет о проблемах обеспечения пищей растущего населения Земли, будет интересно узнать, что в организме одного быка весом 500 кг за 24 ч образуется примерно 0,5 кг белка; за это же время 500 кг дрожжей могут синтезировать более 50000 кг белка.

Пластичность метаболизма. У высших растений и животных изменения обмена веществ относительно жестко ограничены имеющимся набором ферментов; в процессе индивидуального развития состав ферментов у них, конечно, меняется, однако при перемене условий внешней среды такие изменения весьма незначительны. Микроорганизмы отличаются несравнимо большей гибкостью. Для бактерий высокая способность к адаптации (приспособлению) совершенно необходима. Это определяется их малыми размерами. В клетке микрококка найдется место только для нескольких сотен тысяч белковых молекул. Поэтому ненужные в данное время ферменты не могут содержаться про запас. Некоторые ферменты, служащие для переработки питательных веществ, синтезируются только тогда, когда соответствующее вещество появляется вблизи клетки. Такие индуцибельные ферменты могут составлять до 10% общего белка, содержащегося в клетке. Таким образом, клеточные регуляторные механизмы у микробов играют существенно большую роль и проявляются более отчетливо, чем у других живых существ.

Распространение микроорганизмов. Малые размеры имеют значение и для экологии. Многие растения и животные, ныне широко распространенные благодаря человеку, встречались раньше лишь на отдельных континентах. В отличие от этого бактерии (включая цианобактерий) вездесущи: их можно найти в арктических областях, в воде и в высоких слоях атмосферы. Видовой состав их во всех местообитаниях в широких пределах сходен с их видовым составом в почве. Благодаря своему малому весу микроорганизмы легко распространяются с воздушными потоками. В естественных условиях ни одно местообитание, ни один субстрат не нуждается в специальном заражении каким-либо микробом. Этим обстоятельством пользуются для получения **накопительных культур**. Как правило, достаточно одного грамма садовой почвы, чтобы найти вид бактерий, способный расти за счет любого природного вещества. Микроорганизмы существуют повсюду; среда определяет лишь то, какие формы будут в данном месте активно размножаться. Создавая в пробирке соответствующие селективные условия, можно из небольшого количества земли или ила, а в особых случаях и из других материалов получать накопительные культуры, а из них и чистые культуры большинства известных микроорганизмов.

Количественные работы и успехи генетических исследований. Методы, с помощью которых можно выращивать в лаборатории микроорганизмы, разработали О. Брефельд, Р. Кох и его школа в прошлом веке. Введение в практику прозрачных питательных сред, уплотненных желатиной или агаром, позволило изолировать отдельные клетки, следить за их ростом в колонии и получать чистые культуры. Разработка стандартных методов стерилизации и приготовления питательных сред привела к быстрому развитию медицинской микробиологии. Хотя еще Кох описал количественные методы, их преимущества при работе с микроорганизмами были поняты только в последние 50 лет. Малые размеры микроорганизмов позволяют получать в одной пробирке или чашке Петри и исследовать популяции, состоящие из 10^8 – 10^{10} отдельных клеток, и благодаря этому выявлять такие редкие события, как мутация или передача приобретенного признака, не нуждаясь в сложных вспомогательных средствах и довольствуясь малым пространством. Огромные успехи биохимических и генетических исследований не в последнюю очередь достигнуты благодаря легкости обращения с бактериями.

Первые сведения об общей организации и тонкой структуре клетки были получены с помощью **оптических методов**. По мере совершенствования оптических приборов и улучшения техники микроскопирования росли и наши знания о микроморфологии клетки и ее отдельных компонентов. Дальнейшее развитие световой микроскопии, а также ультрафиолетовой и электронной микроскопии позволило существенно повысить разрешающую способность оптических приборов; темнопольная и фазово-контрастная микроскопия облегчила наблюдение живой клетки. Несомненно, и поныне микроскопия, особенно электронная, в сочетании со сложной предварительной обработкой биологического материала остается важнейшим методом исследования. Для получения дополнительных сведений о молекулярном уровне приходится прибегать к косвенным **физическим и химическим методам**, с помощью которых стало возможным выделять и исследовать отдельные клеточные компоненты.

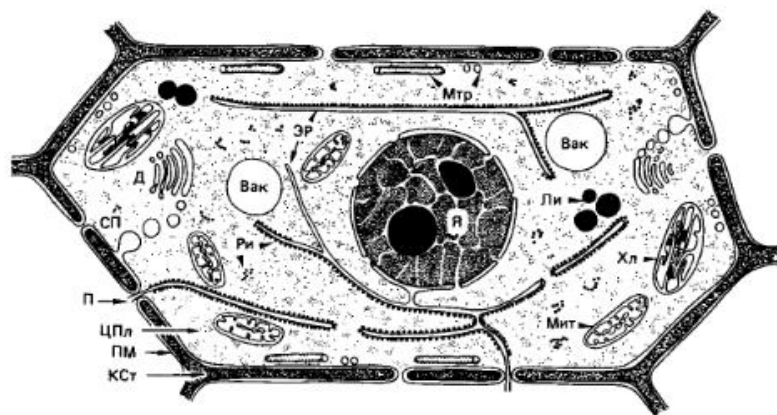


Рис. 2.1. Комбинированная схема строения эукариотической (растительной) клетки (по Зитте). *Вак* – вакуоли; *Д* – диктиосомы; *КСт* – клеточная стенка; *Ли* – липидные капельки; *Мит* – митохондрии; *Мтр* – микротрубочки; *П* – поры с плазмодесмами; *ПМ* – плазматическая мембрана; *СП* – секреторные пузырьки (экзоцитоз); *Хл* – хлоропласты; *ЦПл* – цитоплазма; *Я* – ядро.

Из разрушенных клеток (гомогенатов) методом дифференциального центрифугирования были выделены отдельные органеллы и фракции, что позволило изучать их биохимическими методами. Благодаря комбинации оптических и биохимических методов удалось быстро выяснить структуру и функции органелл и иных составных частей клетки. В результате этих исследований было установлено, что эукариоты и прокариоты по многим особенностям отличаются друг от друга.

Всякая клетка состоит из цитоплазмы и ядерного материала, снаружи ее ограничивает плазматическая мембрана. Этот *протопласт* может быть окружен еще клеточной стенкой, выполняющей в основном механические функции; стенка имеется у растительных клеток и у клеток большинства бактерий.

Мы кратко рассмотрим основные особенности эукариотических и прокариотических клеток (эуцитов и протоцитов). Типичным представителем эуцитов может служить эмбриональная растительная клетка (рис. 2.1).

2.1 Эукариотическая клетка (эуцит)

Клеточное ядро. Структура ядра и способ его деления – важнейшие и самые характерные признаки, отличающие эукариотическую клетку (рис. 2.2) от прокариотической. Ядро (интерфазное) окружено **ядерной оболочкой** – двуслойной перфорированной мембраной. ДНК, несущая генетическую информацию, распределена между отдельными субъединицами – **хромосомами**, которые становятся видимыми только во время деления ядра. Ядро делится путем **митоза** (рис. 2.2); митоз обеспечивает 1) идентичную редупликацию генетического материала (что видимым образом проявляется в продольном расщеплении хромосом и удвоении их числа) и 2) передачу полного набора хромосом каждому из дочерних ядер. Как происходит удвоение хромосом, еще не вполне выяснено. Распределение хромосом может быть прослежено с помощью светового



Рис. 2.2. Схема митотического деления диплоидной клетки. Ядро содержит по две хромосомы каждого вида, полученные от родителей (на схеме – красные и черные). В результате митоза хромосомы распределяются поровну между обеими дочерними клетками. **А.** В профазе становятся видимыми уже продольно расщепившиеся хромосомы; ядерная оболочка исчезает. **Б.** В метафазе хромосомы располагаются в экваториальной плоскости. **В.** В анафазе половинки расщепившихся хромосом оттягиваются нитями веретена к противоположным полюсам. **Г.** В телофазе дочерние хромосомы, вновь продольно расщепившиеся, окружаются ядерной мембраной, после чего ядро переходит в интерфазное состояние.

микроскопа и поэтому известно уже давно. В то время как интерфазное ядро в световом микроскопе кажется лишенным какой-либо четкой структуры, во время его деления хромосомы укорачиваются и становятся видимыми. Затем они располагаются в одной плоскости, образуя *экваториальную пластинку*. В результате сокращения нитей веретена половинки продольно расщепившихся хромосом расходятся; веретено исчезает, хромосомы становятся невидимыми и дочерние ядра окружаются снова ядерными оболочками.

У всех высших растений и животных в процессе полового размножения происходит смена ядерных фаз. При оплодотворении половые клетки (гаметы) и их ядра сливаются, образуя *зиготу*. Отцовское и материнское ядра вносят при оплодотворении одинаковое число хромосом (n); таким образом, ядро зиготы содержит двойной хромосомный набор ($2n$). Иными словами, гаметы — **гаплоидные** клетки (т. е. клетки с одним набором хромосом), а соматические клетки — **диплоидные** (с двумя наборами). Поэтому при образовании гамет следующего поколения число хромосом в клетке должно уменьшиться вдвое ($2n/2 = n$). Совокупность процессов, приводящих к уменьшению числа хромосом, называют **мейозом** или **редукционным делением** (рис. 2.3). Мейоз — важнейший процесс у организмов, размножающихся половым путем: он приводит к двум результатам: 1) к перекомбинированию отцовских и материнских наследственных факторов (генов) и 2) к уменьшению числа хромосом. Мейоз начинается с конъюгации хромосом — каждая хромосома соединяется с соответствующей (гомологичной) хромосомой, происходящей от другого родителя. Во время конъюгации путем разрыва и перекрестного воссоединения (кроссинговера) может происходить обмен фрагментами одинаковой длины между гомологичными хромосомами. Затем следует двукратное разделение спаренных расщепившихся хромосом, и в результате образуются четыре клетки, каждая из которых имеет гаплоидное ядро. Таким образом, в процессе мейоза не только происходит «перетасовка» хромосом материнского и отцовского происхождения, но может произойти и обмен сегментами между гомологичными хромосомами. Оба процесса приводят к новым сочетаниям генов (к их рекомбинации).

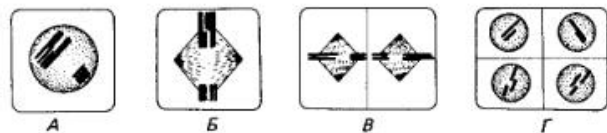


Рис. 2.3. Схема мейоза. Мейоз приводит к перекомбинированию отцовских и материнских генов и к уменьшению вдвое числа хромосом. Сначала происходит конъюгация гомологичных хромосом (А), и гомологи обмениваются участками (кроссинговер); в результате двукратного образования веретен (Б и В) хромосомы расходятся; при этом расходятся также и гомологичные хромосомы (В); в результате получаются четыре клетки с гаплоидными ядрами (Г).

У многих низших растений, включая водоросли, а также у простейших редукция числа хромосом происходит сразу после образования зиготы, так что организм оказывается гаплоидным. У растений с гетерофазной (антитетической) сменой поколений (мхов, папоротников) гаплоидные поколения чередуются с диплоидными.

Хромосомы эукариот состоят из нитей ДНК, с которыми связаны многочисленные белки. Часть этих белков составляют гистоны — основные белки. ДНК и гистоны, по-видимому, ассоциированы друг с другом весьма упорядоченным образом и образуют нуклеосомы — структурные субъединицы хромосом.

В ядре на хромосомной ДНК образуется мРНК. Через поры в ядерной мембране она транспортируется в цитоплазму. В интерфазном ядре можно видеть ядрышко; оно содержит ядрышковую ДНК, в которой заключена информация для построения рибосомной РНК и, вероятно, транспортной РНК. Обе эти РНК синтезируются в ядрышке и тоже переходят в цитоплазму. В эмбриональных клетках и в яйцеклетках содержится по несколько или помногу ядрышек.

В эукариотической клетке ядро — важнейший, но не единственный носитель генетической информации. Часть такой информации содержится в ДНК митохондрий и хлоропластов.

Цитоплазма. Протопласт снаружи окружен плазматической мембраной. Для эукариотической клетки характерно выраженное подразделение цитоплазмы на множество обособленных пространств. Эта *компартиментализация* отчасти создается в результате впячивания плазматической мембраны с образованием цистерн и пузырьков; однако помимо этого в цитоплазме эуцитов содержатся митохондрии и (у растений) хлоропласты, которые со всех сторон окружены мембранами.

Из впячиваний плазматической мембраны образуется эндоплазматический ретикулум (ЭР). Часть ЭР образует наружную ядерную мембрану и, таким образом, окружает ядро; в ядерной оболочке имеются поры, которые обеспечивают беспрепятственный транспорт нуклеиновых кислот, белков и метаболитов между ядерным пространством и цитоплазмой. Часть мембран усеяна мельчайшими гранулами — рибосомами; это так называемый «шероховатый», или гранулярный, ЭР. На рибосомах осуществляется синтез белков. Свободно взвешенные в цитоплазме или прилегающие к ЭР рибосомы относятся к типу 80S.

Особой мембранной органеллой животных клеток является аппарат Гольджи. Сходные органеллы растительных клеток называют диктиосомами. Они состоят из пакетов уплощенных мембранных пузырьков, так называемых цистерн. Аппарат Гольджи и диктиосомы обеспечивают секрецию различных продуктов, главным образом ферментов. Ферменты синтезируются на цистернах и накапливаются в них. Со временем такой пузырек отделяется, перемещается к плазматической мембране, сливается с ней и изливает при этом свое содержимое наружу. Этот процесс получил название экзоцитоза.

Митохондрии и хлоропласты. В эукариотических клетках есть еще два вида органелл, окруженных мембранами, — митохондрии и хлоро-

пласты. Митохондрии осуществляют дыхание; эти образования изменчивой формы, богатые липидами, имеют две мембраны – наружную и сильно складчатую внутреннюю (с кристами или трубочками). Внутренняя мембрана содержит компоненты электрон-транспортной цепи и *АТР-синтазу*. В клетках водорослей и высших растений наряду с митохондриями имеются также хлоропласты. Внутренние мембраны хлоропластов (тилакоиды) содержат фотосинтетические пигменты и компоненты фотосинтетического транспорта электронов.

Эндоцитоз. Для эукариотической клетки характерна способность поглощать пищу в виде растворенных веществ или оформленных твердых частиц. Общеизвестным примером поглощения твердых частиц служит фагоцитоз – захватывание их лейкоцитами крови или амебами. Если речь идет о поглощении жидких питательных веществ, говорят о пиноцитозе. Оба способа поглощения внеклеточного материала объединяют под названием эндоцитоза.

Способность эукариот захватывать оформленные твердые частички, в том числе и живые клетки, имеет фундаментальное биологическое значение. В эндоцитозе можно усмотреть предпосылки для возникновения эндосимбиоза и его механизм. Обычно твердые частички, поглощенные путем фагоцитоза амебой, перевариваются ею и полностью лизируются. В ряде случаев, однако, результатом может быть внутриклеточный симбиоз. Наиболее известный пример такого эндосимбиоза – ассоциация клеток бобовых растений с бактериями рода *Rhizobium* в корневых клубеньках (разд. 13.1). Подобного рода эндосимбионты широко распространены у эукариот (разд. 17.2.1). Способность эукариотических клеток приобретать эндосимбионтов говорит в пользу теории о симбиотическом происхождении хлоропластов и митохондрий. Прокариоты к эндоцитозу неспособны.

Эндосимбиотическая гипотеза. Клеточные органеллы эукариот имеют много фундаментальных общих черт с прокариотическими клетками. Они содержат кольцевые молекулы ДНК, их рибосомы относятся к типу 70S, а мембраны содержат компоненты электрон-транспортной цепи (флавины, хиноны, Fe-S-содержащие белки, цитохромы) и выполняют функцию дыхательного или фотосинтетического преобразования энергии. Согласно симбиотической гипотезе, митохондрии происходят от бесцветных аэробных бактерий, а хлоропласты – от цианобактерий, сделавшихся эндосимбионтами каких-то примитивных эукариотических клеток. В дальнейшем должна была произойти очень большая специализация; функция регенерации АТР была передана клеточным органеллам. Наружная мембрана эукариотической клетки не содержит компонентов электрон-транспортной цепи. С другой стороны, клеточные органеллы тоже не самостоятельны; они, правда, обладают собственными молекулами ДНК, однако значительная часть информации, необходимой для синтеза их белков, находится в клеточном ядре. Примером может служить *рибулозобисфосфат-карбоксилаза* – ключевой фермент автотрофной фиксации CO_2 у зеленых растений. Она состоит из 8 боль-

ших и 8 малых субъединиц. Информация для построения больших субъединиц содержится в ДНК самих хлоропластов, а для синтеза малых – в ядре. По этой причине невозможно обеспечить развитие органелл вне клетки, так что гипотеза об эндосимбиозе недоступна для прямой проверки.

Двигательные органеллы. У всех эукариотических клеток, имеющих жгутики или реснички (у простейших, водорослей, сперматозоидов и клеток мерцательного эпителия), строение их одинаково. На поперечном срезе видно, что на периферии жгутика располагаются девять двойных нитей, а в центре – две одиночные нити (структура «9 + 2»). Снаружи вся эта система одета плазматической мембраной. Основание жгутика закреплено в наружном слое цитоплазмы при помощи базального тельца, или блефаропласта. Блефаропласт представляет собой производное самовоспроизводящейся органеллы (центриоли).

2.2 Прокариотическая клетка (протоцит)

Структуру и некоторые функции прокариотических клеток мы рассмотрим более подробно. Прежде чем перейти к деталям, отметим основные признаки, отличающие прокариотическую клетку от эукариотической. Как уже было отмечено, клетки прокариот очень малы. Подавляющее большинство бактерий имеет форму палочек не более 1 мкм толщиной и 5 мкм длиной. Многие псевдомонады имеют ширину 0,4–0,7 мкм и длину 2–3 мкм. Диаметр микрококков составляет всего лишь 0,5 мкм. Среди бактерий очень немного «гигантов» (*Chromatium okenii*, *Thiospirillum jenense*, *Achromatium* и др.), и все такие формы растут сравнительно медленно.

Компартментализация клетки значительно менее выражена, чем у эукариотических клеток (рис. 2.4). ДНК не окружена ядерной мембраной, а органеллы типа митохондрий и хлоропластов отсутствуют. Область ядра, видимая на электронной микрофотографии ультратонкого среза клетки в виде сетчатой структуры из тонких нитей, непосредственно граничит с заполненной рибосомами цитоплазмой (рис. 2.5). У многих бактерий впячивание плазматической мембраны образуют определенные структуры во внутреннем пространстве протопласта (внутриклеточные мембраны). С плазматической мембраной связаны процессы дыхания или фотосинтеза, доставляющие клетке энергию, т.е. функции, за которые в эукариотических клетках ответственны мембраны митохондрий и хлоропластов.

Рибосомы прокариот меньше, чем цитоплазматические рибосомы эукариот; они относятся к типу 70S.

Вся генетическая информация протоцита содержится в одной-единственной нити ДНК – «бактериальной хромосоме». Эта молекула ДНК у всех до сих пор исследованных бактерий имеет вид кольцевой нити; длина ее контура составляет от 0,25 до 3 мм. Гистонов нет. У многих бактерий была, кроме того, обнаружена внехромосомная ДНК; она со-

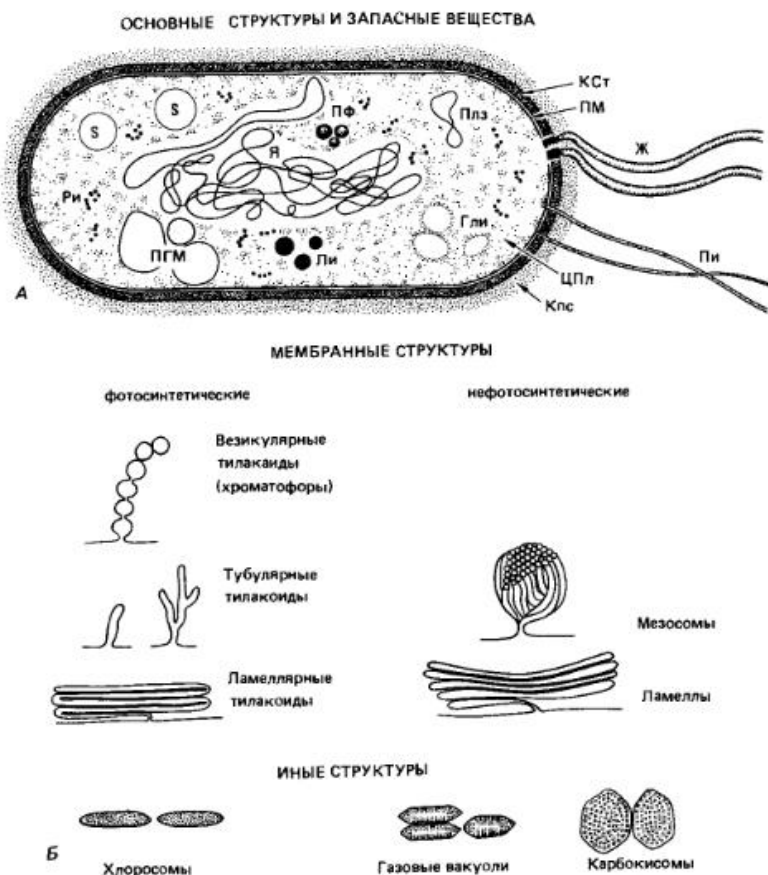


Рис. 2.4. А. Схема строения прокариотической клетки (бактериальная клетка в продольном разрезе). Гли—гранулы гликогена; Ж—жгутик; Кпс—капсула; КСт—клеточная стенка; Ли—липидные капельки; ПГМ—поли-β-гидроксимасляная кислота; Пи—пили; Плз—плазмида; ПМ—плазматическая мембрана; ПФ—гранулы полифосфата; Ри—рибосомы и полисомы; Я—ядро (нуклеоид); S—включения серы. Б. Различные цитоплазматические структуры.

стоит из небольших, тоже замкнутых в кольцо молекул ДНК, получивших название плазмид. Информация, содержащаяся в плаزمиде, не является необходимой для клеток.

Бактерии, как правило, размножаются путем деления надвое (бинарное деление). Клетка удлиняется, а затем происходит образование поперечной перегородки, постепенно растущей снаружи внутрь (или перетяжки), после чего дочерние клетки расходятся. У многих бактерий, однако, после деления в определенных условиях среды дочерние клетки некоторое время остаются связанными между собой, образуя харак-

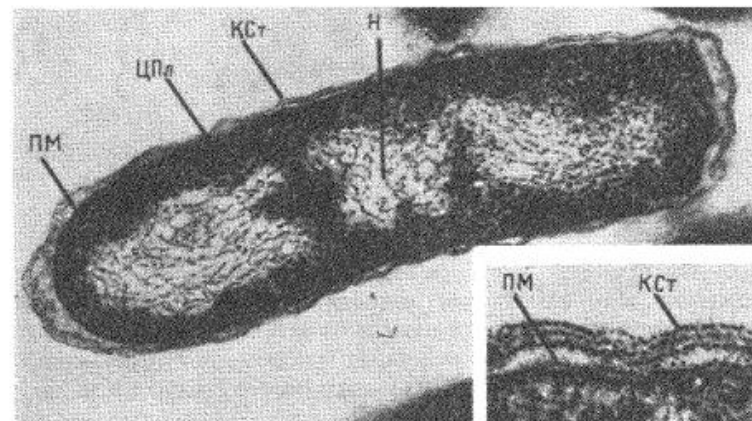


Рис. 2.5. Электронная микрофотография ультратонкого среза клетки *Escherichia coli* B. В результате слабого плазмолиза протопласт отделился от клеточной стенки, поэтому клеточная стенка (КСт) и плазматическая мембрана (ПМ) хорошо различимы. Н—нуклеоид (ядро); ЦПл—цитоплазма с рибосомами. Увеличение 56 200 ×, в нижнем правом углу—216 600 ×. (Фото Н. Frank, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen.)

терные группы. При этом в зависимости от ориентации плоскостей деления и числа делений возникают различные формы, например у сферических бактерий—пары клеток (*Diplococcus*), цепочки (*Streptococcus*), пластинки или же пакеты (*Sarcina*). Палочковидные бактерии также могут образовывать пары или цепочки клеток. Размножение почкованием встречается у прокариот как исключение. Делению клетки предшествует удвоение, или репликация, бактериальной хромосомы. Однако диплоидная фаза в клеточном цикле ограничена очень короткой стадией. Таким образом, прокариоты—гаплоидные организмы.

Клетки прокариот, за немногими исключениями (*Mycoplasma*), окружены клеточной стенкой. Основной «каркас» стенки состоит из пептидогликана, или муреина. Это характерно для прокариот гетерополимер, который не встречается у эукариот. Многие прокариоты подвижны—они перемещаются путем плавания или скольжения. Органами движения плавающих бактерий служат особые «бактериальные» жгутики. Эти жгутики устроены значительно проще, чем у эукариот, и состоят из одной-единственной фибриллы.

По форме, за немногими исключениями, все бактерии можно отнести к сферическим, цилиндрическим (палочковидным) или искривленным цилиндрическим. Основными формами считаются поэтому кокки, прямые палочки и изогнутые палочки (рис. 2.6). Как прямые палочки под микроскопом выглядят бактерии, относящиеся к родам *Pseudomonas* и *Bacillus*. Спириллы имеют штопорообразную форму. Вибрионами (*Vibrio*) называют искривленную палочку. Для некоторых бактерий характерны отклонения от этих основных форм. Для рода

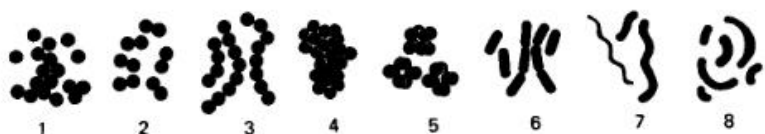


Рис. 2.6. Формы одноклеточных бактерий. 1—микрোকки; 2—диплококки; 3—стрептококки; 4—стафилококки; 5—сарцины; 6—палочковидные бактерии; 7—спириллы; 8—вибрионы.

Corynebacterium и для коринеформных бактерий характерна булавообразная или изменчивая неправильная форма. У многих видов *Mycobacterium* встречаются намеки на ветвление клетки. Стрептомицеты образуют даже мицелий, подобный грибному, но отличающийся от последнего меньшим диаметром клетки (менее 1 мкм, тогда как у грибов более 5 мкм).

Химический состав одноклеточных организмов. Вес сырой биомассы бактерий определяют после отделения клеток от жидкой питательной среды путем центрифугирования. Осевшая клеточная масса содержит 70–85% воды; таким образом, сухая биомасса составляет 15–30% от сырой массы. Если клетки содержат много запасного материала (липиды, полисахариды, полифосфаты или серу), доля сухой массы больше. Сухое вещество бактерий — это в основном полимеры [белки (50%), компоненты клеточной стенки (10–20%), РНК (10–20%), ДНК (3–4%)], а также липиды (10%). Десять важнейших химических элементов представлены в клетках бактерий примерно следующим образом: углерод—50%, кислород—20%, азот—14%, водород—8%, фосфор—3%, сера—1%, калий—1%, кальций—0,5%, магний—0,5% и железо 0,2%.

2.2.1 Бактериальное ядро

Малые размеры бактериальной клетки и наличие двух типов нуклеиновых кислот очень затруднили цитохимическое выявление ядерного материала. Тем не менее классические цитологические методы, а затем и техника ультратонких срезов в сочетании с электронной микроскопией позволили в конце концов установить, что бактерии содержат ДНК и что эта ДНК не распределена диффузно в цитоплазме, а локализована в ограниченных участках, которые делятся перед делением клетки.

Цитологическое выявление бактериального ядра. Способность ДНК к специфическому окрашиванию лежит в основе реакции Фельгена на ядерное вещество. В результате взаимодействия свободных альдегидных групп с бесцветной фуксинсернистой кислотой появляется фиолетовая окраска, свойственная основному фуксину. Для удаления из клеток РНК и освобождения альдегидных групп дезоксиинтозы, входящей в состав ДНК, клетки предварительно обрабатывают горячей разведенной HCl (4 мин в 1 М HCl при 60°C). Лучшие результаты получались при окрашивании клеток после такой же предварительной обработки ос-



Рис. 2.7. Ядерные структуры бактерий. А. *Bacillus cereus*. Б и В. *Micrococcus radiodurans*, штамм "Sark". Два первых снимка в светлом поле после окраски по Гимза; третий снимок — фазовый контраст. (Фото С. F. Robinow.)

новным красителем Гимза. В дальнейшем методы фиксации были усовершенствованы; РНК стали удалять с помощью *рибонуклеазы*. Таким способом удалось получить препараты *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* var. *mycoides* и *B. megaterium*, позволившие сделать вывод, что у бактерий существуют особые образования, сходные с ядром. Их называют хроматиновыми тельцами, нуклеоидами или эквивалентами ядра (рис. 2.7 и 2.8).

К решению вопроса о структуре бактериального ядра удалось приблизиться только благодаря электронной микроскопии ультратонких срезов через бактериальную клетку. Для получения оптимальной картины нативной тонкой структуры клеточного ядра решающее значение имела надлежащая фиксация (с помощью четырехоксида осмия, уранил-ацетата или фосфорновольфрамовой кислоты) в совершенно определенных условиях. Область ядра (нуклеоплазма) в бактериальной клетке равномерно заполнена очень тонкими нитями (рис. 2.5). В электронном микроскопе она выглядит менее плотной, чем окружающая цитоплазма, содержащая рибосомы. Какой-либо мембранной структуры, отделяющей область ядра от цитоплазмы, выявить не удалось.

Радиоавтография. То, что ядерный материал состоит из ДНК и, например, у *Escherichia coli* представлен единственной нитью длиной около 1 мм, замкнутой в кольцо, впервые удалось показать Кэрнсу с помощью метода радиоавтографии. Для этого были использованы препараты клеток, выращенных на среде с тимидином (предшественник тимина), меченным тритием (^3H). ДНК — единственное вещество в клет-

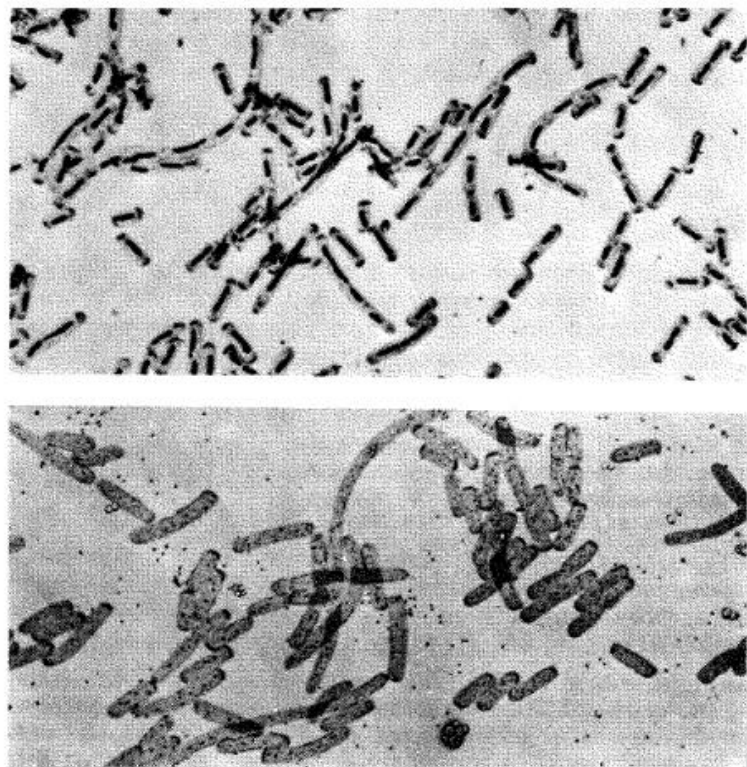


Рис. 2.8. Электронные микрофотографии клеток *Escherichia coli*, обработанных ферментами. В клетках на верхнем снимке цитоплазма вместе с ее РНК разрушена воздействием рибонуклеазы и пепсина; сохранились только клеточные стенки и нуклеониды (ядра). Клетки на нижнем снимке были последовательно обработаны рибонуклеазой, дезоксирибонуклеазой и пепсином; в результате разрушены и нуклеониды, так что видны только пустые клеточные стенки. Такая последовательная дифференцирующая обработка ферментами показывает, что темные области (на верхнем снимке) соответствуют нуклеоидам (ДНК). (Peters D., Wigand R., Z. Naturforsch., 8b [1953], 180.)

ке, содержащее тимин. Если клетки, включившие ^3H в тимин, обработать лизоцимом или лаурилсульфатом на мембранном фильтре с целью вызвать их лизис, то можно получить радиоавтограф развернутой бактериальной хромосомы. Такие радиоавтографы (рис. 2.9) убедительно доказывают, что бактериальная ДНК имеет форму нити, замкнутой в кольцо. Эта нить в генетическом смысле соответствует группе сцепления и называется бактериальной хромосомой. Кроме того, радиоавтографы позволяют представить себе способ деления такой нити. На рис. 2.10 изображена ДНК бактериофага, выявленная другим методом.

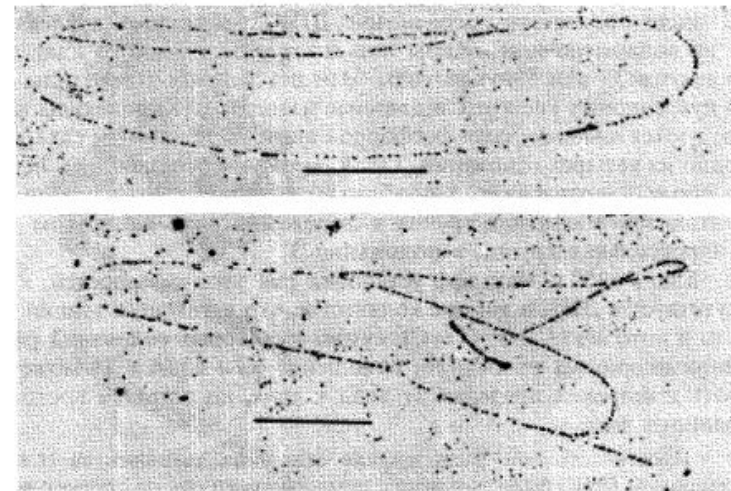
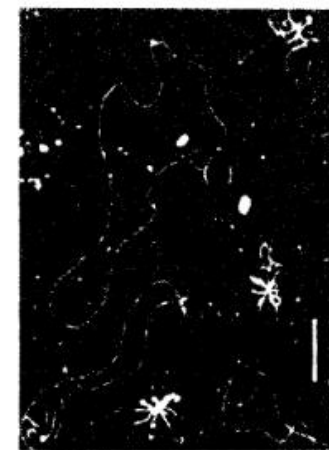


Рис. 2.9. Радиоавтографы делящихся хромосом *Escherichia coli*. Клетки на протяжении двух генераций росли в присутствии тимина, меченного тритием, а затем были разрушены лизоцимом; объяснение см. в тексте. (Bleekens S., Strohbach G., Sarfert E., Z. allg. Microbiol., 6 [1966], 121.)

Структура ДНК. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) – макромолекула. При кислотном гидролизе она расщепляется на свои структурные элементы – дезоксирибозу, фосфорную кислоту и азотистые основания в эквимолярных соотношениях. В состав ДНК входят четыре различных основания: два пуриновых (аденин и гуанин) и два пиримидиновых (цитозин и тимин).

Рис. 2.10. Молекулы ДНК бактериофага PM2. Изображены молекулы в различном состоянии. Каждый клубок состоит из ссс-ДНК (covalently closed circular DNA, т.е. ковалентно замкнутой кольцевой ДНК). В результате облучения ультрафиолетом в некоторых молекулах произошел разрыв одной из цепей и получилась ос-ДНК (open circular DNA, т.е. открытая кольцевая ДНК), имеющая вид большого кольца с длиной контура 3,02 мкм. ДНК была распластана с помощью соединения четвертичного аммония и обработана уранилацетатом (позитивный контраст); темнопольная электронная микрофотография. (U. Hahn, Göttingen.)



Если произвести расщепление ДНК с помощью нуклеаз (ДНКазы I из поджелудочной железы или дезоксирибонуклеазы змеиного яда), то освобождаются 3'- или 5'-нуклеотиды. Эти дезоксирибонуклеотиды соединены в нуклеиновых кислотах в длинные цепи. В ДНК молекулы пентозы чередуются с молекулами фосфорной кислоты; с каждым сахаром связано одно из четырех оснований. Такая полинуклеотидная цепь не одинакова в обоих направлениях, т.е. обладает полярностью: на одном ее конце находится фосфатная группа в положении 5', а на другом—свободная гидроксильная группа в положении 3'.

Еще в 1950 г. Чаргафф установил ряд закономерностей: аденин присутствует в ДНК в том же количестве, что и тимин, а гуанин — в том же, что и цитозин ($A = T$, $G = C$); сумма пуриновых оснований равна сумме пиримидиновых оснований; отношение $(G + C)/(A + T)$ может варьировать в широких пределах от вида к виду, но остается постоянным для данного вида.

Пространственное расположение отдельных компонентов (т.е. вторичная структура ДНК) было выяснено с помощью рентгеноструктурного анализа. Если вытянуть ДНК в нить и вращать ее в монохроматическом пучке рентгеновского излучения, а отклоняющиеся лучи просцировать на пленку с эмульсией, то можно получить дифракционную рентгенограмму. Рентгенограммы ДНК различного происхождения (из спермы, тимуса, бактериальных клеток и бактериофагов) оказались почти идентичными. Анализ таких рентгенограмм, произведенный Уилкинсом, показал, что пуриновые и пиримидиновые кольца располагаются под прямым углом к продольной оси полинуклеотидного твиста; этот твист должен быть спирально закручен вокруг центральной оси с шагом 3,4 нм. Исходя из данных о плотности, следовало предполагать, что спираль состоит более чем из одного твиста.

Полученные результаты дали возможность Уотсону и Крику сформулировать (в 1953 г.) блестящую теорию о структуре ДНК. Согласно модели Уотсона—Крика, полинуклеотидные цепи закручены в двойную спираль вокруг воображаемой оси. Обе цепи скреплены водородными связями, соединяющими основания, которые обращены внутрь спирали (рис. 2.11) При этом если учесть расстояния и условия образования связи, то против каждого аденина должен находиться тимин, а против каждого гуанина—цитозин. На один виток спирали приходится около 10 пар оснований. Последовательность оснований в двух цепях по необходимости комплементарна. Направление цепей противоположно (5' → 3' и 3' → 5'). Длина хромосомы *Escherichia coli* составляет примерно 1,4 мм. Один микрометр одноцепочечной ДНК соответствует относительной молекулярной массе около $2 \cdot 10^6$, или примерно 3000 пар оснований. Таким образом, хромосома *E. coli* имеет молекулярную массу $2,9 \cdot 10^9$.

Водородные связи, соединяющие А с Т и Г с С, неодинаково прочны. Связи эти имеют в основном электростатическую природу. В их образовании участвуют ОН- и NH₂-группы. О и N—сильно электроотрицательные элементы; они оттягивают электроны и сообщают связанному с ними водороду положительный заряд. Положительно заряженный атом водорода может притягиваться другими электроотрицательными группами с неподеленными парами электро-

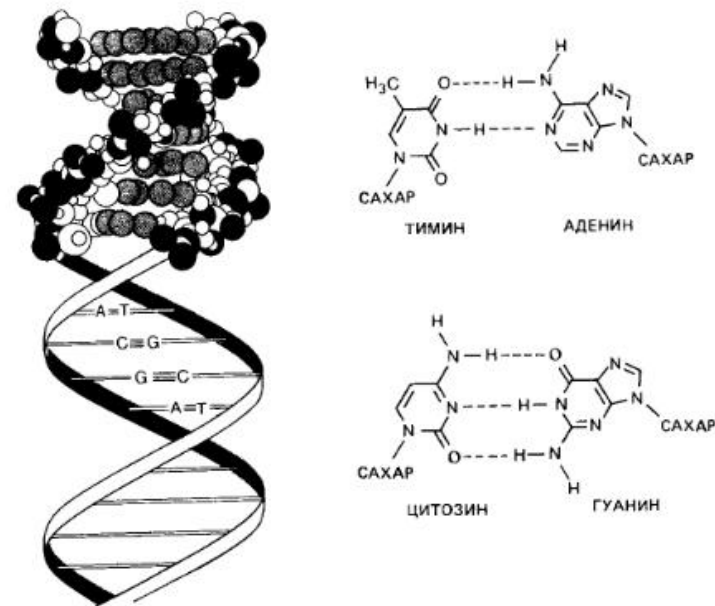


Рис. 2.11. Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Одиночные цепи ДНК соединены водородными связями. Слева—двойная спираль ДНК, сверху в виде модели из шариков, а ниже показано расположение оснований наподобие ступенек винтовой лестницы. Справа показано спаривание оснований—аденина с тимином и гуанина с цитозином. Пунктирными линиями представлены водородные связи.

нов, и в этом случае образуется водородная связь. Прочность ее зависит от кислотности атома водорода и основности атома-акцептора. Водородные связи прочнее межмолекулярных сил Ван-дер-Ваальса: энергия связи может достигать 38 кДж (9 ккал) на 1 моль; в среднем это лишь не намного больше, чем энергия тепловых колебаний при 37°C. Как видно из рис. 2.11, между гуанином и цитозином имеются три, а между тимином и аденином—две водородные связи. Из-за малой энергии связи такие воздействия, как повышение температуры, незначительные изменения концентрации магния или добавление мочевины, могут приводить к большим изменениям и даже разрыву связи. При повышении температуры происходит разрыв водородных связей и расхождение полинуклеотидных цепей. Такое разрушение вторичной структуры ДНК сопровождается поглощением света (при длине волны 259 нм) (гиперхромным эффектом). Температуру, при которой пророст экстинкции достигает половины максимальной величины, называют точкой плавления (T_m). Точка плавления тем выше, чем больше в ДНК гуанина и цитозина—оснований, соединенных между собой тремя водородными связями. Поэтому точка плавления выделенной и очищенной ДНК (рис. 2.12) служит показателем, позволяющим легко определить относительное содержание в ней цитозина и гуанина. **Содержание пар GC**—это отношение суммы молей гуанина и цитозина к сумме молей всех четырех оснований в данной ДНК (в процентах).

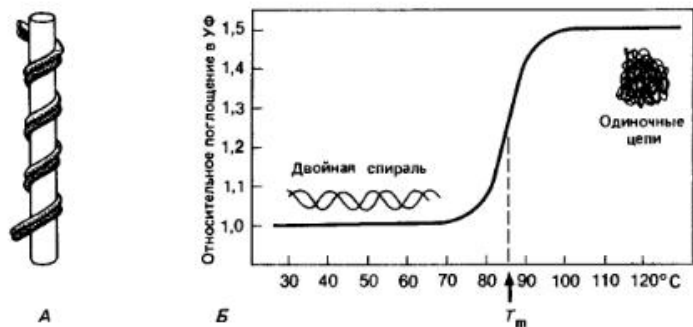


Рис. 2.12. А. Модель плектонемической двойной спирали. Ее можно получить, если обмотать вокруг стержня два сложенных вместе куска проволоки, а затем вынуть стержень. Две одиночные цепи переплетаются, и их можно разделить только путем раскручивания. Б. Кривая плавления бактериальной ДНК. T_m – температура, при которой экстинкция достигает половины максимальной величины.

По содержанию GC в ДНК бактерии очень сильно различаются между собой. Эта величина может варьировать в пределах от 30% (у некоторых стафилококков и представителей группы *Cytophaga*) до более чем 70% (у представителей рода *Micrococcus* и некоторых миксобактерий, образующих плодовые тела). Содержание GC видоспецифично и рассматривается как таксономический признак.

Репликация ДНК. ДНК содержит генетическую информацию клетки. Поэтому удвоение ДНК, всегда предшествующее клеточному делению, должно приводить к образованию двух совершенно идентичных хромосом. На первый взгляд этот процесс – идентичная редупликация, или репликация, ДНК – представляется очень простым: двум цепям достаточно только разойтись, чтобы вдоль каждой из одиночных полинуклеотидных цепей против комплементарных оснований начали выстраиваться свободные нуклеотиды, которым после этого останется лишь связаться между собой в цепь. Одна из главных трудностей состоит в том, как представить себе расхождение двух исходных цепей. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, ДНК представляет собой плектонемическую, а не паранемическую двойную спираль (рис. 2.12, А). Для того чтобы выяснить, необходимо ли вообще раскручивание спирали, в качестве эвристических гипотез были рассмотрены три принципиально возможных способа репликации ДНК (рис. 2.13) (Дельбрюк и Стент, 1957):

1. **Консервативный (сохраняющий) механизм.** Раскручивания спирали не происходит; родительская двойная спираль служит матрицей для синтеза двух новых цепей. Дочерняя двойная спираль строится целиком из нового материала, а родительская как таковая сохраняется.

2. **Дисперсивный механизм.** Родительская спираль при удвоении разрывается на каждом полуобороте путем множественной фрагментации;

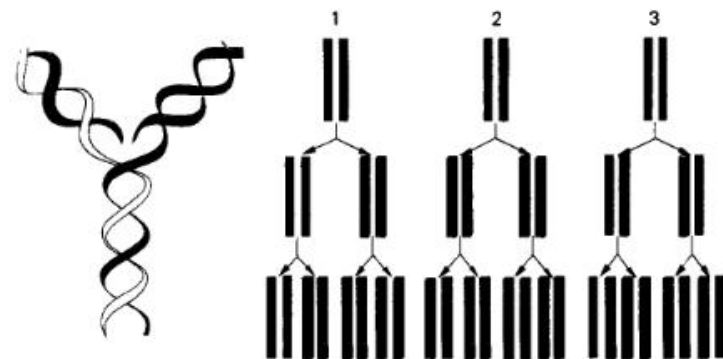


Рис. 2.13. Слева – модель полуконсервативного способа репликации ДНК. Справа схематически представлены три теоретически возможных механизма репликации ДНК: консервативный (1), дисперсивный (2) и полуконсервативный (3). Объяснение в тексте.

синтез новых цепей происходит на фрагментах, которые затем крест-накрест сливаются с отрезками нового материала. Каждая полинуклеотидная цепь в этом случае должна была бы состоять из чередующихся отрезков старого и нового материала.

3. **Полуконсервативный механизм.** Родительская двойная спираль раскручивается, и на каждой полинуклеотидной цепи образуется новая комплементарная цепь. Таким образом, новая двойная спираль оказывается «гибридом» старой и вновь синтезированной цепей.

С целью выяснить, какая из этих трех возможностей соответствует действительности, Меселсон и Сталь провели эксперименты с использованием метки и последующим разделением меченой ДНК в градиенте плотности (рис. 2.14).

Если центрифугировать 6 М раствор хлористого цезия в течение многих часов при 100 000 *g*, устанавливается градиент плотности (равновесие между действием центробежной силы и диффузией). Если этот раствор содержит ДНК, она скапливается в зоне, положение которой в градиенте соответствует ее удельному весу. ДНК, выделенная из бактерий, которые росли в присутствии $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, оказывается на 0,8% тяжелее обычной ^{14}N -ДНК. Поэтому такая ДНК образует в градиенте CsCl особую полосу. Бактерию *Escherichia coli* на протяжении многих поколений выращивали на ^{15}N в качестве источника азота, так что ее ДНК содержала только ^{15}N . Затем к питательной среде прибавляли в избытке ^{14}N . До и после этого добавления брали пробы: экстрагировали ДНК и анализировали ее в градиенте плотности CsCl . После одного деления клеток в среде с ^{14}N вся ДНК имела промежуточную плотность («полутяжелая», или «гибридная», ДНК). Общее количество такой полутяжелой ДНК оставалось постоянным на протяжении нескольких поколений, тогда как количество легкой ДНК возрастало. Для доказательства того, что одна цепь полутяжелой ДНК действительно содержала ^{15}N , а другая – ^{14}N , полутяжелую ДНК подвергали «плавлению» (нагревали до 100°C) и быстро охлаждали. После этого в градиенте плотности CsCl

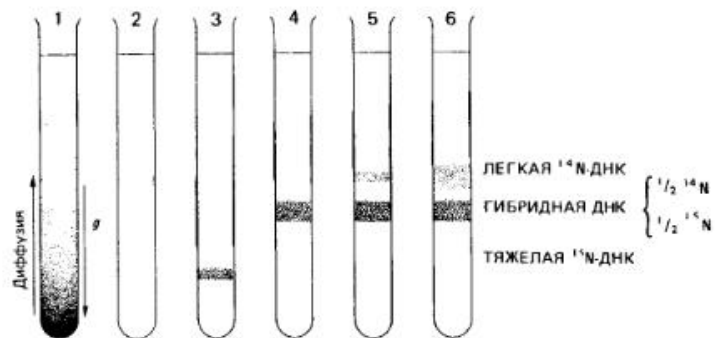


Рис. 2.14. Полуконсервативная репликация ДНК. Схема опыта Меселсона и Сталля. Разделение ДНК, меченной ^{15}N и ^{14}N , путем центрифугирования в 6 М растворе CsCl . 1 – градиент плотности, возникший в результате установления равновесия между диффузией и действием силы тяжести; 2 – ДНК из нормальных клеток, выросших в среде с $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$; 3 – ДНК из клеток, росших в течение нескольких поколений в среде с $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$; 4 – ДНК из клеток, меченных ^{15}N , а затем росших в течение одной генерации в среде с $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$; 5 – ДНК из клеток, меченных ^{15}N , которые затем росли в течение двух поколений в среде с $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$; 6 – ДНК из клеток, меченных ^{15}N , а затем росших в течение трех поколений в среде с $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}$.

появлялись две полосы, из которых одна была типична для одноцепочечной ДНК с ^{14}N , а другая – для такой же ДНК с ^{15}N .

Результаты этих опытов не совместимы ни с консервативным, ни с дисперсивным механизмом репликации ДНК; они согласуются с представлением о **полуконсервативном** механизме. При репликации цепи раскручиваются и расходятся. На каждой одиночной цепи происходит синтез новой комплементарной цепи. В этом процессе участвуют ДНК-полимеразы. Функция их проста: они связывают между собой нуклеотиды, расположившиеся путем спаривания оснований в правильном порядке, и таким образом синтезируют новую полинуклеотидную цепь. Биохимические механизмы показаны на рис. 2.15 и поясняются в подписи к этому рисунку. С подробностями можно ознакомиться в учебниках по молекулярной биологии.

Синтез одной полинуклеотидной цепи таким способом объяснить трудно: ДНК-полимераза способна непрерывно связывать нуклеотиды по направлению от 5' к 3'-концу. Но так как двойная спираль ДНК антипараллельна, синтез второй, противоположной цепи должен происходить в обратном направлении. Эти соображения и экспериментальные данные привели к представлению, которое иллюстрируют схемы на рис. 2.16. Вероятно, сначала образуются только короткие (длиной около 1000 нуклеотидов) отрезки – так называемые фрагменты Оказаки. Их синтез начинается с образования короткой цепи РНК, которая служит «затравкой» (праймером). Затем с помощью ДНК-полимеразы синтези-

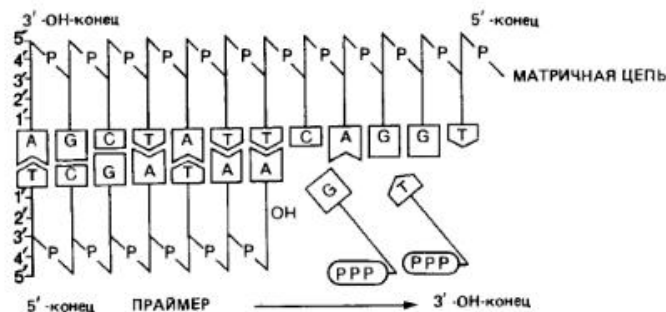


Рис. 2.15. Функционирование ДНК-полимераз. Двойная спираль ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей противоположной полярности (они «антипараллельны»). Если «свободная», не связанная с соседним нуклеотидом 3'-ОН группа находится у одной цепи на левом конце, то в другой цепи такая же группа находится на правом конце. Репликация ДНК катализируется ДНК-полимеразой. Для функционирования такого рода ферментов необходимы: 1) матрица, которая представляет собой одиночную цепь ДНК, 2) праймер – короткий отрезок реплицированной нуклеиновой кислоты и 3) смесь дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов. ДНК-полимеразы способны присоединять свободные нуклеотиды только к свободному 3'-ОН-концу нуклеотидной цепи. Таким образом, синтез протекает только в направлении 5' → 3', но не наоборот.

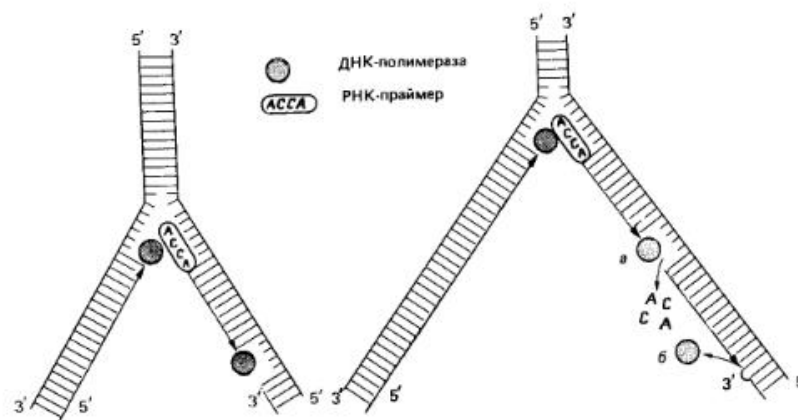


Рис. 2.16. Репликация двухцепочечной ДНК. При деспирализации ДНК возникает промежуточная разветвленная структура (репликационная вилка). Обе одиночные цепи ДНК имеют противоположную полярность (5' → 3' и 3' → 5'). ДНК-полимеразы способны катализировать синтез только в одном направлении (5' → 3'). Поэтому синтез одной цепи может происходить непрерывно в направлении продвигающегося раскручивания двойной спирали. Другая же цепь должна синтезироваться в обратном направлении. Синтез начинается с образования короткого отрезка РНК, служащего «затравкой» (праймером) (у бактериофага Т7 это основания А-С-С-А). Затем ДНК-полимераза осуществляет синтез цепи ДНК длиной в 1000–2000 нуклеотидов, примыкающей к этой РНК. В конце концов РНК-праймер удаляется экзонуклеазой, брешь заполняется ДНК-полимеразой (а) и закрывается ДНК-лигазой (б). Такой механизм «дробного», или «прерывистого», синтеза ДНК с последующим связыванием отдельных отрезков позволяет объяснить репликацию ДНК на антипараллельной цепи.

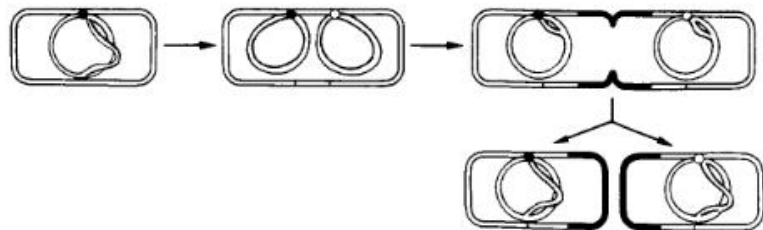


Рис. 2.17. Репликация кольцевой бактериальной хромосомы и деление бактериальной клетки. В этой схеме предполагается однонаправленный механизм репликации ДНК, т.е. механизм с участием только одной репликативной вилки.

руется цепь ДНК, примыкающая к РНК, длиной в 1000–2000 нуклеотидов. В конце концов РНК-праймер удаляется, разрыв заполняется при участии другой полимеразы, и все отрезки соединяются при помощи лигазы. Такой механизм посегментного синтеза полинуклеотидов позволяет объяснить репликацию второй цепи ДНК. Возможно даже, что таким способом реплицируются обе цепи.

На рис. 2.17 показано, как можно представлять себе репликацию бактериальной хромосомы и деление бактериальной клетки; в данной схеме предполагается, что репликация всего кольца ДНК происходит в одном направлении.

Оказалось, однако, что синтез обеих новых цепей может идти не только в одном направлении, но и сразу в обе стороны от точки инициации. Такой механизм предполагает раскручивание двойной спирали сразу в двух местах—с образованием двух разветвлений репликационных вилок на одной молекуле ДНК. Удвоение хромосомы у *E. coli* занимает примерно 40 мин. Между тем эта бактерия при благоприятных условиях делится со временем удвоения порядка всего лишь 20 мин. Этот факт можно объяснить тем, что обе дочерние хромосомы, по имеющимся данным, начинают новый цикл деления еще до того, как заканчивается предыдущий. О механизме репликаций ДНК получено гораздо больше детальных сведений, чем можно было здесь изложить. Между механизмами репликации фагов, плазмид и бактериальных хромосом существуют значительные различия. Для углубленного изучения этих вопросов следует обратиться к литературе по молекулярной биологии.

Размеры генома и число геномов. Величина генома у бактерий варьирует от вида к виду в пределах от $0,8$ до $8 \cdot 10^6$ пар оснований. Число геномов в клетке тоже может быть у разных видов различным и зависит к тому же от условий культивирования. В периодической культуре растущие клетки *Escherichia coli* имеют от 2 до 4, *Azotobacter chroococcum*—от 20 до 25 и *Desulfovibrio gigas*—от 10 до 15 геномов на одну клетку. (Для сравнения приведем размеры геномов эукариот: у *Neurospora crassa* $19 \cdot 10^6$, у *Aspergillus niger* $40 \cdot 10^6$, у человека $2,9 \cdot 10^9$ и у *Zea mays* $7 \cdot 10^9$ пар оснований.)

ДНК/ДНК-гибридизация: гомологичные последовательности нуклеотидов в ДНК разных видов. Как мы уже говорили, при нагревании изолированной ДНК две полинуклеотидные цепи расходятся в результате разрыва водородных связей. Такая денатурация (или «плавление»), приводящая к образованию одиночных цепей, обратима: при очень медленном охлаждении препарата будет происходить спаривание и реассоциация комплементарных участков. Если смешать короткие фрагменты денатурированных ДНК, полученных из двух различных, но близких между собой видов бактерий, при температуре выше точки их плавления и затем медленно охладить смесь, тоже будет происходить реассоциация. Двойные спирали, образовавшиеся из одиночных цепей ДНК двух разных организмов, называют гетеродуплексными молекулами. Для того чтобы в эксперименте можно было проследить за образованием гетеродуплексов, нужно, конечно, пометить ДНК одной из бактерий тяжелым или радиоактивным изотопом.

Если, например, вырастить культуру одной из бактерий на тяжелой воде (D_2O), то у нее будет «тяжелая» ДНК, и тогда образование гетеродуплекса можно будет выявить путем центрифугирования в градиенте плотности $CsCl$ —так же, как в опыте Меселсона и Сталя было доказано образование $^{14}N/^{15}N$ -гибридной ДНК. Можно, однако, пометить ДНК одного из партнеров, выращивая его на среде с ^{14}C или с ^{32}P . Если теперь смешать длинные отрезки денатурированной ДНК (из непомеченной ^{14}C бактерии А) с короткими отрезками денатурированной ДНК (из помеченной ^{14}C бактерии В), медленно охладить смесь и провести ее через фильтр, задерживающий длинные цепи, но пропускающий короткие, то на фильтре останутся молекулы гетеродуплекса. Оставшаяся на фильтре радиоактивность будет тем выше, чем больше радиоактивных отрезков (В) связалось с А-цепями, т.е. она будет зависеть от того, идентичны ли (либо очень сходны) последовательности оснований ДНК А и В или же они совсем различны. Таким образом, реассоциация ДНК/ДНК дает возможность определять степень гомологии последовательностей ДНК разного происхождения. Контрольный опыт проводят с молекулами ДНК из одних и тех же бактерий (одну пробу метят, другую не метят) и произвольно принимают степень реассоциации за 100. Степень реассоциации молекул ДНК из различных штаммов выражают затем в процентах от этой величины. Рутинные методы определения гомологии между ДНК различных штаммов бактерий многократно видоизменялись, но все они основаны на том же принципе образования гетеродуплексов; во всех случаях необходимо пометить одного из партнеров.

Гомологичность ДНК, т.е. совпадение последовательности оснований в молекулах ДНК двух разных штаммов бактерий, тем больше, чем ближе родство этих штаммов между собой. Этот способ оправдал себя при сравнении близких штаммов и видов; между родами же, находящимися между собой в отдаленном родстве, степень гомологии ДНК слишком мала, чтобы можно было выявить образование гетеродуплексов. Одноцепочечная ДНК может реассоциировать и с РНК. Поэтому описанные методы позволяют также оценивать гомологию между ДНК и РНК.

Плазмиды. Многие бактерии наряду с хромосомной ДНК содержат

и внехромосомную ДНК, тоже представленную двойными спиральями, замкнутыми в кольцо. Эти автономно реплицирующиеся элементы ДНК называют плазмидами (см. подраздел «Плазмиды» в разд. 15.3.2).

2.2.2 Цитоплазма и мембраны

Цитоплазма отделена от клеточной стенки плазматической мембраной. В цитоплазме находятся различные включения (пузырьки, гранулы) и ядро. Как показали электронно-микроскопические и биохимические исследования, цитоплазма — не гомогенный раствор белка; она содержит многочисленные мембраны и разного рода мембранные структуры, а остальное пространство занимают жидкая фаза и рибосомы. Многократным центрифугированием при 100 000 g можно разделить разбавленную водной средой цитоплазму на «растворимую» фракцию, содержащую главным образом растворимые ферменты и растворимую рибонуклеиновую кислоту (РНК), и фракцию частиц, в которую наряду с мембранами в первую очередь входят рибосомы. Растворимые ферменты катализируют множество различных реакций распада и синтеза. Растворимые рибонуклеиновые кислоты [матричные (мРНК) и транспортные (тРНК)] и рибосомы участвуют в синтезе белка.

Белки. Белки состоят из аминокислот, соединенных в определенной последовательности пептидными связями в полипептидные цепи. Эти цепи имеют совершенно определенную пространственную конфигурацию (конформацию), которая стабилизируется дополнительными связями — ковалентными и нековалентными (рис. 2.18). В зависимости от ро-

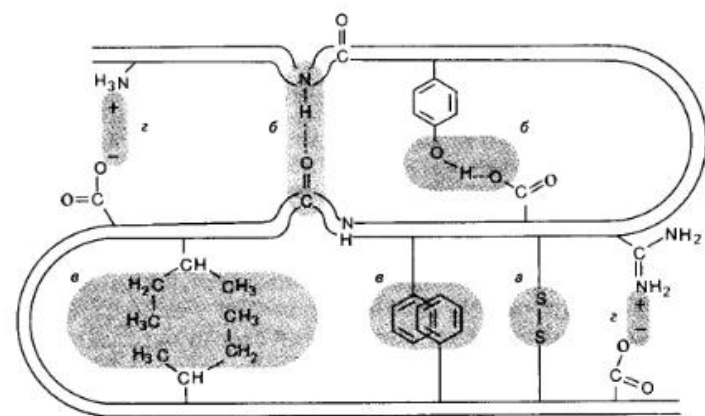


Рис. 2.18. Возможные внутримолекулярные связи между различными участками полипептидной цепи. a — ковалентные дисульфидные связи; b — водородные связи; v — неполярные (гидрофобные) взаимодействия; z — ионные связи. [Lynen F., Naturw. Rdsch., 23, [1970], 266.]

ли, которую играют в поддержании структуры те или иные связи, различают несколько структурных уровней. **Первичная структура** белка определяется числом и последовательностью ковалентно связанных аминокислот. Полипептидная цепь благодаря водородным связям, образующимся между кислородными атомами карбонильных групп и азотными атомами амидных групп, приобретает **вторичную структуру**; она может образовать спиральную конфигурацию (α -спираль) или конфигурацию так называемого складчатого слоя. **Третичной структурой** называют определенное пространственное расположение пептидной цепи, обусловленное взаимодействием между различными ее боковыми группами. В поддержании третичной структуры участвуют другие водородные связи, ионные связи и неполярные (гидрофобные) взаимодействия. Поперечные связи, соединяющие различные участки полипептидной цепи, могут быть и ковалентными; таковы, например, дисульфидные связи, образующиеся при окислении SH-групп. И наконец, благодаря взаимодействиям нескольких полипептидных цепей могут возникать надмолекулярные агрегаты. Такое строение (при котором белок состоит из определенного числа полипептидных цепей, или субъединиц) называют **четвертичной структурой**. При физиологических условиях белок находится в водной фазе. Поэтому между белками и диполями воды тоже имеет место взаимодействие. Полярные группы гидратированы. Факторы, вызывающие изменение заряда белков (концентрации ионов H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ и др.), неизбежно влияют также на степень гидратации, а тем самым и на степень набухания белков.

Рибосомы. Рибосомы служат местом синтеза белка. На электронных микрофотографиях они видны как частицы, лежащие в цитоплазме. Рибосомы бактерий имеют размеры 16×18 нм. Примерно 80–85% всей бактериальной РНК находится в рибосомах. Так как интактные рибосомы бактерий при ультрацентрифугировании оседают со скоростью, составляющей около 70 единиц Сведберга (S), их называют 70S-рибосомами. Цитоплазматические рибосомы эукариот, за немногими исключениями, несколько крупнее, и их называют 80S-рибосомами.

Рибосомы состоят из двух субчастиц; у бактерий это субчастицы 30S и 50S (рис. 2.19), образующие 70S-рибосомы. По величине и многим другим особенностям рибосомы бактерий сходны с рибосомами митохондрий и хлоропластов. Бактериальная клетка содержит примерно от 5000 до 50 000 рибосом; число их тем больше, чем быстрее растет клетка. Во время активного синтеза белков на электронных микрофотографиях тонких срезов клетки можно видеть правильные цепочки рибосом. Это рибосомы, связанные наподобие бус на цепи мРНК; их называют полирибосомами или полисомами.

Различия между рибосомами бактерий (70S) и эукариот (80S) имеют решающее значение для борьбы с инфекционными болезнями; некоторые антибиотики частично или полностью подавляют синтез белка, протекающий на рибосомах 70S, но не затрагивают функции рибосом 80S (разд. 6.6).

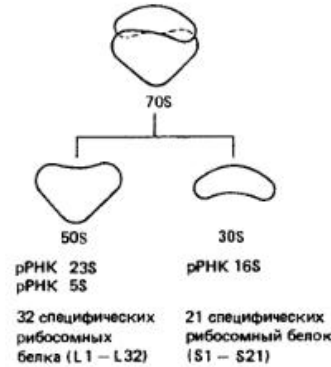
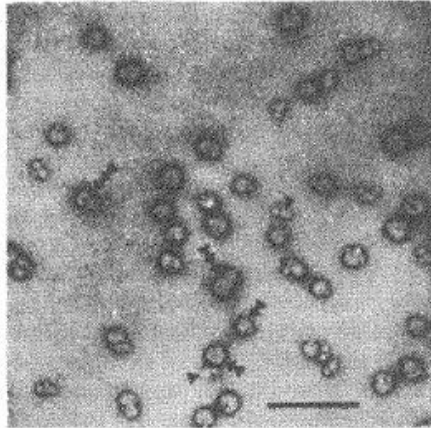


Рис. 2.19. Рибосомы бактерий. Слева – электронная микрофотография рибосом из *E. coli*. Интактные рибосомы 70S помечены тремя треугольниками, субчастицы 50S – двумя, а субчастицы 30S – одним. Масштабный отрезок 100 нм. (Фото E. Spiess.) Справа – схема построения рибосомы из субчастиц и данные об их составе.

Структура РНК. Рибонуклеиновые кислоты отличаются от ДНК как мономерами, из которых они построены, так и вторичной структурой. Центральная ось полинуклеотидной цепи состоит из рибозы и фосфорной кислоты. Из оснований представлены те же аденин, гуанин и цитозин, но вместо тимина имеется урацил. Кроме того, РНК содержит несколько редких оснований (например, псевдоурацил). РНК в клетках присутствует в одноцепочечной форме; только в отдельных участках цепи основания могут быть спарены.

Плазматическая мембрана. На электронных микрофотографиях ультратонких срезов бактерий, фиксированных четырехокисью осмия, плазматическая мембрана представляется многослойной. Она состоит из двух осмиофильных и потому темных слоев толщиной 2–3 нм каждый и промежуточного более светлого слоя толщиной 4–5 нм. По своему строению мембраны бактериальных, животных и растительных клеток очень сходны. Это дает основание говорить об универсальной «элементарной мембране» (“unit membrane”).

Мембраны можно выделить, подвергнув осмотическому шоку протопласты, полученные с помощью *лизозима*. Мембрана богата липидами, в особенности фосфолипидами (табл. 2.1). Составляя всего 8–15% сухого вещества клетки, мембраны содержат 70–90% всех ее липидов.

Плазматическая мембрана состоит из двойного липидного слоя. Гидрофобные концы молекул фосфолипидов и триглицеридов направлены внутрь, а гидрофильные «головки» – наружу. Благодаря гидрофобным взаимодействиям между остатками жирных кислот, входящих в состав липидов, и электростатическому взаимодействию между гидрофильными

Таблица 2.1. Состав мембран *Micrococcus luteus (lysodeikticus)* и фототрофных бактерий

Компоненты	Содержание, % от сухой массы мембран	
	<i>M. luteus</i>	Пурпурные бактерии
Липиды	28–37	40–50
	9	10–20
	28	30
Белки	50	50
Гексозы	15–20	5–30

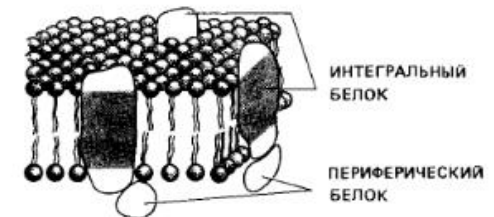
ми «головками» мембрана стабилизируется. В двойной слой липидов встроены белки – так называемые интегральные белки мембран. Они «плавают» в этом слое, будучи погружены в него частично, или же пронизывают его насквозь. Другие белки прикреплены к поверхности мембраны, и их называют периферийными белками (рис. 2.20). Некоторые мембраны, по-видимому, с одной или с обеих сторон покрыты сетью вытянутых белковых молекул.

Мембрану следует представлять себе как очень мягкое, пластичное, почти жидкое образование; изолированные мембраны стремятся образовать замкнутые со всех сторон пузырьки (везикулы); кусочки мембран сливаются краями друг с другом.

Плазматическая мембрана играет важнейшую роль в обмене веществ. Она служит осмотическим барьером клетки и контролирует как поступление веществ внутрь клетки, так и выход их наружу. В мембране имеются механизмы активного транспорта и системы субстрат-специфичных пермеаз. По-видимому, липидная пленка элементарной мембраны пронизана «мостиками» (или каналами) из белков, и именно эти белки служат порами, через которые осуществляется регулируемый транспорт веществ.

Ферменты переноса электронов и окислительного фосфорилирования, находящиеся у эукариот в митохондриях, у бактерий локализируются внутри или на поверхности плазматической мембраны. Цитохромы, железо-серные белки и другие компоненты электрон-транспортной цепи находятся исключительно в мембранах. Как показало детальное изуче-

Рис. 2.20. Модель структуры плазматической мембраны. В двойной слой липидов погружены интегральные белки. Периферические белки только примыкают к поверхности мембраны.



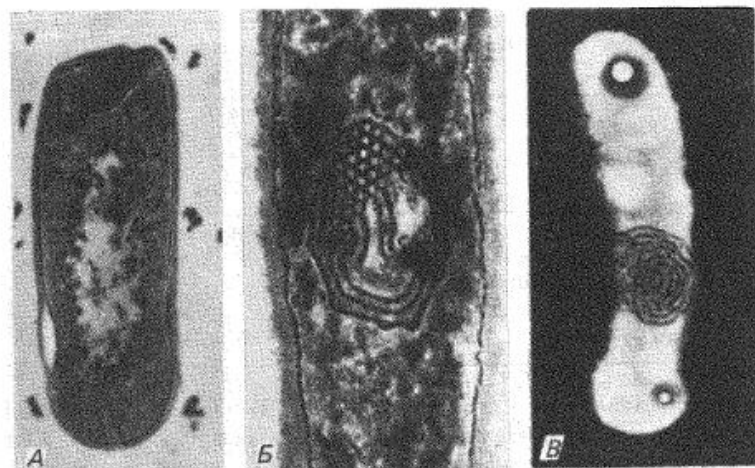


Рис. 2.21. Мезосомы. А. *Lactobacillus fermentum*, электронная микрофотография ультратонкого среза после фиксации четырехокисью осмия и дополнительного контрастирования уранилацетатом. (Фото F. Schötz.) Б. *Lactobacillus viridescens* (syn. *corynoides*) с плотно упакованными трубочками, лежащими параллельно или перпендикулярно к плоскости среза, (F. Schötz, J. G. Abo-Elnaga, O. Kandler, Z. Naturforsch., 20 [1965], 790.) В. Неидентифицированная бактерия (штамм 11х), электронная микрофотография, негативный контраст (фосфорновольфрамовая кислота). (Фото P. Hillmer, F. Amelunxen.)

ние локализации отдельных компонентов, мембрана построена асимметрично: например, цитохром с расположен в ее наружном слое, а АТФ-синтаза — на внутренней стороне мембраны. Мембрана характеризуется направленным обменом веществ (разд. 7.4). По-видимому, мембраны ответственны и за другие биосинтетические процессы, такие как синтез компонентов клеточной стенки и капсулы, а также за выведение внеклеточных ферментов. Наконец, весьма вероятно, что на мембране локализуется центр репликации РНК. Жгутики тоже прикреплены к плазматической мембране.

Внутриклеточные мембраны и ламеллы. У некоторых бактерий мембрана охватывает цитоплазму без складок и выпячиваний. У других она образует выпячивания, пронизывает цитоплазму или формирует мембранные тельца. У ряда бактерий описаны мезосомы (рис. 2.21). Правда, в этом случае, вероятно, речь идет об артефактах, связанных с приготовлением препаратов.

У *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* и *Nitrosococcus* имеются стопки ламелл, состоящие из параллельно расположенных плоских пузырьков, часть которых связана с плазматической мембраной (рис. 2.22 и 2.24).

Особенно богаты внутриклеточными мембранами фототрофные пурпурные бактерии. На ультратонких срезах фотосинтетические внутрен-

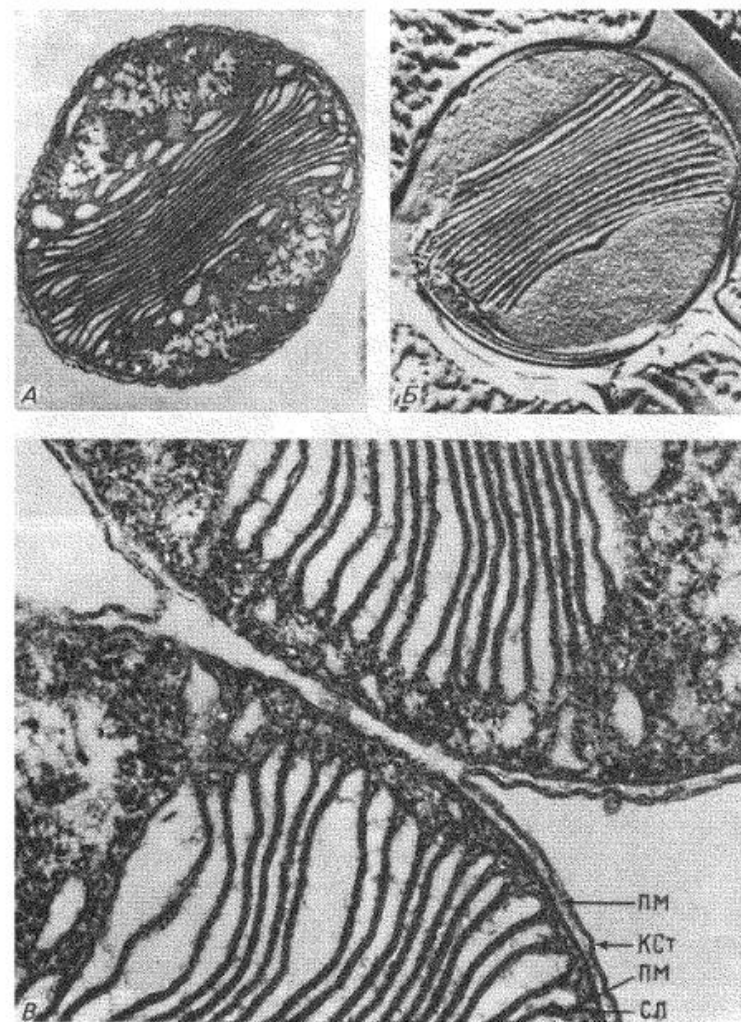


Рис. 2.22. Электронные микрофотографии нитрифицирующей морской бактерии *Nitrosococcus oceanus*: А и В — ультратонкие срезы (после фиксации OsO_4 (22 000 ×), В — препарат, полученный методом замораживания — травления (81 000 ×). (Rensen C. C., Valois F. W., Watson S. W., J. Bacteriol. 94 [1967], 422.) КСт — клеточная стенка; ПМ — плазматическая мембрана; СЛ — двойная ламелла.

ние мембранные системы имеют у них вид трубок, пузырьков или стопок. У *Rhodospirillum rubrum* или *Chromatium* клетка почти целиком заполнена пузырьками, которые упакованы в округлые образования (рис. 2.23). Эти пузырьки, по-видимому, возникают путем выпячивания

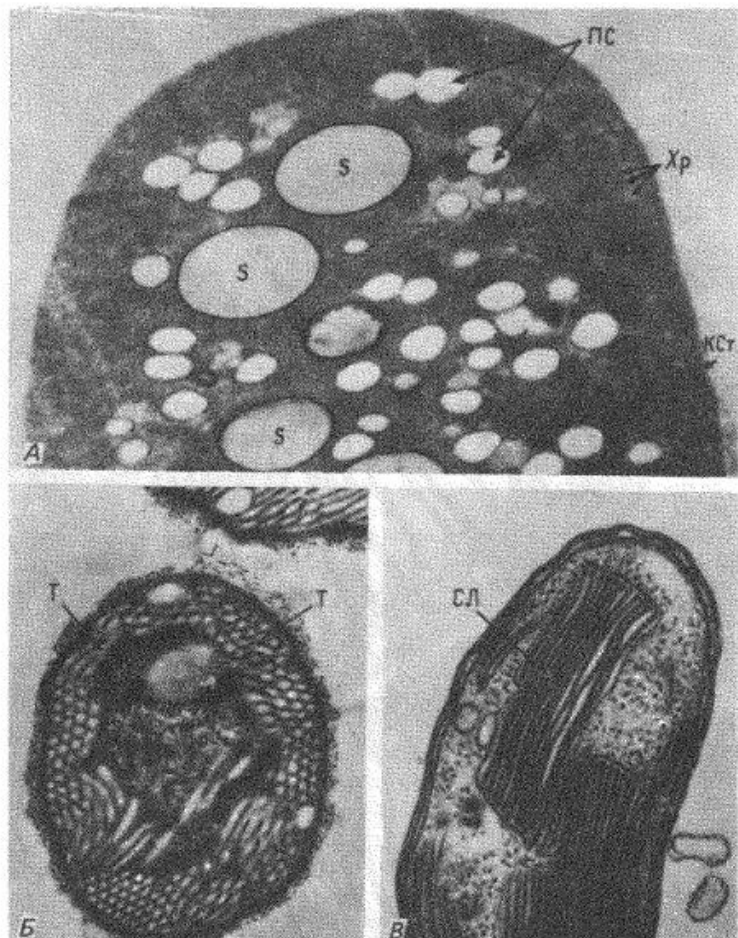


Рис. 2.23. Фотосинтетические пигменты у фототрофных пурпурных бактерий связаны с внутриклеточными мембранами. Увеличение поверхности мембран у различных видов бактерий достигается разными путями. У *Chromatium okenii* эти структуры имеют вид пузырьков, и их называют везикулами или хроматофорами (А). *Thiocapsa pfennigii* содержит тубулярные фотосинтетические мембраны (Б). У *Ectothiorhodospira mobilis* мембраны многократно сложены и образуют стопки ламелл (В). КСт – клеточная стенка; ПС – полисахаридные гранулы; СЛ – стопки ламелл; Т – тубулярные фотосинтетические мембраны; Хр – хроматофоры; S – включения серы. (Фото А – G. Kran; Б – K. Eimhjellen; В – C.C. Remsen et al., J. Bacteriol., 95 [1968], 2374.)

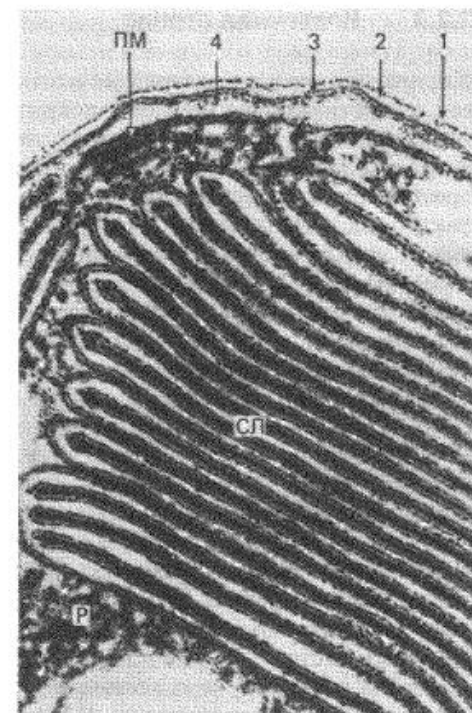


Рис. 2.24. *Ectothiorhodospira mobilis* со стопками фотосинтетических ламелл. Электронная микрофотография ультратонкого среза (150 000 ×). ПМ – плазматическая мембрана; Р – рибосомы; СЛ – стопка ламелл; 1 – наружный слой клеточной стенки; 2 – внутренний слой клеточной стенки; 3 и 4 – наружный и внутренний электропрозрачные промежуточные слои.

(инвагинации) плазматической мембраны и роста ее в форме рукава. На этом рукаве на равных расстояниях образуются перетяжки, и в результате получаются пузырьки, не отделенные полностью друг от друга. Только при разрушении и гомогенизации клеток эти пузырьки освобождаются, принимая вид изолированных структур, которые раньше иногда называли «хроматофорами». У других пурпурных бактерий пузырьки сильно уплощены и образуют упорядоченные стопки (рис. 2.23, 2.24); последние по аналогии со структурой хлоропластов зеленых растений называют стопками тилакоидов.

Фотосинтетические мембраны сходны по строению и химическому составу с плазматической мембраной (табл. 2.1), но, кроме того, содержат пигменты, поглощающие свет (бактериохлорофиллы и каротиноиды), а также компоненты фотосинтетической электрон-транспортной цепи (цитохромы, убихинон) и фосфорилирующей системы.

2.2.3 Клеточная стенка

Клеточная стенка у бактерий не жесткая, как стальной панцирь, а тонкая и эластичная, как кожаная покрывка футбольного мяча. Подобно тому как мячу придает упругость надутая камера, клеточной стенке придает определенную упругость плотно прилегающий к ней изнутри протопласт. Внутреннее давление (тургор) обусловлено осмотическими факторами. Осмотическим барьером служит плазматическая мембрана: она полупроницаема и контролирует проникновение в клетку и выход из нее растворенных веществ. В отличие от плазматической мембраны клеточная стенка проницаема для солей и других низкомолекулярных соединений.

Плазмолиз. В обычных условиях концентрация сахаров и солей — осмотически активных веществ — внутри клетки выше, чем в окружающей среде. Содержимое клетки по осмотическому давлению эквивалентно 10–20%-ному раствору сахаразы, и в клетку поступает столько воды, сколько допускает растяжимость ее стенки. Если повысить осмотическое давление внешней среды (например, путем добавления сахаров или мочевины), вода будет оттягиваться из клетки. В конце концов протопласт сожмется и плазматическая мембрана отделится от клеточной стенки. Такой процесс, происходящий в гипертонической среде, называют плазмолизом. Именно явление плазмолиза у крупных бактериальных клеток позволяет нам убедиться в том, что плазматическая мембрана у них окружена клеточной стенкой. Как плазматическую мембрану, так и клеточную стенку окрашивает водорастворимый основной краситель виктория синий.

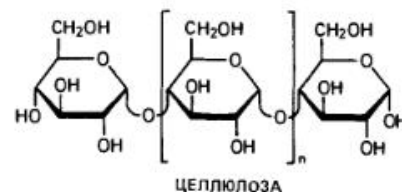
Окрашивание по Граму. Клеточная стенка, по-видимому, ответственна также за окрашивание по Граму. Способность или, наоборот, неспособность окрашиваться в темно-фиолетовый цвет при использовании метода, предложенного в 1884 г. Грамом, служит важным таксономическим признаком, с которым коррелируют другие свойства бактерий. Процедура окрашивания по Граму начинается с обработки фиксированных бактериальных клеток основным красителем кристаллическим фиолетовым. Затем следует обработка раствором иода. Иод образует с кристаллическим фиолетовым комплекс, нерастворимый в воде и плохо растворимый в спирте и ацетоне. После этого клетки «дифференцируют», обрабатывая их спиртом: грам-положительные клетки удерживают при этом комплекс краситель—иод и остаются синими, а грам-отрицательные обесцвечиваются. Для того чтобы сделать их видимыми, их дополнительно окрашивают контрастным красителем фуксином.

Если после окрашивания по Граму обработать грам-положительные клетки лизоцимом, протопласты останутся окрашенными, однако под действием спирта они обесцвечиваются. Прорастающие споры *Bacillus subtilis* и первые генерации клеток после прорастания спор ведут себя как грам-отрицательные организмы. Лишь позднее они становятся

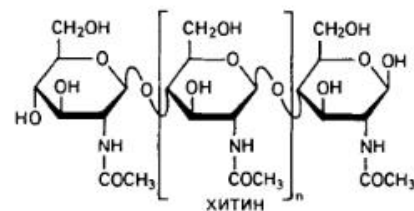
грам-положительными. Эти наблюдения показывают, что окрашивающий комплекс находится в протопласте или на его поверхности и что у грам-положительных бактерий его удерживает главным образом клеточная стенка, которая препятствует его экстрагированию.

Основной «каркас» стенки бактериальной клетки. Для понимания структуры клеточной стенки бактерий важно прежде всего указать на сходство ее опорного «скелета» с полимерами β -D-глюкозы — целлюлозой и хитином.

Целлюлоза — главный компонент клеточных стенок у высших растений, водорослей и оомицетов. У бактерий целлюлоза в качестве материала клеточной стенки не встречается, однако она соединяет клетки *Sarcina ventriculi* в большие пакеты. Кроме того, целлюлозу выделяют *Acetobacter aceti* subsp. *xylum* в форме тонких фибрилл в среду, и она придает пленке «уксусного гриба» (*Mycoderma aceti*) прочную кожистую консистенцию.



Хитин — материал наружного скелета членистоногих и некоторых других животных. Он является важнейшим компонентом клеточных стенок больших групп грибов (базидиомицетов, аскомицетов и зигомицетов). Структурными элементами хитина являются остатки N-ацетилглюкозамина, соединенные между собой подобно глюкозным остаткам в целлюлозе, т. е. 1,4-гликозидными связями.



Опорный скелет бактериальной стенки тоже состоит в значительной степени из однородного полимера — пептидогликана **муреина**. Эта макромолекула — гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравовой кислоты (N-ацетилглюкозаминлактата), соединенные между собой β -1,4-гликозидными связями.

Такие неразветвленные гетерополимерные цепи образуют основу муреина. Остатки муравовой кислоты через лактильные группы соеди-

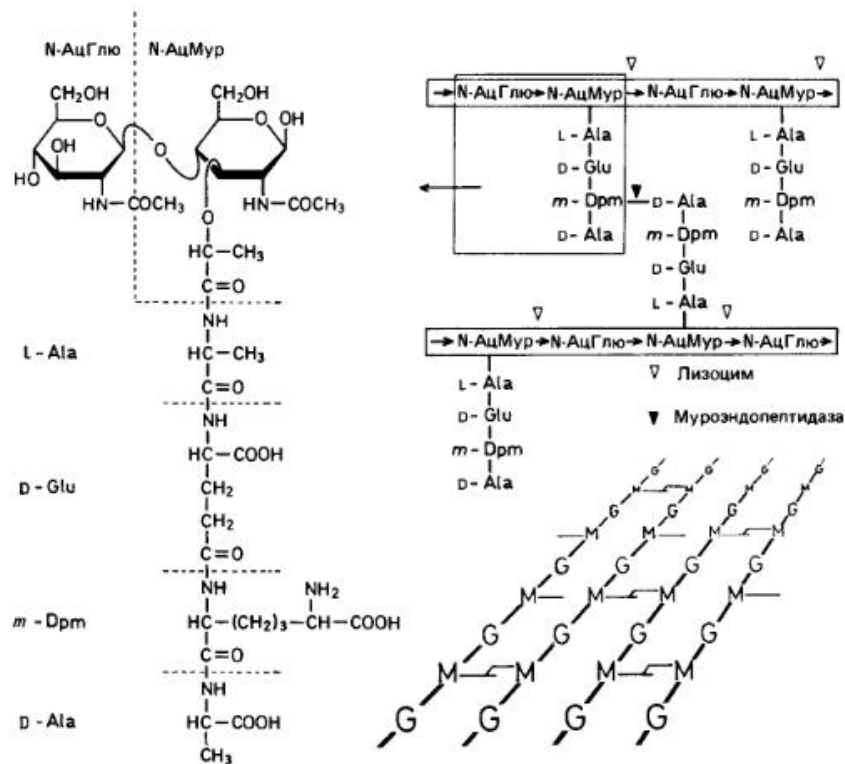


Рис. 2.25. Структура муреина *Escherichia coli*. Гетерополимерные цепочки, состоящие из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина (N-АцГлю) и N-ацетилмурамовой кислоты (N-АцМур), связаны между собой пептидными мостиками. Слева — детальное строение фрагмента, изображенного справа в рамке. Треугольниками отмечены связи, расщепляемые лизоцимом (мурамидазой) и специфической муросэнодэпéтидазой. Справа внизу — схематическое перспективное изображение структуры однослойного поперечношитого муреинового мешка, состоящего из N-АцГлю (G) и N-АцМур (M). m-Dpm — мезо-диаминопимелиновая кислота.

нены пептидной связью с аминокислотами. К типичным аминокислотам муреина относятся L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота или L-лизин и D-аланин. Диаминокислоты мезо- (или LL-) диаминопимелиновая кислота и L-лизин играют большую роль в межмолекулярных сшивках, так как образуют пептидные связи с участием обеих аминогрупп и, таким образом, могут связать две гетерополимерные цепи между собой (рис. 2.25). Место диаминопимелиновой кислоты или лизина могут занять орнитин или диаминомасляная кислота. Пептидными мостиками гетерополимерные цепи связаны между собой в мешкообразную гигантскую молекулу — муреиновый мешок.

Классическая модель, согласно которой эти цепи образуют замкнутые кольца, которые в клеточной стенке палочковидной бактерии расположены как обручи или перпендикулярно к ним, явно несостоятельна. Скорее всего длина гетерополимерных цепей составляет не больше десятой части окружности бактерии. По-видимому, цепи, состоящие из 50–500 дисахаридных звеньев (N-ацетилглюкозамина + N-ацетилмурамовая кислота), связаны между собой пептидными мостиками и образуют менее регулярную сеть, чем предполагалось прежде.

Особого внимания заслуживает то, что в бактериальной стенке содержатся структуры и вещества, которых нет у животных и растений: таковы, например, чередующаяся последовательность N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты; не встречающаяся в составе белков мезо-диаминопимелиновая кислота; D-формы аланина и глутаминовой кислоты. Эти структурные элементы составляют ахиллесову пятку бактерий, используемую врачами в борьбе с инфекцией. По компонентам и структуре клеточной стенки и биохимическим механизмам ее синтеза бактерии коренным образом отличаются от животных и растений. Поэтому лекарственные препараты, специфически воздействующие только на бактериальные стенки и на процесс их синтеза, должны быть безвредными для высших организмов.

Наличие в клеточных стенках пептидогликанового слоя — характерная особенность всех прокариот. Исключение составляют только архебактерии и немногие другие группы и виды.

Муреиновый мешок выполняет функцию опорного каркаса клеточной стенки. На нем откладываются и его инкрустируют различные другие вещества. По строению этого каркаса, а также по содержанию других веществ в клеточной стенке грам-положительные бактерии отличаются от грам-отрицательных.

Клеточная стенка грам-положительных бактерий. У грам-положительных бактерий доля муреиновой сетки составляет 30–70% сухой массы клеточной стенки (толщиной в 40 слоев). Вместо м-диаминопимелиновой кислоты часто содержатся LL-диаминопимелиновая кислота или лизин. У *Staphylococcus aureus* тетрапептидные боковые цепи мурамовой кислоты связаны между собой межпептидными (например, пентаглициновыми) цепочками. Участвующие в образовании таких структур аминокислоты варьируют от вида к виду. Видоспецифическое строение опорного каркаса представляет собой хороший таксономический признак. В клеточной стенке грам-положительных бактерий полисахариды, если они вообще имеются, связаны между собой ковалентно. Содержание белков невелико. Характерная особенность — наличие тейхоевых кислот; это цепи, состоящие из 8–50 остатков глицерола или рибитола, связанных между собой фосфатными мостиками. Некоторые из тейхоевых кислот содержат эритритол или маннитол. Тейхоевые кислоты, вероятно, через фосфат связаны с муреином по типу амида.

Клеточная стенка грам-отрицательных бактерий. У грам-отрицательных бактерий муреиновая сеть однослойная (рис. 2.25) и составляет

менее 10% сухой массы клеточной стенки (у *Escherichia coli*). Муреин содержит только мезо-диаминопимелиновую кислоту и не содержит лизина; межпептидные мостики отсутствуют. Строение муреинового мешка у всех грам-отрицательных бактерий одинаково. Наряду с этим опорным каркасом имеются большие количества липопротеинов, липополисахаридов и других липидов, которые как бы наклеены снаружи на муреиновый каркас. Они связаны ковалентно и составляют до 80% сухой массы клеточной стенки. Для сохранения стабильности липополисахаридного слоя, по-видимому, необходимы ионы кальция. У многих грам-отрицательных бактерий муреиновый слой становится доступным для воздействия лизирующего муреин фермента лизоцима только после обработки ЭДТА (этилендиаминтетраацетатом) для удаления Ca^{2+} . Этот комплексобразующий агент вызывает освобождение части липополисахаридов. Тейхоевые кислоты у грам-отрицательных бактерий до сих пор не были обнаружены.

Действие лизоцима и пенициллина. Структура клеточной стенки и мурина была выяснена в основном в связи с изучением действия лизоцима и пенициллина на бактерии. Открытый А. Флемингом (1922) лизоцим является бактерицидным ферментом, содержащимся в слезной жидкости, в носовой слизи и в яичном белке; лизоцим выделили также из бактерий (*Escherichia coli*, *Streptomyces*) и бактериофагов. При воздействии лизоцима на суспензию грам-положительных бактерий наблюдают быстрое ее просветление. *Micrococcus luteus* (*lysodeikticus*) лизируется уже при концентрации 1 мкг лизоцима на 1 мл. Для лизиса клеток *Bacillus megaterium* необходима концентрация лизоцима 50 мкг/мл, а многие грам-отрицательные бактерии растворяются только тогда, когда к суспензии добавлен также комплексобразующий агент (ЭДТА).

Лизоцим разрывает в муреине гликозидную связь между углеродом 1 N-ацетилмурамовой кислоты и углеродом 4 N-ацетилглюкозамина. При этом полисахаридные цепи расщепляются до дисахаридных фрагментов, состоящих из этих двух сахаров (рис. 2.25). Таким образом, лизоцим является N-ацетилмурамидазой.

Можно избежать полного разрушения бактериальных стенок, проводя лизис в изотоническом или слабо гипертоническом (0,1–0,2 М) растворе сахарозы. В этих условиях под действием лизоцима из клеток образуются чрезвычайно чувствительные к осмотическим условиям округлые «протопласты». В гипертонических и изотонических средах протопласты стабильны; в гипотонических средах они лопаются, после чего остаются лишь «тени» (остатки плазматических мембран). Протопластами следует называть только такие округлившиеся клетки, у которых нет никаких остатков клеточной стенки, т. е. нельзя обнаружить ни мурамовой кислоты, ни специфической аминокислоты клеточной стенки — диаминопимелиновой, не встречающейся в белках. Лизис клеточной стенки не приводит к нарушению метаболизма; протопласты дышат подобно intactным клеткам, образуют споры, если процесс спо-

руляции уже был инициирован, но не адсорбируют фагов.

Наряду с лизоцимом существует много других ферментов, лизирующих муреиновый каркас. Мурозидопептидазы, чаще всего получаемые из бактерий, весьма специфическим образом расщепляют пептидные связи, участвующие в поперечной сшивке. Например, выделенная из *E. coli* эндопептидаза разрывает связь между D-аланином и мезо-диаминопимелиновой кислотой (отмеченную на рис. 2.25). Другие ферменты расщепляют связи в иных местах.

Антибиотик пенициллин действует главным образом на грам-положительные бактерии (стафилококки и пневмококки), а также и на некоторые грам-отрицательные клетки (гонококки, менингококки, энтеробактерии), убивая их. Однако его бактерицидному действию подвержены только растущие бактерии; нерастущие, «покоящиеся» клетки остаются незатронутыми. Самый примечательный феномен, наблюдаемый при воздействии пенициллина, — это появление так называемых L-форм, которые образуются из нормальных бактериальных клеток в результате несбалансированного роста в длину и в толщину. При этом исходные палочковидные клетки увеличиваются в объеме во много раз (см. разд. 3.19). На агаризованных питательных средах такие гигантские клетки могут некоторое время сохранять жизнеспособность. Если воздействовать пенициллином на растущие клетки в гипотоническом растворе, то они лопаются. В изо- и гипертонических средах палочки превращаются в шаровидные образования (рис. 2.26), получившие название L-форм или «сферопластов». Последние отличаются от протопластов тем, что сохраняют остатки клеточной стенки (анализ обнаруживает следы мурамовой и диаминопимелиновой кислот). Пенициллин нарушает процесс образования клеточной стенки.

Образование клеточной стенки. Биосинтез и встраивание структурных компонентов мурина в пептидогликановый скелет можно разделить на три этапа (рис. 2.27). Первые стадии биосинтеза осуществляются в цитоплазме. Здесь образуется пентапептид мурамовой кислоты. Синтез начинается с образования N-ацетилглюкозамин-1-фосфата; в ряде по-

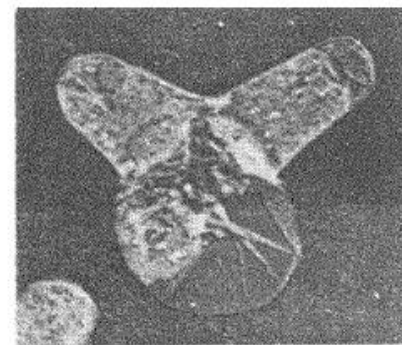


Рис. 2.26. *Escherichia coli* после обработки пенициллином (100 ед. на 1 мл питательной среды, 90 мин). 9000 ×. (Фото Н. Франк.)

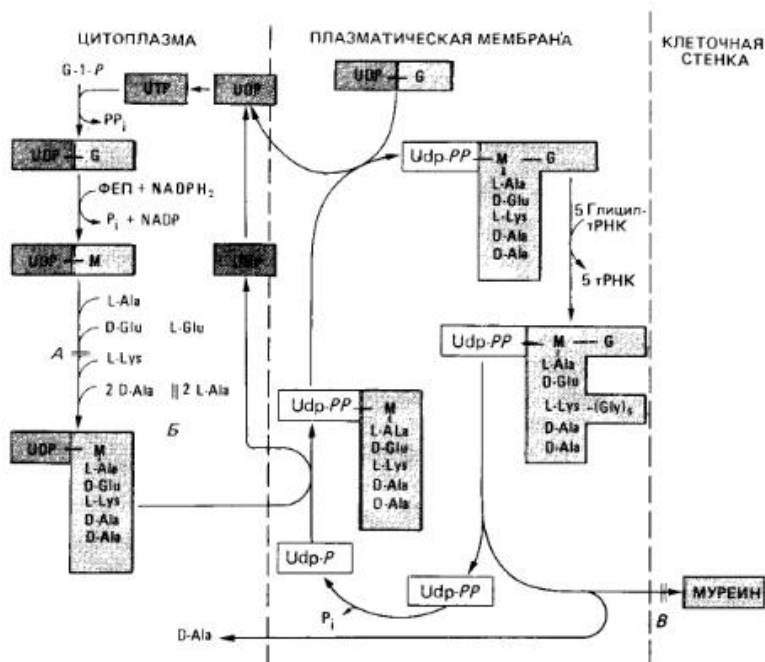


Рис. 2.27. Биосинтез муреина у *Staphylococcus aureus*. Три этапа синтеза разделены прерывистыми линиями. Они протекают в цитоплазме, на плазматической мембране и в клеточной стенке. G = N-АцГлю-N-ацетилглюкозамин; M = N-АцМур-N-ацетилмурамовая кислота; Удп-и-ундекапиренил. Синтез клеточной стенки прекращается, если (А) отсутствует диаминокислота (лизин), (Б) рацемизация L-аланина в D-аланин и (или) его включение в пептид ингибированы С-циклосерином (оксамидином) или (В) пенициллин препятствует сшивке пептидных цепей.

следовательных ферментативных реакций образуется лактиловый эфир, к которому присоединяются пять аминокислот. Во время этого процесса растущая молекула остается связанной с UDP (уридиндифосфатом), который служит носителем. Связывание пентапептида мурамовой кислоты с N-ацетилглюкозамин и присоединение пяти остатков глицина происходит на втором этапе синтеза на плазматической мембране. Для осуществления этого этапа гидрофильная молекула должна быть превращена в липофильную, что достигается путем замены UDP C₅₅-полиизопреноидом — ундекапиренилфосфатом. Это соединение делает возможным перенос готового компонента клеточной стенки через плазматическую мембрану. На третьем этапе происходит его встраивание в пептидогликановый скелет и образование пептидных связей. Эта поперечная сшивка осуществляется путем транспептидирования, при котором расщепляется связь между двумя остатками D-аланила и освобожденная карбоксильная группа связывается с аминогруппой лизина

второго олигопептида, а концевой D-аланин освобождается. При встраивании освобождается также ундекапиренилдифосфат; он подвергается гидролизу, и получающийся ундекапиренилмонофосфат используется в следующем цикле. Этот же липид служит переносчиком и при синтезе других полимеров, расположенных вне цитоплазматической мембраны, таких как полисахариды, липополисахариды и целлюлоза.

Пенициллин не влияет на синтез структурных компонентов муреина но препятствует поперечной сшивке, осуществляемой путем транспептидирования; однако удлинению гетерополимерных цепей путем трансгликозилирования он не мешает. В результате воздействия пенициллина ряд бактерий выделяет в среду наряду с UDP-пентапептидом также и несшитые пептидогликановые цепи. Образование клеточной стенки могут нарушать и производные пенициллина; подобным же образом действуют цефалоспорины, ристоцетины, ванкомицин, бацитрацин и циклосерин. Сфероласты возникают также в присутствии глицина и D-аминокислот или в результате так называемого анаэробного лизиса.

Наружные слои клеточных стенок грам-отрицательных бактерий. У этих бактерий поверх однослойного или самого большого двуслойного муреинового мешка располагается наружный слой клеточной стенки. На ультратонких срезах бактерий он сходен по виду с плазматической мембраной — это так называемая **наружная мембрана**. Этот слой стенки состоит из белков, фосфолипидов и липополисахаридов (рис. 2.28).

Со слоями муреина — по-видимому, через диаминопимелиновую кислоту — ковалентно связаны липопротеины; они ориентированы своими липофильными концами наружу и таким образом закреплены в липофильном двойном слое (благодаря гидрофобному взаимодействию). В этом слое находятся фосфолипиды и гидрофобные концы липополисахаридов; гидрофильные же концы последних обращены наружу.

Липополисахариды приобрели большое значение в бактериологической диагностике и в распознавании эпидемий. Разные штаммы *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* и другие возбудители кишечных заболеваний отличаются друг от друга так называемыми O-специфическими боковыми цепями липополисахаридов, образующими наружный слой клеточной стенки. Незначительные различия в составе этого слоя могут быть распознаны с помощью иммунологических методов. По серологическим реакциям в роде *Salmonella* удалось выделить более тысячи видов и штаммов. Химический анализ подтвердил существование различий, выявленных серологическими методами (Вестфаль). Есть местные расы сальмонелл, которые можно идентифицировать по иммунохимическим особенностям. Это часто позволяет установить, где произошло заражение больного или откуда начала распространяться эпидемия; можно, например, выяснить, где получил данный больной кишечную инфекцию — в южноамериканском или же в восточноазиатском городе.

Штаммы бактерий, выделенные из природного источника или от

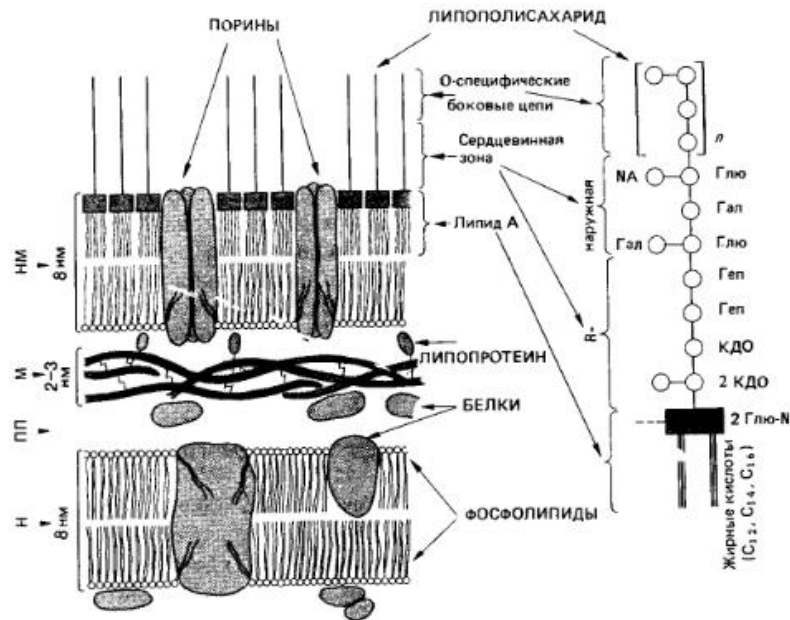


Рис. 2.28. Модель строения клеточной стенки грам-отрицательных бактерий. Непосредственно с цитоплазматической мембраной граничит муреиновый слой; с ним ковалентно связаны гидрофильные концы липопротеиновых молекул. Последние своими липофильными концами утоплены в липидный двойной слой, который содержит фосфолипиды и липид А, входящий в состав липополисахаридов. Гидрофильные О-специфические гетерополисахаридные боковые цепи полисахаридов направлены наружу (на схеме вверх). Справа представлена липополисахаридная молекула. Глю – глюкоза; Глю-Н – глюкозамин; NA = N-АцГлю – N-ацетилглюкозамин; Гал – галактоза; Геп – гептоза; КДО – 2-кето-3-дезоксооктоновая кислота; М – муреин; НМ – наружная мембрана; ПМ – плазматическая мембрана; ПП – периплазматическое пространство.

больного, обычно растут на агаре в форме гладких, блестящих колоний (S-формы, от англ. smooth); их поверхность благодаря наличию в ней О-специфических полисахаридных цепей содержит много воды. Эти S-формы спонтанно превращаются в R-формы (от англ. rough), обычно образующие шероховатые плоские колонии (рис. 2.29). Очевидно, полисахаридные цепи дают бактериям определенное преимущество в процессе отбора. Например, в организме животного-хозяина бактерии могут быть устойчивы к фагоцитирующим лейкоцитам и поэтому крайне вирулентны. Только образование антител и связывание этих антител бактериальными полисахаридами создают условия для уничтожения бактерий. Огромное разнообразие О-специфических полисахаридов у патогенных бактерий можно объяснить отбором все новых мутантных типов О-антигенов; новые типы дают преимущество, так как хозяин не

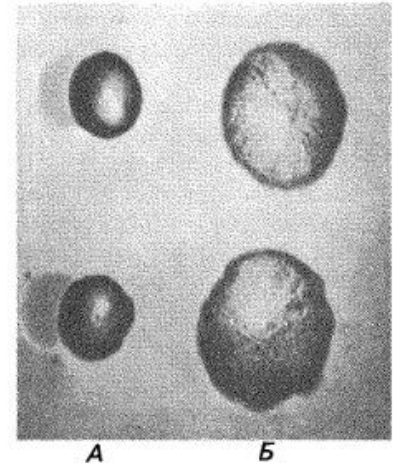


Рис. 2.29. Формы колоний бактерии *Salmonella paratyphi* В. А – S-форма; Б – R-форма. (Фото Е. Kröger.)

может обладать антителами против сотен антигенов одновременно. Липополисахариды относятся к наиболее действенным эндотоксинам бактерий, они вызывают у больных повышение температуры и понос.

Липополисахариды *Salmonella typhimurium* и других энтеробактерий были весьма основательно изучены. В молекуле липополисахарида следует различать три участка: липид А, сердцевинную область и О-специфическую боковую цепь (рис. 2.28). Липид А включает глюкозаминдисахарид, к гидроксигруппам которого присоединены эфирными связями жирные кислоты; эта часть молекулы обладает гидрофобными свойствами. Далее по направлению кнаружи находится R-сердцевинная зона – трисахарид, состоящий из трех остатков 2-кето-3-дезоксооктоновой кислоты (КДО) и связанный также с фосфотаноламином; затем следуют две молекулы гептозы и наружная сердцевинная зона. Последняя состоит из разветвленной цепи, содержащей глюкозу, галактозу и N-ацетилглюкозамин. Эта базовая структура одинакова у всех сальмонелл. У R-мутантов молекула короче – она оканчивается трисахаридом КДО; мутанты, лишённые КДО, никогда не встречались – они, вероятно, нежизнеспособны. К сердцевинной зоне примыкают О-специфические боковые цепи; это длинные цепи из повторяющихся олигосахаридов, которые могут содержать галактозу, маннозу, рамнозу, абеквону, фукозу, колитозу и другие сахара в последовательности, варьирующей от штамма к штамму. Восстанавливающие С1-концы сахаров ориентированы внутрь. Наружная гетерополисахаридная цепочка штаммоспецифична и представляет (соматические) О-антигены (разд. 2.2.5). Она позволяет опознать штамм с помощью упомянутых выше иммунохимических методов.

Функция наружной мембраны. Наружная мембрана грам-отрицательных бактерий выполняет не только механические, но и важные физиологические функции. В ее двойной липидный слой, состоящий из липида А, полисахаридов и фосфолипидов, встроены белки, пронизывающие этот слой насквозь. Вероятно, эти трансмембранные белки представляют собой заполненные водой каналы – гидрофильные поры в липофильной мембране; поэтому их называют **поринами**. Существует

несколько различных поринов. Они пропускают через мембрану гидрофильные низкомолекулярные вещества (вплоть до мол. массы порядка 6000).

Наружная мембрана плотно прилегает к муреиновому слою и связана с ним липопротеинами. Муреиновый слой, видимо, свободно пропускаем для различных веществ. Промежуток между муреином и плазматической мембраной называют **периплазматическим пространством**. В нем находятся белки, в том числе деполимеразы (протеиназы, нуклеазы, например рестрикционный фермент EcoRI), периферические белки плазматической мембраны и так называемые связующие белки. Последние участвуют в переносе некоторых субстратов в цитоплазму и служат рецепторами хемотаксических стимулов. Периплазматическое пространство, по всей вероятности, играет также роль в осморегуляции.

2.2.4 Капсулы и слизь

На клеточные стенки многих бактерий наслаиваются снаружи более или менее толстые слои сильно оводненного материала с высоким содержанием воды — капсулы и слизь. Такие покровы не имеют для бактерий жизненно важного значения, но обладание капсулой придает некоторым патогенным бактериям резистентность к фагоцитозу и тем самым повышает их вирулентность для подопытных животных.

Капсулы. Капсулы можно увидеть с помощью светового микроскопа, если добавить к препарату такие красители, как нигрозин, конго красный или китайскую тушь, которые в капсулу не проникают. Получается негативное контрастирование; светлая капсула выделяется на темном фоне (рис. 2.30 и 2.31). Более тонкие капсулы пневмококков становятся видимыми при добавлении гомологичной антисыворотки; при этом происходит отложение белка антител. Наблюдаемая картина напоминает набухание («реакция набухания» Нейфельда). В большинстве случаев капсула состоит из полисахаридов (у *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *Xanthomonas*, коринебактерий). Капсульные полисахариды помимо глюкозы содержат аминсахара, рамнозу, 2-кето-3-дезоксигалактоновую кислоту, уроновые кислоты и такие органические кислоты, как пировиноградная и уксусная. Капсулы некоторых видов *Bacillus* (*B. anthracis*, *B. subtilis*) состоят из полипептидов, в первую очередь полиглутаминовой кислоты.

Слизи. Многие компоненты капсулы выделяются в окружающую среду в виде слизи. Иногда путем встряхивания или гомогенизации бактериальной взвеси можно удалить капсулы с поверхности клеток и затем выделить слизь из питательной среды. Особенно обильное образование слизи наблюдается у многих микроорганизмов в тех случаях, когда среда содержит сахарозу. Известный пример — бактерия *Leuconostoc mesenteroides* (представитель гетероферментативных молочнокислых бактерий), которая быстро превращает раствор, содержащий тростниковый сахар, в декстрановый студень, за что ее на сахарных за-

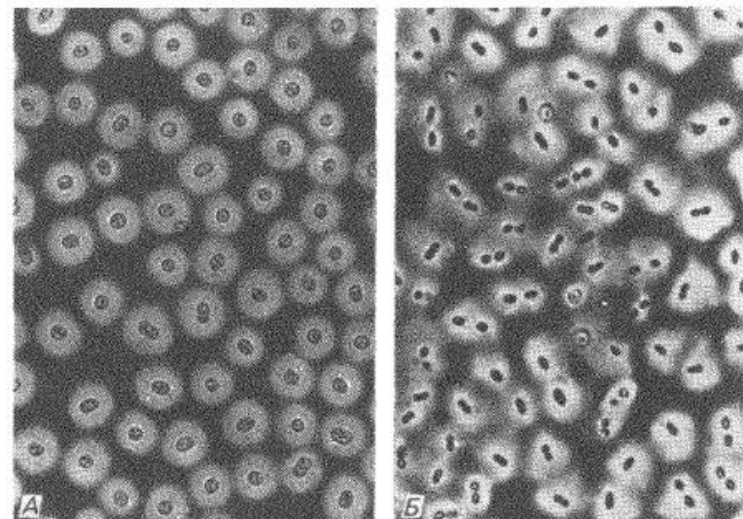
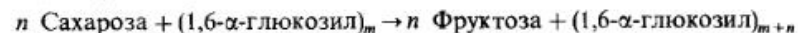


Рис. 2.30. Капсулы бактерий — пурпурной серобактерии *Amoebobacter roseus* (А) и азотфиксирующей бактерии *Azotobacter chroococcus* (Б). Клетки суспендированы в туши. (А — 1200 ×; фото N. Pfennig. Б — 500 ×; фото D. Claus.)

водах называют «бактерией лягушачьей икры». Это превращение происходит вне клетки и катализируется внеклеточной гексозилтрансферазой — декстрансахарозой:



Декстран — это полисахарид, который состоит из остатков α -D-глюкозы, соединенных в положении 1,6; иначе говоря, это 1,6- α -глюкан. Параллельные полисахаридные цепочки связаны в единую сеть. Декстран входит в состав кровезаменителей, используется для повышения вязкости водных растворов и служит основой декстранового геля (сефадекса).

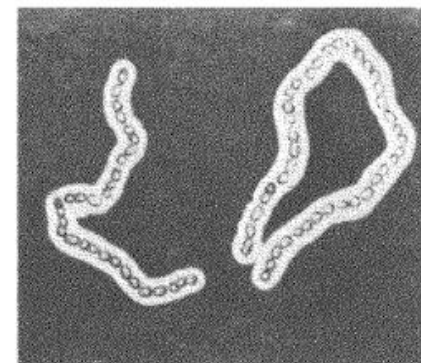


Рис. 2.31. Капсулы бактерий. Цепочки клеток *Bacillus megaterium*, суспендированные в туши. На темном фоне частичек туши капсулы выделяются как светлые зоны. Фазовый контраст, 1000 ×. (Фото G. Bohlken, Diss., Göttingen, 1965.)

Стрептококки, вызывающие кариес (разрушение зубов), в том числе *Streptococcus mutans* и *S. salivarius*, выделяют другую гексозилтрансферазу, превращающую сахарозу в полифруктозы (леваны). Эти полисахариды откладываются на поверхности зубов и служат матриксом, в котором накапливаются кислые продукты брожения, вызываемого стрептококками, главным образом молочной кислотой.

Влагалища (или чехлы). Влагалищами называют трубковидные чехлы нитчатых бактерий, называемых хламидобактериями (*Sphaerotilus natans* и *Leptothrix ochracea*). Они состоят из гетерополисахарида, содержащего глюкозу, глюкуроновую кислоту, галактозу и фукозу.

Направленное выделение слизи в форме **стебелька** обеспечивает некоторым бактериям (например, *Gallionella ferruginea*) возможность ограниченного перемещения; слизь может также связывать отдельные клетки в длинные ленты (*Zoogloea ramigera*, рис. 2.32) или кожистые пленки (*Bacterioglea*). *Acetobacter aceti* subsp. *xulinum* выделяет целлюлозу, которая объединяет клетки в прочную кожистую пленку ("*Mycoderma aceti*").

Клетки *Sarcina ventriculi* (рис. 2.33) и *Lampropedia hyalina* склеиваются целлюлозой в агрегаты правильной формы. Целлюлоза в этих случаях служит связующим веществом и по своей структуре и функции отли-

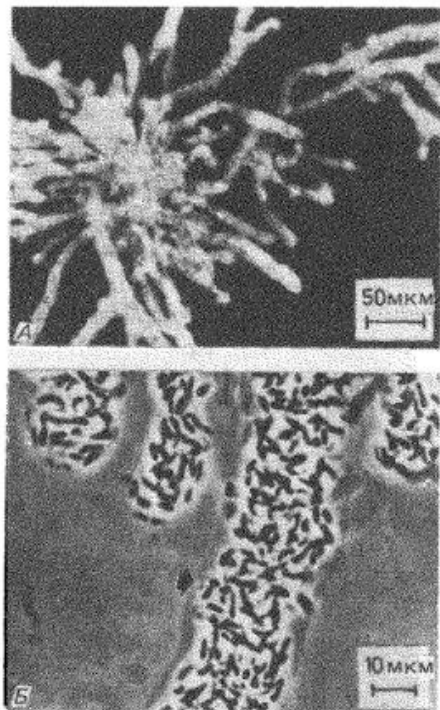


Рис. 2.32. Строение колоний *Zoogloea ramigera*. А – типичная форма колоний; Б – отдельные клетки в слизистом основном веществе. (Unz R.F., Dondero N.C., Canad. J. Microbiol., 13 [1967] 1671.)

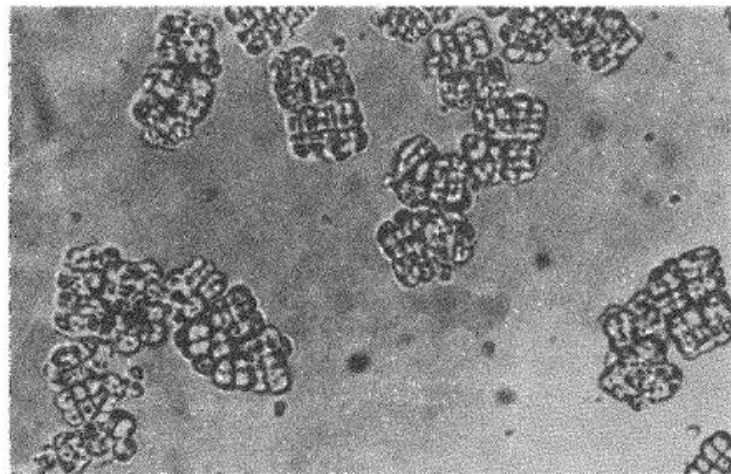


Рис. 2.33. Пакеты клеток *Sarcina ventriculi*, выросшие в питательной среде. (Снимок в светлом поле, 750 ×; фото D. Claus.)

чается от веществ капсулы. Утрата способности к образованию целлюлозы в результате мутации не влияет на способность микроорганизмов расти.

Биосинтез. Полисахариды, находящиеся снаружи от клеточной стенки, называют экзополисахаридами. По физическим свойствам различают капсулы и слизи. Когда экзополисахариды относительно прочно связаны с клеточной стенкой, говорят о капсулах; если же связь непрочная или ее вообще нет, говорят о слизи.

Что касается биосинтеза экзополисахаридов, то следует отметить два момента: 1) декстраны и леваны синтезируются внеклеточными ферментами из дисахаридов; 2) состав большинства экзополисахаридов независим от используемого субстрата – путь их биосинтеза сходен с механизмом построения муреина или липополисахаридов. Во всех трех процессах участвуют УТР и липид ундекапентилдифосфат (C_{55} -полиизопреноид). Активированные уридинтрифосфатом сахара (УТР-сахара) присоединяются к липиду-переносчику, комбинируются, образуя видоспецифические гомо- или гетерополимерные структурные компоненты будущего полисахарида, и выводятся из протопласта в наружные слои клеточной стенки, где связываются в макромолекулярный экзополисахарид.

2.2.5 Жгутики и подвижность

Подвижность бактерий может обеспечиваться различным образом. У большинства активно передвигающихся, плавающих бактерий движение обусловлено вращением жгутиков. Двигаться без жгутиков спо-

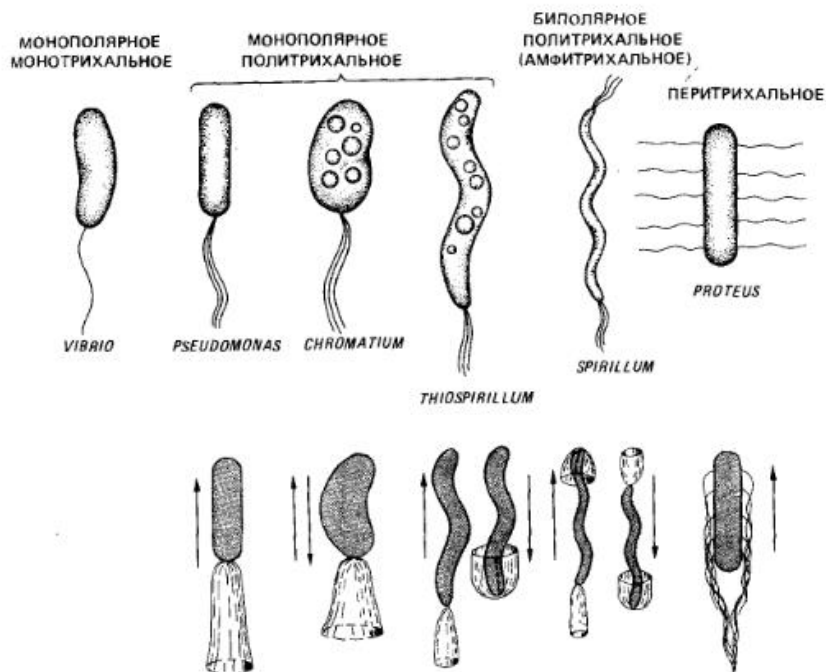


Рис. 2.34. Основные типы жгутикования и типы движения бактерий.

способны скользящие бактерии (к которым относятся миксобактерии, цианобактерии и некоторые другие группы) и спирохеты. О механизмах их движения будет сказано при рассмотрении соответствующих групп бактерий.

Расположение жгутиков. Расположение жгутиков у подвижных бактерий — это признак, характерный для определенных групп, поэтому оно имеет таксономическое значение. У палочковидных бактерий жгутики могут прикрепляться **полярно** или **латерально** (рис. 2.34). Среди бактерий с монополярным жгутикованием лишь немногие снабжены только одним, но зато особенно толстым жгутиком — это монотрихи (*Vibrio metschnikovii*, рис. 2.35; *Caulobacter* sp.). У многих бактерий с монополярным и биполярным жгутикованием одиночный по виду жгутик в действительности представляет собой пучок из 2–50 жгутиков (политрихи). Монополярно-политрихальное расположение жгутиков называют также **лофотрихальным** (как у *Pseudomonas*, *Chromatium*), а биполярно-политрихальное — **амфитрихальным** (у *Spirillum*). У *Selenomonas* имеется один пучок жгутиков, прикрепленный сбоку (рис. 2.36,Б). При **перитрихальном** расположении (как у *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* и некоторых других бактерий) жгутики располагаются по бокам клетки или на всей поверхности (рис. 2.36,А).

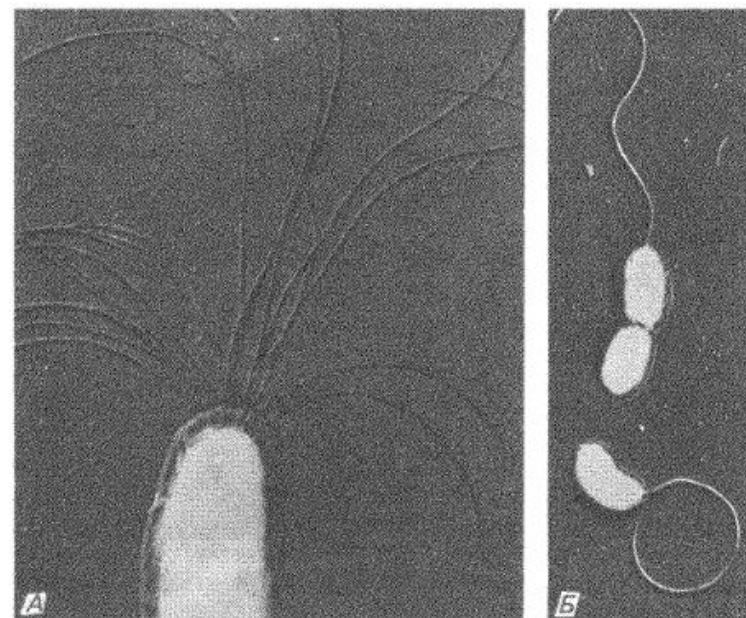


Рис. 2.35. Типы жгутикования (электронные микрофотографии). А. *Aquaspirillum serpens* с полярно расположенным пучком жгутиков (перитрих); 11 000 ×. Б. *Vibrio metschnikovii* с полярно расположенным одиночным жгутиком (монотрих); 7100 ×. (Напыление металлом; фото W. van Iterson.)

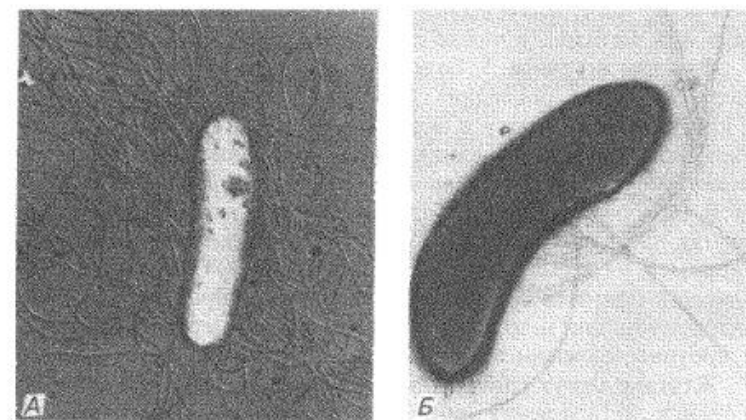


Рис. 2.36. Типы жгутикования (электронные микрофотографии). А. *Proteus mirabilis* с перитрихальным расположением жгутиков (косое напыление платины с палладием, 9500 ×; фото Н. Frank). Б. *Selenomonas ruminantium* с латеральными жгутиками (негативный контраст, 4080 ×; фото V. Kingsley.)

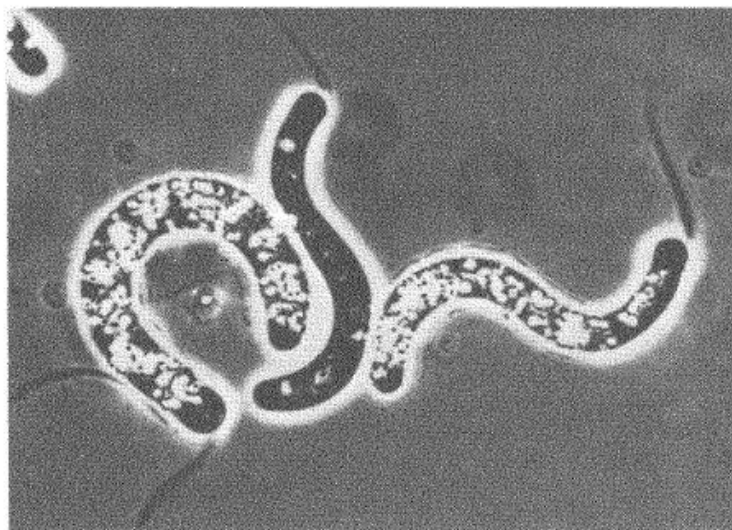


Рис. 2.37. *Thiospirillum jenense*. (Фазовый контраст, 1200 ×; фото N. Pfennig.)

Выявление жгутиков. Рассмотреть жгутик (или пучок жгутиков) в проходящем свете или в условиях фазового контраста удастся только у немногих бактерий, например у *Chromatium okenii*, *Bdellovibrio*, *Thiospirillum* (рис. 2.37). У многих других бактерий (*Pseudomonas*, *Spirillum* и др.) жгутик и зону его биения можно увидеть только в темном поле. Легче всего выявлять жгутики путем нанесения на них красителя или металла, а также с помощью электронного микроскопа.

Функции жгутиков. У большинства бактерий с полярным расположением жгутиков последние действуют подобно корабельному винту и проталкивают клетку в окружающей жидкой среде. Жгутик представляет собой спирально извитую нить, приводимую во вращательное движение «мотором», находящимся в месте ее прикрепления в плазматической мембране. Для перемещения клетки может служить одиночный жгутик или пучок жгутиков. Жгутики вращаются сравнительно быстро; например, у спироилл они совершают около 3000 оборотов в минуту, что близко к скорости среднего электромотора. Вращение жгутиков приводит к тому, что тело клетки вращается примерно с 1/3 этой скорости в противоположном направлении.

Жгутики могут спонтанно или в ответ на внешний стимул изменять направление вращения (рис. 2.34). У некоторых бактерий с полярным расположением жгутиков это приводит к тому, что клетка начинает двигаться вспять. Когда у *Chromatium okenii* в ответ на вспышку света направление вращения жгутиков меняется, пучок жгутиков превращается в тянущее приспособление; при этом назад клетка перемещается

в четыре раза медленнее, чем вперед, и ее движение становится «кувыркающимся». У *Thiospirillum jenense* – гигантской фототрофной спироиллы – единственный полярный пучок жгутиков при обратном движении бьется уже не впереди клетки: пространство биения жгутиков теперь охватывает клетку с боков: оно как бы вывернуто наизнанку (подобно вывернутому ветром зонту). У спироилл с амфитрихальным расположением жгутиков в таком положении находится, смотря по обстоятельствам, то один, то другой пучок.

Перитрихально расположенные жгутики *Escherichia coli* работают как один хорошо скоординированный спиральный пучок и проталкивают клетку через среду. В тех случаях, когда направление вращения отдельных жгутиков меняется, клетка начинает «кувыркаться». По-видимому, перитрихально расположенные жгутики не могут служить тянущим приспособлением.

Бактерии, снабженные жгутиками, могут передвигаться очень быстро: *Bacillus megaterium* со скоростью 1,6 мм/мин, *Vibrio cholerae* – 12 мм/мин. Это соответствует примерно от 300 до 3000 длин тела в минуту.

Тонкое строение жгутиков. Жгутики представляют собой спирально закрученные нити. У разных бактерий они различаются по своей толщине (12–18 нм), длине (до 20 мкм), а также по длине и амплитуде витка. Эти параметры характерны для каждого вида. У некоторых бактерий могут образовываться жгутики разных типов. Нити жгутиков состоят из специфического белка флагеллина. Они построены из субъединиц с относительно малой молекулярной массой. Субъединицы располагаются по спирали вокруг внутреннего свободного пространства (подобно белковым молекулам в вирусе табачной мозаики; см. разд. 4.1). Таким образом, структура жгутика определяется свойствами белковых субъединиц.

Жгутик состоит из трех частей – описанной выше спиральной нити, «крюка» вблизи поверхности клетки и базального тельца. С помощью базального тельца жгутик закреплен в плазматической мембране и в клеточной стенке (рис. 2.38). Оно состоит из центрального стержня, на котором у грам-отрицательных бактерий находятся две пары колец. Наружная пара (кольца L и P) расположена на уровне наружного и внутреннего слоев клеточной стенки, а внутренняя пара (кольца S и M) – на

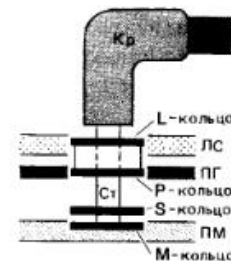


Рис. 2.38. Прикрепление жгутика к клеточной стенке и плазматической мембране у грам-отрицательной бактерии. H – нить жгутика; Kp – крючок жгутика; PM – плазматическая мембрана; ЛС – липополисахаридный слой; ПГ – пептидогликановый слой; Ct – стержень.

уровне наружного слоя плазматической мембраны. Так как у грам-положительных бактерий наружная пара колец отсутствует, полагают, что для вращения жгутиков необходима только внутренняя пара. Можно представить себе, что кольцо М действует как приводной диск, а кольцо S играет роль подшипника на внутренней поверхности пептидогликанового слоя. Молекулярный механизм вращательного «мотора» жгутика пока не выяснен.

О- и Н-антигены. *Proteus vulgaris* часто распространяется по всей поверхности агара в виде тонкого серого налета (Н-форма, от нем. Nauch – налет). Такое «роение» объясняется большой подвижностью клеток. Некоторые штаммы налета не образуют (О-форма, от нем. ohne Nauch – без налета). Эти штаммы неподвижны, они лишены жгутиков. Отсюда ведет свое начало обычная терминология, принятая в бактериальной серодиагностике; антигены поверхности или вообще тела клетки (соматические) называют О-антигенами, а антигены жгутиков – Н-антигенами.

Фимбрии и пили. Поверхность некоторых бактерий покрыта большим числом (от 10 до нескольких тысяч) длинных, тонких прямых нитей толщиной 3–25 нм и длиной до 12 мкм, называемых фимбриями или пилиями. Они встречаются как у жгутиконосных видов, так и у форм, лишенных жгутиков. От них следует отличать половые пили, или пили типа F, которые были обнаружены у клеток-доноров *Escherichia coli* K 12, т. е. у штаммов, содержащих половой фактор F (F⁺, Hfr). Пили F встречаются только по одной или по две на клетку, они имеют вид полых белковых трубочек длиной от 0,5 до 10 мкм.

Хемотаксис. Свободно передвигающиеся бактерии способны к таксисам – направленным движениям, определяемым внешними стимулами. В зависимости от факторов среды, вызывающих направленное движение, говорят о хемотаксисе, аэротаксисе, фототаксисе и магнитотаксисе.

Подвижные бактерии реагируют на химические раздражители – скапливаются в одних местах, а других мест избегают. Такая реакция свободно передвигающихся организмов называется хемотаксисом. Скопления бактерий образуются под действием химических факторов следующим образом (рис. 2.39). У форм с перитрихальными жгутиками возможны только два типа двигательного поведения: прямолинейное движение и кувыркание. Последнее прерывает прямолинейную пробежку и изменяет направление пути. Когда бактерия оказывается в среде с градиентом концентрации «привлекающего» ее субстрата (аттрактанта), ее прямолинейное движение длится многие секунды, если она плывет по направлению к оптимальной его концентрации; однако такое движение через несколько секунд прекратится, если бактерия плывет в противоположном направлении. Хотя направление прямолинейного движения после кувыркания оказывается совершенно случайным, тем не менее зависимость длительности такого движения от его направления приводит в конечном результате к накоплению бактерий в области оптимальной концентрации субстрата. За чувствительность к химическому



Рис. 2.39. Хемотаксические движения. А. В нормальной (изотропной) среде бактерия плывет почти прямолинейно и кувыркается примерно через равные промежутки времени. Б. В градиенте концентрации какого-либо «привлекающего» вещества (аттрактанта) частота кувыркания уменьшается, когда клетка плывет в «правильном» направлении, т. е. в сторону оптимума концентрации. В. В градиенте отпугивающего вещества (репеллента) клетка ведет себя противоположным образом.

стимулу и за реагирование на него ответственны хеморецепторы. В ряде случаев эти хеморецепторы действуют независимо от способности бактерий утилизировать данный субстрат. Например, некоторые мутанты продолжают совершенно нормально реагировать на определенное питательное вещество, хотя и потеряли способность его использовать.

Аэротаксис. У подвижных бактерий можно определить тип метаболизма (аэробный или анаэробный) по их аэротаксическим движениям и скоплению на определенных расстояниях от края покровного стекла. В слое бактерий, помещенных между предметным и покровным стеклами, аэрофильные бактерии скапливаются у края покровного стекла или в непосредственной близости от оказавшихся в препарате пузырьков воздуха; это указывает на их потребность в аэробных условиях и на то, что необходимую энергию они получают за счет дыхания (рис. 2.40). Строго анаэробные бактерии будут скапливаться в центре. Микроаэрофильные бактерии, например некоторые псевдомонады и спириллы, будут держаться на определенном расстоянии от края. С помощью бактерий, проявляющих положительный аэротаксис, Энгельману удалось продемонстрировать выделение кислорода локально освещаемыми хлоропластами зеленой водоросли *Spirogyra*.

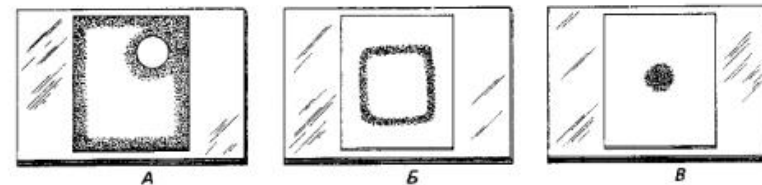


Рис. 2.40. «Фигуры дыхания» (по Бейеринку) как следствие аэротаксиса у подвижных бактерий. Аэробные бактерии скапливаются у края покровного стекла и вокруг попавших в среду пузырьков воздуха (А). Микроаэрофильные бактерии остаются на некотором расстоянии от краев покровного стекла (Б). Строго аэробные бактерии скапливаются в центре (В).

Фототаксис. Фототрофным пурпурным бактериям для получения энергии необходим свет. Не удивительно поэтому, что в результате фототаксиса они скапливаются в освещенном месте. Если выдержать в темноте препарат, в котором плотная суспензия клеток *Chromatium* будет равномерно распределена под покровным стеклом, а затем направить на него сфокусированный пучок света, то бактерии сосредоточатся в области светового пятна. Клетки, попавшие в это пятно случайно в результате своего беспорядочного движения, уже не могут его покинуть. Как только они попадут в темную зону, направление движения жгутиков мгновенно меняется на обратное и клетки возвращаются в освещенное место. Изменение работы жгутиков происходит так быстро, что эта реакция получила название «реакция испуга» (фоботаксис). Впрочем, для того чтобы вызвать такой ответ, достаточно даже небольшого различия в освещенности двух участков. Мелкие клетки *Chromatium* скапливаются уже в таком месте, где освещенность всего на 0,7% выше, чем в окружающей области. Таким образом, по своей чувствительности к световому контрасту они приближаются к сетчатке человеческого глаза (для которой соответствующий порог равен 0,4%).

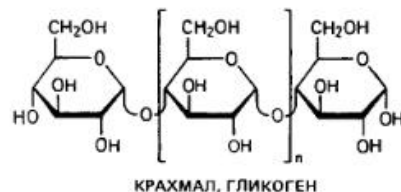
Магнитотаксис. Из поверхностных слоев донного ила пресноводных водоемов, а также морей были выделены бактерии (палочки, спириллы, кокки), способные ориентироваться в магнитном поле и перемещаться в направлении линий магнитного поля. Они содержат много железа (0,4% сухого вещества) в форме ферромагнитной окиси железа (магнетита), которая находится в гранулах (магнитосомах), расположенных около мест прикрепления жгутиков. Бактерии, выделенные в северном полушарии, «ищут» север; здесь линии магнитного поля проходят под углом около 70° к горизонту вниз, в глубину водоема. Магнитотаксическое поведение направляет бактерии в глубину ила, где очень мало или вовсе нет кислорода. Так как магнитотаксические бактерии — анаэробы или микроаэрофилы, их реакция на магнитное поле понятна с точки зрения экологии. Такие клетки, завезенные в южное полушарие, в массе своей, конечно, погибнут; выживут лишь немногие «неправильно» поляризованные клетки, которые могут затем размножиться. Полярность, очевидно, генетически не зафиксирована.

2.2.6 Запасные вещества и другие внутриклеточные включения

У многих микроорганизмов в определенных условиях среды внутри клеток откладываются вещества, которые можно рассматривать как запасные, — полисахариды, жиры, полифосфаты и сера. Эти вещества накапливаются, если в питательной среде содержатся соответствующие исходные соединения, но вместе с тем рост бактерий ограничен или вообще невозможен из-за недостатка каких-то отдельных компонентов питания или присутствия ингибиторов. Запасные вещества содержатся в клетках в осмотически инертной форме — они нерастворимы в воде. При условиях, благоприятных для роста, когда в этих веществах возникает потребность, они снова включаются в метаболизм. Запасные полисахариды, нейтральные жиры и поли-β-гидроксимасляная кислота могут служить источниками как энергии, так и углерода. Поэтому при отсутствии внешних источников энергии они могут продлить время существования клетки, а у спорообразующих видов — создать условия для образования спор даже в отсутствие экзогенных субстратов. Полифос-

фаты могут рассматриваться как резервный источник фосфата, а запасная сера — как потенциальный донор электронов.

Полисахариды. Запасные углеводы микроорганизмов еще мало изучены. У некоторых микробов при помощи цветной реакции с раствором Люголя удается идентифицировать крахмал (синяя окраска) или гликоген (коричневая окраска). Запасные полисахариды, в отличие от полисахаридов клеточной стенки, все образуются из α-D-глюкозы; молекулы глюкозы связаны между собой 1,4-α-гликозидными связями и многократно сшиты между собой (см. также рис. 14.2).



Благодаря α-гликозидным связям полиглюкозные цепи не вытянуты в длину, а закручены винтообразно. Крахмал, который у растений откладывается в форме крахмальных зерен, состоит из амилозы и амилопектина. Доля амилозы составляет 20–30% (по весу). Именно этот компонент ответствен за синее окрашивание с иодом; эта реакция основана на встраивании иода в витки спирали (реакция включения).

Крахмалоподобное соединение у клостридиев получило название «гранулозы» или «иогена». Клетки *Clostridium butyricum* почти целиком заполнены мелкими гранулами этого вещества; свободен от них только тот полюс клетки, где образуется спора. Клетки *Acetobacter pasteurianus* и многих видов *Neisseria* содержат крахмал.

Гликоген, называемый также «животным крахмалом», сходен с амилопектином, но цепи его ветвятся еще сильнее (путем образования 1,6-связей); у бактерий он встречается, видимо, чаще, чем крахмал. Гли-



Рис. 2.41. Включения гликогена в клетках *Escherichia coli* B. Накопление гликогена произошло во время 15-часовой аэрации клеток в фосфатном буфере, содержащем 0,5% глюкозы. Электронная микрофотография ультратонкого среза (четырёхокись осмия — бихромат; уранилацетат; 8000×). (Фото Р. Hillmer и F. Amelunxen.)

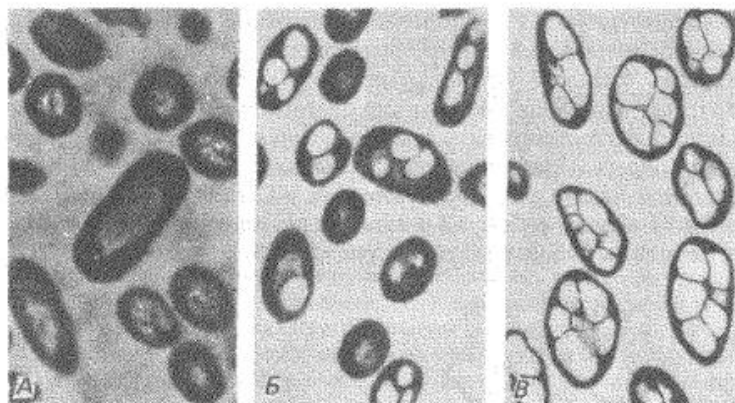
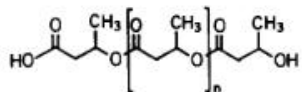


Рис. 2.42. Накопление поли-β-гидроксимасляной кислоты в клетках *Alcaligenes eutrophus*. Клетки взяты из культуры в фазе экспоненциального роста (А), а затем после 1 ч (Б) и 24 ч (В) ассимиляции уксусной кислоты в отсутствие источника азота. Электронные микрофотографии ультратонких срезов (четыреугольничек осмия-бихромат; уранилацетат-цитрат свинца; 6000 ×). (Фото Р. Hillmer и F. Amelunxen.)

коген обнаружен также у дрожжей и других грибов, у бацилл (*Bacillus polymyxa*), у *Salmonella*, *Escherichia coli* (рис. 2.41) и других *Enterobacteriaceae*, у *Micrococcus luteus* и *Arthrobacter*.

Жироподобные вещества. В качестве включений в клетках микроорганизмов часто встречаются гранулы и капельки жира. В световом микроскопе они видны благодаря тому, что сильно преломляют свет; их можно также окрашивать липофильными красителями—суданом III или суданом черным В.

«Суданофильные» гранулы многих бактерий состоят из поли-β-гидроксимасляной кислоты—полиэфира, растворимого в хлороформе, но нерастворимого в эфире и состоящего примерно из 60 остатков β-гидроксипентаноата. Доля этого вещества в сухой биомассе может достигать 80%. Поли-β-гидроксимасляную кислоту образуют многие аэробные



поли-β-гидроксимасляная кислота
($n \approx 60$)

бактерии (рис. 2.42), а также цианобактерии и анаэробные фототрофные бактерии (рис. 2.43, А). У факультативных анаэробов и строгих аэробов она накапливается, когда клетки испытывают недостаток O_2 и переходят на брожение; поэтому ее можно рассматривать как полимерный внутриклеточный продукт брожения. В аэробных условиях этот продукт

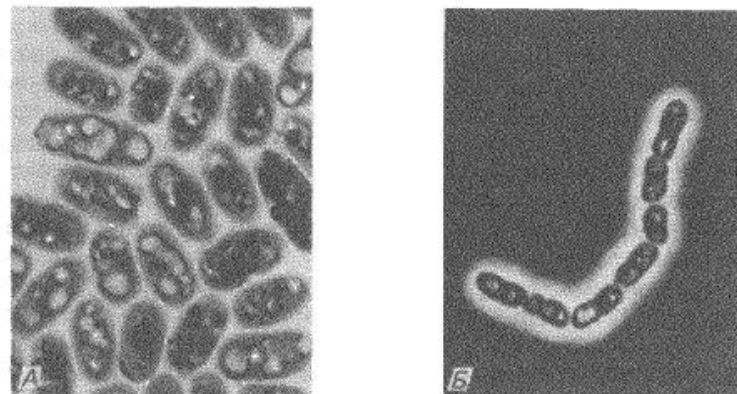


Рис. 2.43. Клетки с включениями поли-β-гидроксимасляной кислоты. А—*Chromatium okenii*; Б—*Bacillus megaterium* (препарат в туши). Темные включения в клетках *C. okenii*—капельки серы. Снимки в светлом поле; 1000 ×. (Schlegel H. G., Arch. Microbiol., 42 [1962]; Bohlken G., Diss., Göttingen, 1965.)

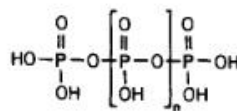
может быть снова вовлечен в метаболизм как источник энергии и углерода и использован в процессе дыхания.

Нейтральные жиры (триглицериды), в особенно больших количествах откладывающиеся в вакуолях дрожжей и других грибов, сходны с жирами высших организмов. Дрожжи (*Candida*, *Rhodotorula*) могут накапливать до 80% жиров по отношению к сухому веществу.

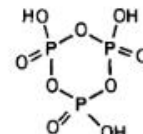
Микобактерии, нокардии и актиномицеты накапливают в клетках иные жироподобные вещества и часто даже выделяют их в среду. Микобактерии могут содержать до 40% восков (сложные эфиры жирных кислот с длинной цепью и спиртов).

Содержание запасных жиров определяется составом питательной среды (высоким отношением С/Н), и эти жиры могут быть выделены непосредственно из клеток. Количества других липидных соединений от состава среды почти не зависят. Эти липиды освобождаются лишь после гидролиза белков и полисахаридов и представляют собой компоненты липопротеинов, входящих в состав плазматической мембраны и внутренних мембран, и липополисахаридов.

Полифосфаты. Многие бактерии и зеленые водоросли способны накапливать фосфорную кислоту в виде гранул полифосфата. Такие гранулы были впервые описаны у *Spirillum volutans*, поэтому их называют волютинными гранулами; другое их название—«метахроматические



ПОЛИФОСФАТ



ТРИМЕТАФОСФАТ

гранулы»—обусловлено тем, что они вызывают характерное изменение цвета (метахромазию) у некоторых красителей (метиленового синего, толуидинового синего). Эти гранулы состоят в основном из полифосфатов с длинной цепью типа соли Грэма (полиметафосфат натрия); часто находимые при анализах циклические метафосфаты являются, по-видимому, артефактами, возникающими при распаде полифосфатов.

Волютиновые гранулы играют роль фосфатных депо, за счет которых клетка может при недостатке фосфора в среде осуществить еще несколько делений. Как источники энергии полифосфаты играют второстепенную роль.

Сера. У многих бактерий, окисляющих сульфид до сульфата, сера временно сохраняется в виде шариков, сильно преломляющих свет. Сера, накопленная внутри клеток, так же как и выделенная клеткой наружу, находится в жидком состоянии и постепенно переходит в свою орторомбическую модификацию. Количество накапливаемой серы зависит от содержания сероводорода в окружающей среде: при отсутствии H_2S сера окисляется до сульфата. Для аэробных серных бактерий (*Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Achromatium*, *Thiovulum*; рис. 2.44) сера служит источником энергии, а для анаэробных фототрофных пурпурных серобактерий (*Chromatium*)—донором электронов. Включения серы, встречающиеся иногда у цианобактерий и *Sphaerotilus natans*, можно рассматривать как продукты обезвреживания сероводорода, часто присутствующего в местах обитания этих организмов.

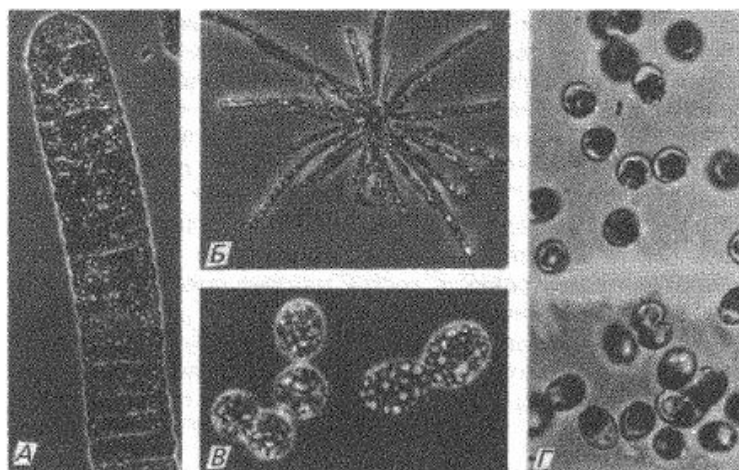


Рис. 2.44. Бесцветные бактерии, окисляющие сероводород. А. *Beggiatoa gigantea* с включениями серы (снимок в светлом поле, $300\times$). Б. Розетки *Thiothrix* (фазовый контраст, $300\times$). В. *Achromatium oxaliferum* с включениями карбоната кальция и серы ($200\times$). Г. *Thiovulum* с включениями серы ($1000\times$). [Фото К. Schmidt (А, В), D. Claus (Б), J. W. M. La Rivière и H. Schuur (Г).]

Другие клеточные включения. У *Bacillus thuringiensis* и родственных видов (*B. laterosporus*, *B. medusa*) рядом со спорами можно бывает видеть кристаллоподобные включения (см. рис. 3.6)—параспоральные тельца, состоящие из протоксина. Протоксин растворяется в кишечном соке чувствительных к нему насекомых (гусениц), и освобождающийся при этом токсин разрушает кишечный эпителий, что приводит к гибели гусеницы. Полученные из этих бактерий препараты, токсичные лишь для немногих групп насекомых, уже с успехом применяются для биологической борьбы с вредителями.

Газовые вакуоли. Многие водные бактерии, в особенности фототрофные, но также и бесцветные (*Pelonema*, *Peloploca*), галобактерии (*Halobacterium halobium*) и некоторые клостридии содержат газовые вакуоли. Они придают клеткам способность изменять свою среднюю плотность и оставаться взвешенными в воде. Благодаря такой способности некоторые бактерии могут в стратифицированных озерах держаться в определенном слое воды с оптимальными условиями для их роста, не прибегая к активному движению с помощью жгутиков. Аноксигенные (не выделяющие O_2) фототрофные бактерии, в том числе пурпурные (*Lamprocystis*, *Amoebobacter*, *Thiodictyon*) и зеленые (*Pelodictyon*), растут в водоемах в анаэробной зоне (в типоплимнионе) непосредственно под слоем температурного скачка—термоклина (см. рис. 17.1). Плавуность этих организмов, по-видимому, достаточна для того, чтобы они могли находиться во взвешенном состоянии в холодном (более тяжелом) слое воды гипоплимниона, но не обеспечивает им подъемной силы, которая позволяла бы им держаться в теплом (более легком) слое воды над термоклином. Оксигенные (т.е. выделяющие O_2) цианобактерии (*Oscillatoria agardhii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*) процветают в слоях выше термоклина. Плавуность их, по-видимому, регулируется с помощью фотосинтеза, тургора клеток, а также путем изменения числа и величины газовых пузырьков.

Каждая газовая вакуоль представляет собой скопление газовых пузырьков (везикул). Эти пузырьки имеют веретенообразную форму (цилиндры с коническими концами). Их оболочка состоит не из обычной мембраны, а из чистого белка, обладающего складчатой структурой; толщина ее составляет всего лишь 2 нм. На фотографиях можно различить ребра, расположенные на цилиндрической части пузырька подобно обручам на бочке. Оболочка построена из белковых субъединиц с молекулярной массой $14\cdot 10^3$. Белковые молекулы, очевидно, ориентированы таким образом, что внутренняя сторона стенки оказывается гидрофобной, а наружная—гидрофильной. В клетке имеется множество газовых пузырьков, расположенных параллельно друг другу. В световом микроскопе такое скопление газовых пузырьков (т.е. газовая вакуоль) имеет вид оптически пустого участка, сильно преломляющего свет.

Карбоксисомы. В клетках некоторых автотрофных бактерий имеются карбоксисомы. Это полиэдрические образования величиной с головку

фага, в которых (иногда наряду с небольшим количеством ДНК) содержится фермент рибулозобисфосфат-карбоксилаза. Карбоксисомы найдены у *Nitrosomonas*, *Thiobacillus* и многих цианобактерий.

2.2.7 Эндоспоры и другие поносящиеся формы

К образованию эндоспор способна только небольшая группа бактерий. Огромное значение эндоспор связано с их термоустойчивостью. В то время как почти все остальные бактерии, а также вегетативные клетки спорообразующих видов гибнут при 80°C (при температуре пастеризации) через 10 мин, терморезистентные эндоспоры переносят значительно более сильный нагрев; некоторые споры выдерживают даже кипячение на протяжении многих часов. Трудоемкая и дорогостоящая техника стерилизации (обеззараживания) рассчитана на уничтожение эндоспор. С другой стороны, терморезистентность спор предоставляет своеобразную возможность избирательного обогащения культур спорообразующих форм. Землю или иной материал, взятый в определенном месте, на протяжении 10 мин прогревают при 80 или 100°C, что приводит к гибели вегетативных клеток; только терморезистентные споры остаются жизнеспособными и прорастают в подходящей питательной среде.

Классификация бактерий, образующих эндоспоры. Спорообразующие виды, за одним исключением, относятся к палочковидным грам-положительным бактериям. Большинство из них подвижно благодаря перитрихально расположенным жгутикам. Бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, — строгие аэробы или факультативные анаэробы. Роды *Clostridium* и *Desulfotomaculum* объединяют анаэробные бактерии, способные к образованию спор. Клостридии получают энергию за счет брожения; виды *Desulfotomaculum* способны получать энергию путем анаэробного дыхания, используя сульфат в качестве акцептора электронов. *Sporolactobacillus* принадлежит к числу молочнокислых бактерий. *Sporosarcina* имеет сферические клетки, но по своим физиологическим признакам относится к бациллам. Содержание GC (см. разд. 22.1) в ДНК клеток, способных образовать споры, удивительно низко; клостридии, у которых ДНК содержит от 22 до 27 мол. % GC, оказываются в конце списка прокариот, расположенных в порядке убывания этого показателя.

Выявление эндоспор. При микроскопическом исследовании споры видны благодаря своему высокому показателю преломления — такому же, как у обезвоженного белка; это указывает на то, что в спорах большое количество богатого белком материала сконцентрировано в малом объеме. Спора содержит почти все сухое вещество материнской клетки, но занимает в 10 раз меньший объем. В сомнительных случаях вопрос о том, имеются ли в клетках истинные эндоспоры, можно решить с помощью специального окрашивания. Если препарат бактерий, фиксированный нагреванием, прокипятить с карболовым раствором фуксина, то споры прочно связывают краситель и не обесцвечиваются даже при

обработке этанолом или 1 М уксусной кислотой, тогда как остальное содержимое клетки при этом становится бесцветным.

Спорообразование (споруляция). Споры образуются внутри бактериальной клетки. Этот процесс начинается с накопления белкового материала, поэтому показатель преломления в месте образования споры возрастает. Происходящие при этом метаболические превращения сопровождаются расходом запасных веществ (поли-β-гидроксимасляной кислоты у аэробов и полисахаридов у анаэробов). В течение первых пяти часов спорообразования значительная часть белков материнской клетки распадается. При этом образуется специфичное для спор вещество — дипиколиновая (пиридин-2,6-дикарбоновая) кислота. В вегетативных клетках эта кислота не встречается. В ходе синтеза дипиколиновой кислоты происходит поглощение ионов кальция; в зрелых спорах эта кислота находится, по-видимому, в виде хелата с кальцием и может составлять 10–15% сухого вещества спор. Дипиколиновая кислота локализована в протопласте споры и имеется только в терморезистентных эндоспорах (рис. 2.45, 2.46).

Спорообразование — один из сложнейших процессов дифференцировки бактериальной клетки. Оно начинается с особого **неравного деления** клетки (рис. 2.45). В результате впячивания плазматической мембраны часть протопласта отшнуровывается от материнской клетки. Этот протопласт содержит часть ядерного материала — один геном. Образование клеточной стенки между обоими протопластами (как при обычном делении) здесь не происходит. Вместо этого протопласт будущей споры окружается, как бы обрастает, плазматической мембраной материнской клетки. В результате вокруг него оказываются две плазматические мембраны, и каждая из них участвует в синтезе стенки споры. Мембрана протопласта споры синтезирует снаружи от себя стенку зародышевой клетки, а мембрана, происходящая от материнской клетки, синтезирует вовнутрь кору споры (кортекс). Последняя состоит из многослойного пептидогликанового остова, который отличается от каркаса стенок вегетативных клеток помимо прочего степенью сшивки. Наружную оболочку споры образует материнская клетка; эта оболочка в значительной части состоит из полипептидов. Материнская же клетка образует еще один дополнительный тонкий полипептидный покров — **экзоспорий**; он имеется только у немногих бактерий (например, у *Bacillus cereus*) и окружает спору в виде свободного чехла. Ввиду такой многослойности покровов не покажется удивительным, что на долю оболочки приходится около половины объема и соответственно сухой массы зрелой споры.

Индукция спорообразования. Споры отнюдь не являются обязательной стадией жизненного цикла бацилл; при благоприятных условиях питания бациллы могут неограниченное время размножаться делением как вегетативные клетки. Образование спор начинается лишь тогда, когда не хватает питательных веществ или когда в избытке накапливаются продукты обмена. Иными словами, оно происходит лишь в тех случаях, когда этому способствуют общие условия. Высыхание не стимулирует

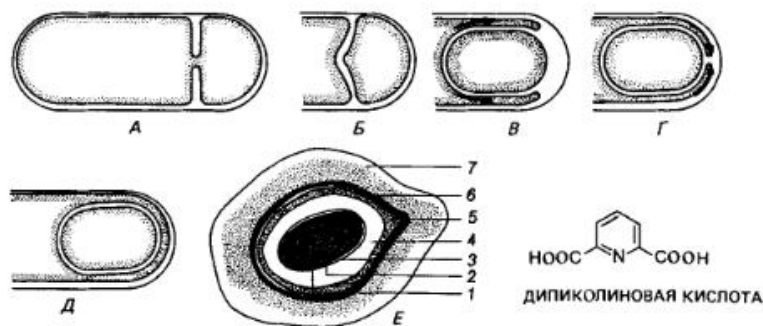


Рис. 2.45. Схема спорообразования и строения зрелой споры. А, Б — процесс отделения протопласта споры; В, Г, Д — образование предспоры; Е — зрелая спора. 1 — цитоплазма; 2 — плазматическая мембрана; 3 — клеточная стенка зародыша; 4 — кора споры; 5 — внутренняя оболочка споры; 6 — наружная оболочка споры; 7 — экзоспориум. (W. G. Murell)

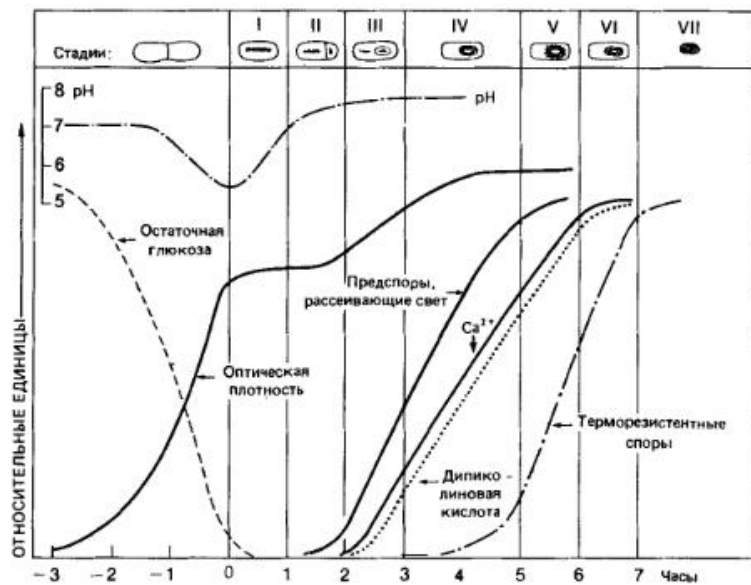


Рис. 2.46. Морфологические и физиологические изменения в процессе образования спор у аэробных бактерий. Этот процесс инициируется использованием глюкозы (нулевое время). Образование спор можно проследить по увеличению содержания кальция и дипиколиновой кислоты, а также по увеличению числа терморезистентных спор и изменению светопреломления. Определенным биохимическим сдвигам соответствуют морфологические изменения. Вверху схематически показаны стадии I—VII.

споруляцию. Если поместить вегетативные клетки в дистиллированную воду, можно наблюдать «эндотрофную споруляцию», т. е. образование спор за счет накопленных внутри клеток запасных веществ. В таких случаях образование спор, очевидно, вызывается недостатком экзогенного субстрата. Индукция спорообразования осуществляется в течение нескольких часов. Если, например, к суспензии вегетативных клеток *Bacillus cereus* var. *mycoides* в первые 5 ч после помещения клеток в воду добавить глюкозу, то образование спор прекратится — добавление субстрата подавляет споруляцию. Глюкоза, добавленная позднее чем через 6 ч, менее действенна: подавление спорообразования не происходит. Индукция (дерепрессия) спорообразования продолжается, и через 10–13 ч после переноса клеток в воду около 90% их образует споры. Следовательно, споруляция регулируется внешними факторами.

Число клеток, образующих споры, во многих случаях возрастает после добавления к среде солей марганца.

Способность образовывать эндоспоры постепенно утрачивается при многократных пересевах вегетативных клеток. Поскольку суспензии спорообразующих микроорганизмов обычно содержат и споры, и вегетативные клетки, перед каждым пересевом культуру, как правило, подвергают кратковременному кипячению. Это способствует сохранению или повышению способности клеток образовывать споры.

Свойства зрелых спор. Споры освобождаются при автолизе материнских клеток. Зрелые споры не проявляют никакой метаболической активности. Они чрезвычайно устойчивы к воздействию высокой температуры, разного рода излучений и химических агентов. Терморезистентность обусловлена очень низким содержанием воды. В спорах *Bacillus megaterium* всего лишь около 15% воды, т. е. примерно столько же, сколько в шерсти или сухом казеине. Лиофилизированные вегетативные клетки бактерий тоже очень термостойки. Терморезистентность спор приблизительно пропорциональна содержанию в них дипиколиновой кислоты.

Радиорезистентность спор также выше, чем у вегетативных клеток. Она примерно пропорциональна содержанию дисульфидных групп в наружном слое белка. Оболочка споры содержит главным образом белок, богатый цистеином и напоминающий кератин. Химическая же устойчивость эндоспор обусловлена непроницаемостью их оболочки для многих веществ.

Прорастание спор. В подходящих средах большинство спор прорастает. Соответствующая предварительная обработка, определенные условия хранения и прогрев могут повысить «всхожесть» спор — увеличить процент прорастания. В случае *Bacillus subtilis* оптимальными условиями для стимуляции прорастания спор считают семидневный период покоя и пятиминутный прогрев в воде при 60°C. Другие споры могут быть активированы кратковременным кипячением (10 мин при 100°C). Обработка тепловым шоком должна проводиться непосредственно перед высевом спор, так как процесс активации обратим. Прорастанию

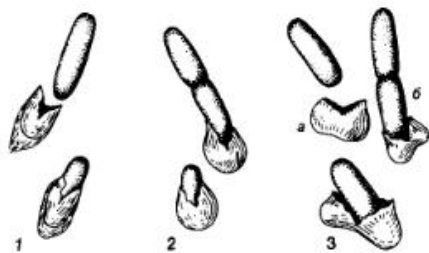


Рис. 2.47. Прорастающие споры. 1 — полярное прорастание споры *Clostridium* (с экзоспорием); 2 — полярное прорастание споры *Bacillus megaterium* (споровые оболочки не отделились); 3 — латеральное прорастание спор у бацилл (а — *B. cereus*; б — *B. subtilis*).

спор предшествует поглощение ими воды и набухание. Для прорастания активированных спор в ряде случаев необходимо присутствие глюкозы, аминокислот, нуклеозидов или других соединений. В ходе прорастания спор происходят глубокие физиологические изменения: дыхание и ферментативная активность быстро возрастают; начинается выделение аминокислот, дипиколиновой кислоты и пептидов. При прорастании спор потеря сухого вещества достигает 25–30%. Во время прорастания споры теряют свою термоустойчивость. Выходящая из споры ростовая трубка бывает окружена очень тонкой и, видимо, неполностью сформированной клеточной стенкой, так что в протопласт может, например, проникать даже ДНК (см. раздел о трансформации). Ростовая трубка может образоваться как в полярном, так и латеральном положении; в одних случаях оболочка споры при этом разрывается, в других ростовая трубка прокалывает ее (рис. 2.47).

Продолжительность жизни спор. Бактерии в виде спор могут длительное время находиться в состоянии анабиоза. В земле, которая прилипла к растениям из гербария Кью Гарденс (Англия) и пролежала вместе с ними в сухом состоянии от 200 до 320 лет, было обнаружено лишь небольшое количество жизнеспособных спор *Bacillus subtilis* и *B.licheniformis*. В пробах почвы, хранившихся от 50 до 100 лет, были также обнаружены споры *B. coagulans* и *B. circulans*. По данным такого рода экспериментов, в сухой почве за 50 лет хранения до 90% спор теряет жизнеспособность. Судя по этому, одна тонна сухой почвы и через 1000 лет все еще будет содержать жизнеспособные споры.

В сухом состоянии многие бактерии (если не большинство из них) на протяжении ряда лет сохраняют жизнеспособность. Для консервации бактерий в коллекциях вегетативные клетки подвергают, как правило, лиофильной сушке и хранят при комнатной температуре или при низких температурах в вакууме. Как рассчитал еще Беккерель, микроорганизмы при температуре, близкой к абсолютному нулю, могут оставаться жизнеспособными на протяжении миллионов лет. Кратковременные опыты с жидким азотом и экстраполяция их результатов позволяют заключить, что такие предположения вполне оправданы. Бактерии, не переносящие лиофилизации, выдерживают многолетнее хранение в суспензиях при температуре жидкого азота.

Другие покоящиеся формы (цисты, экзоспоры, миксоспоры). Эндоспоры являются длительно переживающими формами бактерий, устой-

чивыми к высокой температуре, высыханию, облучению и химическим воздействиям. Помимо эндоспор у некоторых других бактерий существуют иные покоящиеся формы — экзоспоры и цисты. Образование экзоспор до сих пор наблюдалось только у метаболизирующих метан бактерий *Methylosinus trichosporium*¹. Экзоспоры возникают путем почкования материнской клетки; они сходны по своим свойствам с эндоспорами бацилл. Некоторые бактерии образуют шарообразные толстостенные клетки, называемые цистами. При истощении пищевых ресурсов в цисту превращается вся палочковидная вегетативная клетка, а не только часть ее, как при образовании эндоспоры. Цисты видов *Azotobacter*, а также *Methylocystis* устойчивы к высушиванию, механическим нагрузкам и облучению, но не к действию высоких температур. Подобного рода превращение всей клетки в цисту лежит и в основе образования миксоспор из палочковидных вегетативных клеток *Muxococcus* и *Sporocytophaga*.

Клетки *Arthrobacter* (*A. globiformis*) плеоморфны. При обилии субстрата они растут в виде палочек; когда же субстрат иссякает, появляются кокковидные клетки. *Arthrobacter* относится к тем бактериям, которые способны некоторое время сохраняться в высушенной почве, пребывая в состоянии покоя; структурной дифференцировки в данном случае не выявлено.

2.2.8 Пигменты бактерий и грибов

Колониям многих бактерий и грибов свойственна яркая окраска, обусловленная выделением окрашенного продукта в окружающую среду или же пигментацией самой клетки. Способность к образованию пигментов детерминирована генетически и поэтому может использоваться в качестве характерного признака. Окрашенные формы легче выявлять и идентифицировать. Среди пигментов могут встречаться представители различных классов веществ: каротиноиды, феназиновые красители, пирролы, азахиноны, антоцианы и др. (рис. 2.48).

Защита от света и ультрафиолетового облучения. В чашках Петри со сложной агаризованной средой, оставленных на некоторое время открытыми в пыльном воздухе, часто появляются окрашенные колонии микроорганизмов. В их окраске преобладают желтые, оранжевые и красные тона, обусловленные присутствием каротиноидов. Среди бактерий, образующих такие колонии, мы находим чаще всего представителей родов *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* и *Nocardia*, а среди дрожжей — *Rhodotorula*. Обилие пигментированных форм среди «воздушной микрофлоры» объясняется тем, что пигменты играют защитную роль, предохраняя клетки от действия видимого и ближнего ультрафиолетового света. Поэтому в местообитаниях, находящихся на

¹ Экзоспоры образует также фототрофная пурпурная бактерия *Rhodomicrobium vannielii*. — Прим. ред.

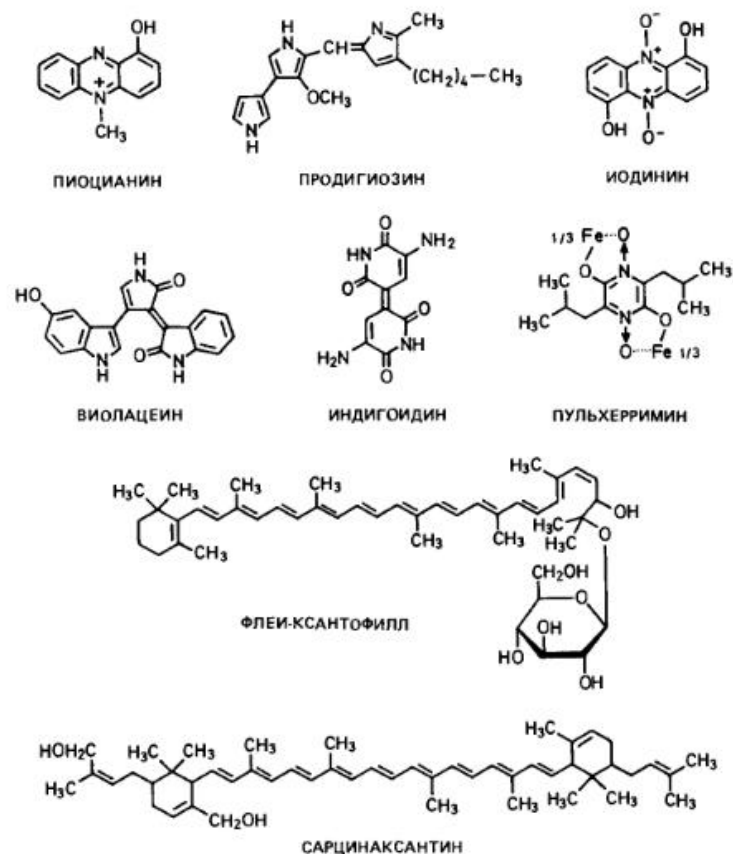


Рис. 2.48. Некоторые пигменты, образуемые бактериями и дрожжами. Пиоцианин выделяют клетки *Pseudomonas aeruginosa*, а иодинин — *Chromobacterium iodinum*. Индигоидин продуцируют различные бактерии, в том числе *Pseudomonas indigofera*. Продигиозин образует *Serratia marcescens* (прежнее название — *Bacterium prodigiosum*), виолацеин — *Chromobacterium violaceum*. Пульхерримин — пигмент дрожжей *Candida pulcherrima*. Флейксантофилл — главный каротиноид *Mycobacterium phlei*, он представляет собой каротиноид-гликозид; сарцинаксантин — основной каротиноид желтых видов *Sarcina* (*Micrococcus luteus*).

свету (пыль, солома), бесцветные бактерии погибают быстрее, чем пигментированные. Защитное действие пигментов в отношении лучевого повреждения можно показать также на примере оранжевой галофильной бактерии, содержащей каротиноиды, и ее бесцветных мутантов. В то время как при слабом освещении и дикий тип, и мутанты растут одинаково хорошо, на ярком солнечном свете рост бесцветных мутантов сильно тормозится. Бактерицидное действие видимого света про-

является только в присутствии молекулярного кислорода и обусловлено фотоокислением; некоторые клеточные пигменты (флавины и цитохромы) играют при этом роль катализаторов (фотосенсибилизаторов). Каротиноиды находятся в плазматической мембране и защищают чувствительные области клетки от эффектов фотоокисления.

Фотосенсибилизация. Обычная чувствительность клеток к молекулярному кислороду, проявляющаяся на свету, может быть усилена. Бактерии, окрашенные витальными красителями, например метиленовым синим, эозином или акридиновым оранжевым, а затем подвергнутые действию света, отмирают быстрее, чем неокрашенные клетки. Молекула красителя поглощает свет и способна передавать его энергию молекуле O_2 . При этом находящаяся в обычном триплетном состоянии молекула кислорода переходит в возбужденное состояние (синглетный кислород). Этот синглетный кислород инициирует окислительные реакции, которые обычный кислород осуществить не способен (циклоаддиции, Еп-реакции). Фотосенсибилизацию используют в зверосовхозах и зоопарках для устранения потенциально патогенных бактерий; с этой целью добавляют в питьевую воду метиленовый синий или другие красители. Фотосенсибилизированные бактерии гибнут уже на обычном дневном свете.

Образование каротиноидов. Интенсивно-красный цвет пурпурных бактерий обусловлен присутствием красных каротиноидов (с 12–13 двойными связями и с метокси- и оксогруппами). Здесь пигменты играют не только защитную роль, но и поглощают свет для фотосинтеза, а также участвуют в рецепции света при фототаксисе. Каротиноиды вместе с бактериохлорофиллами находятся в фотосинтетически активных мембранах (тилакоидах, хроматофорах).

У многих пигментированных микроорганизмов образование пигментов (так же как и синтез фотосинтетических пигментов у высших растений) происходит только на свету. Микобактерии, в том числе патогенная туберкулезная палочка (*Mycobacterium tuberculosis*), образуют каротиноиды только при воздействии света. Это относится и к бактериям, растущим на ветчине или сыре. Во многих случаях пигментация зависит от состава питательной среды и от температуры.

Пульхерримин. Цвет красных дрожжей (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces salmonicolor*) определяется в основном каротиноидами. К другому классу веществ относится пульхерримин — пигмент *Candida pulcherrima*. Наряду с *C. reukaufii* эти дрожжи можно выделить из нектароносных цветков и из плодов, а также из кишечника пчел. На средах, содержащих железо, они образуют темно-красные колонии. Их красный пиразиновый пигмент, нерастворимый в воде и других растворителях, содержит комплексно связанное железо.

Продигиозин. На средах, содержащих углеводы, часто развивается бактерия *Serratia marcescens* (старое название — *Bacterium prodigiosum*). Ярво-красная окраска ее колоний (а также клеточных суспензий) обусловлена присутствием пигмента продигиозина, у которого молекула со-

держит три пиррольных кольца. Этот пигмент встречается также у актиномицетов.

Индигоидин. К азахинонам (диазадифенохинонам) относится индигоидин – нерастворимый в воде синий пигмент, выделяемый в среду различными бактериями, такими как *Pseudomonas indigofera*, *Corynebacterium insidiosum*, *Arthrobacter atrocyaneus* и *A. polychromogenes*.

Виолацеин. *Chromobacterium violaceum* легко выделить из почвы, если положить зерна риса в чашку Петри на сильно увлажненную почву; колонии этого микроорганизма легко узнать по сине-фиолетовой окраске, обусловленной нерастворимым в воде пурпурным пигментом виолацеином. Этот пигмент представляет собой производное индола, образующееся при окислении триптофана.

Феназиновые пигменты. Многие пигменты, выделяемые водными бактериями в окружающую среду, относятся к производным феназина. Самый известный среди них – пиоцианин, образуемый клетками *Pseudomonas aeruginosa* (прежнее название – *P. pyocyanea*). Различные штаммы и виды псевдомонад выделяют феназин-1-карбоновую кислоту, оксихлорорафин или иодинин, а иногда все эти пигменты одновременно.

Вторичные метаболиты. Пигменты у многих микроорганизмов представляют собой вторичные метаболиты; это означает, что они не принадлежат к тем соединениям, которые имеются у всех этих организмов (см. разд. 10.4). Уже по их структуре видно, что они являются производными обычных метаболитов или структурных компонентов клетки. Некоторые пигменты обладают антибиотическими свойствами, так что многие пигментированные микроорганизмы являются продуцентами антибиотиков. Между пигментацией и образованием вторичных метаболитов существует такая тесная корреляция, что при наличии пигментов можно с большой долей вероятности ожидать образования антибиотиков и других биологически активных веществ.

3. Прокариоты. Систематический обзор

3.1 Введение

На основании упоминавшихся ранее признаков, таких как отсутствие ядерной мембраны, слабая компартментализация и наличие клеточной стенки из пептидогликана, все организмы, ранее причислявшиеся к дробянкам (Schyzophyta), а именно группы Schyzomyceae (грибы-дробянки, или бактерии в самом широком смысле) и Schyzophyceae (сине-зеленые водоросли, или цианобактерии), могут быть объединены в одну общую группу **прокариот** (Procaryotae). Описание и наименование регламентируются Международным кодексом номенклатуры бактерий. Он разработан Международным комитетом систематической бактериологии, который и осуществляет контроль за его соблюдением. Бактериологический кодекс в отличие от Ботанического содержит положение, согласно которому при описании нового штамма один образец культуры в жизнеспособном состоянии должен быть сдан в официально признанную коллекцию культур в качестве либо штамма для сравнения, либо типового штамма.

Описание бактерий. При описании бактерий необходимо прежде всего перечислить их **морфологические признаки**, т.е. указать, являются ли они кокками, палочками или спириллами, имеют ли капсулу и объединены ли отдельные клетки в агрегаты (нити, тетрады, пакеты); имеются ли у них жгутики и как они расположены; образует ли бактерия эндоспоры и красятся ли ее клетки по Граму. Морфологическое описание дополняется перечнем важнейших физиолого-биохимических признаков. Указываются: 1) отношение к кислороду, т.е. растут ли клетки в аэробных или в анаэробных условиях, либо в тех и других; 2) каким образом они получают необходимую энергию – в процессе дыхания, брожения или фотосинтеза; 3) зависимость роста от температуры и pH, с указанием оптимума и пределов устойчивости; 4) усваиваемые клетками питательные вещества; 5) места обитания; 6) наличие симбиотических или паразитических взаимоотношений; 7) клеточные включения, пигментация и состав капсулы; 8) компоненты клеточной стенки (пептидогликановый остов, липополисахариды, тейхоевая кислота); 9) серологическая дифференциация (поверхностные антигены, гомологичные белки); 10) состав оснований ДНК (мол. % GC); 11) гибридизация ДНК/ДНК, трансформируемость при межвидовом переносе ДНК; 12) последовательность нуклеотидов в 16S или 5S рРНК; 13) чувствительность к антибиотикам.

Номенклатура. Так же как для растений и животных, для бактерий применяется **биннарная номенклатура**: родовое и видовое название. Первоначальное правило, согласно которому в родовом названии должны быть отражены морфологические признаки, а в видовом — физиологические, позднее в связи с крупными новыми открытиями перестало соблюдаться. Бейеринк и Виноградский, ошеломленные разнообразием обмена веществ у бактерий, стали давать родовые названия, отражавшие их экологические, физиологические и биохимические особенности. Например, при выборе наименований для отдельных родов были учтены физиологические признаки (*Acetobacter*, *Nitrosomonas*, *Azotobacter*), пигментация (*Chromobacterium*, *Rhodomicrobium*), патогенность (*Pneumococcus*, *Phytomonas*) или используемые субстраты (*Haemophilus*, *Amylobacter*). По правилам номенклатуры следует придерживаться названий, предложенных в достоверных первоописаниях. Присвоение названия и его использование регламентируются твердыми правилами.

Классификация. Классификация микроорганизмов, причисляемых к прокариотам, учитывает в первую очередь практические моменты и служит для распознавания описанных форм. Под классификацией понимают распределение единиц по группам более высокого порядка. Она осуществляется по иерархической схеме. Основной единицей является чистая культура выделенной бактерии — «штамм». Штаммы объединяются в виды (*species*), виды в роды (*genus*, множественное число *genera*), а роды в семейства (латинские названия семейств оканчиваются на *-aceae*). Основой для классификации служит адекватное описание штаммов, в соответствии с которым и проводят сравнение и разграничение рассматриваемых единиц. Установлением соподчинения отдельных групп организмов занимается **таксономия**.

Следует различать два вида классификаций: филогенетические, или «естественные», с одной стороны, и искусственные — с другой. Построение естественной классификации — конечная цель таксономии бактерий, которая состоит в том, чтобы объединить родственные формы, связанные общностью происхождения, и на этой основе создать филогенетическое древо бактерий. Несомненно, когда-нибудь это удастся сделать, исходя из химических признаков — таких, как последовательность аминокислот в функционально сходных ферментных белках или последовательность нуклеотидов в консервативных нуклеиновых кислотах, например в рибосомных РНК.

Искусственная классификация ставит перед собой более скромные цели, чем филогенетическая. Она довольствуется объединением организмов в отдельные группы на основе их сходства и используется для идентификации и распознавания (определения) организмов. Искусственная система прежде всего рассчитана на использование ее в качестве ключа для определения. Наиболее полный труд, в котором описаны бактерии, — это «Руководство по определению бактерий Берги» (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*), восьмое издание которого вышло в свет в 1974 г. Оно содержит названия бактерий, описания их морфоло-

гических и физиологических особенностей, а также ссылки на литературные источники и ключи для определения вновь выделенных форм. В настоящее время подготавливается новое издание¹.

Нумерическая таксономия. Следующим шагом к созданию более объективной системы можно считать «нумерическую таксономию». Эта система основана на признании принципов Адансона, согласно которым самые различные признаки, поддающиеся учету, имеют одинаковое значение для характеристики организма. Для количественной оценки учитывают возможно большее число признаков, которые подбирают так, чтобы они были альтернативными, т.е. чтобы их варианты можно было обозначать знаками «плюс» или «минус». Оценка различных комбинаций признаков производят с помощью ЭВМ. При этом каждый из признаков одного штамма сравнивают с каждым признаком всех других штаммов. Считается, что сходство между двумя исследуемыми штаммами тем больше, чем больше отношение числа совпадающих признаков к числу всех учитываемых.

Для попарного сравнения пользуются коэффициентом сходства (величиной *S*). Он определяется следующим образом:

$$S = \frac{a + d}{a + b + c + d},$$

где *a* и *d* — суммы признаков, по которым штаммы А и В совпадают (*a* — оба положительные; *d* — оба отрицательные); *b* — сумма признаков, по которым штамм А положителен, а штамм В отрицателен; *c* — сумма признаков, по которым штамм А отрицателен, а штамм В положителен. В результате расчетов получаются величины от 0 до 1. *S* = 1 означает 100%-ное сходство, т.е. идентичность, а *S* < 0,02 — абсолютное несходство. Полученные величины вносятся в матрицу сходства и могут также быть представлены в виде дендрограммы (подобной филогенетическому древу). Однако нумерическая таксономия не имеет прямого отношения к филогении.

Филогения бактерий. Рибосомы — это места синтеза белка, и они имеются поэтому во всех клетках. По своим функциям они очень консервативны; в особенности это относится к рибосомным РНК (рРНК), так как на последовательность их оснований не может влиять ни вырожденность генетического кода, ни супрессорные мутации. Таким образом, рРНК отвечает требованиям, которые можно предъявить всеобщему филогенетическому маркеру. При определении последовательности нуклеотидов в 16S-рРНК у большого числа бактерий обнаружались как неожиданные различия, так и поразительные черты сходства. В результате каталогизации нуклеотидных последовательностей были установлены коэффициенты сходства (величины *S_{AB}*), что привело к созданию дендрограммы, которую следует признать филогенетиче-

¹ В 1984 г. вышел первый, а в 1986 г. — второй том нового издания под названием «*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*» — *Прим. ред.*

ским древом. Выявились неизвестные ранее взаимосвязи. Стали явными родственные отношения между отдельными группами фототрофных и нефототрофных грам-отрицательных бактерий, например родство *Rhodospseudomonas sphaeroides*¹ и *R. capsulata* с *Rhizobium* и *Paracoccus denitrificans*; *Chromatium*—с *Pseudomonas*, *Azotobacter* и *Escherichia coli*; *Rhodospseudomonas gelatinosa*²—с *Alcaligenes*; и наконец, родство *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodospseudomonas viridis* и *R. acidophila* с митохондриями. Это означает, что аэробные грам-отрицательные бактерии ведут свое происхождение от нескольких групп фототрофных бактерий. Таким образом, предположение о том, что аэробные бактерии произошли только от одной линии фототрофных бактерий, в свете данных анализа рРНК следует считать ошибочным.

Этот анализ, кроме того, привел к неожиданному выводу, что одна из групп бактерий очень сильно отличается от всех остальных; по-видимому, уже очень рано произошло разделение прокариот на две ветви, одну из которых составляет группа архебактерий, а другую—все остальные группы, которые объединяют под названием зубактерий:



Таким образом, можно думать, что от прародителей (прогенот) произошли, с одной стороны, архебактерии, а с другой—зубактерии. Имеются также данные, позволяющие предполагать тесные связи между архебактериями и эукариотами.

Обзор многообразия прокариот. Предлагаемый обзор имеет целью дать читателю, впервые изучающему эти вопросы, представление обо всем многообразии прокариот. Мы будем строго придерживаться 8-го издания «Руководства по определению бактерий Берги». В этом определителе бактерии разделены на 19 групп; однако там не рассматриваются цианобактерии, и ко времени выхода в свет этого издания еще не были известны факты, приведшие к отделению архебактерий. На основании многих новых открытий можно предсказать, что уже вскоре последуют новые перестановки и дополнения. Что безусловно останется, так это признаки, видимые в микроскоп. Относительно легко также устанавливаются зависимость роста бактерий от присутствия O_2 и окраска по Граму.

Рассмотрению прокариот мы предпошлим таблицу, в которой зубактерии разделены на группы по внешнему виду [на кокки, палочки и спириллы (искривленные палочки)], по способности расти в аэробных или

¹ = *Phodobacter sphaeroides*.—Прим. ред.

² = *Rhodocyclus gelatinosus*.—Прим. ред.

анаэробных условиях и по окраске по Граму. Для сохранения связи с определителем Берги здесь дается та же нумерация групп. Те бактерии, которые не удастся без большой натяжки отнести к одной из трех основных форм, будут приведены в таблице под рубрикой «Большие особые группы».

После этого в разделах 3.2–3.20 будут рассмотрены различные группы бактерий в соответствии с порядком их расположения в таблице. При этом отдельные группы будут описаны очень кратко, но мы дадим ссылки на ту часть этой книги, где те же группы бактерий будут охарактеризованы с физиологической и биохимической стороны. Несколько подробнее мы здесь опишем только те группы, о которых ничего или почти ничего не говорится в физиологической части книги.

Обзор системы прокариот уже указывает пути к идентификации бактерий. Каждый биолог, вероятно, по опыту знает, что с помощью ключей для определения можно идентифицировать только то, что ему уже было известно. Идентификация бактерий всегда предполагает наличие обширных знаний; поэтому если при идентификации палочковидной бактерии, выделенной из йогурта, почему-то определяется *Methanobacterium*, то есть все основания для сомнений!

3.2 Систематика: обзор системы прокариот

В основу систематики положено разделение бактерий на микроскопически легко различаемые формы (кокки, палочки, спириллы), окраска по Граму и отношение к молекулярному кислороду (аэробы, анаэробы) с ориентировкой на 19 групп бактерий, выделенных в определителе Берги (8-е издание, 1974 г.). Цианобактерии добавлены в виде 20-й группы.

1. Кокки—шарообразные (сферические) бактерии

А. Грам-положительные кокки

Группа 14. Грам-положительные кокки

Аэробные *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*

Анаэробные *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina*

Б. Грам-отрицательные кокки

Группа 10. Грам-отрицательные кокки и коккобациллы

Аэробные *Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Lamprospira*

Группа 11. Грам-отрицательные кокки

Анаэробные *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*

2. Палочки – вытянутые цилиндрические бактерии**А. Грам-положительные бактерии**

Группа 16. Грам-положительные палочки, не образующие споры

Аэробные *Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix, Coryophanon*

Группа 17. Коринеформные бактерии и актиномицеты

Аэробные *Corynebacterium, Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Rhodococcus, Propionibacterium, Eubacterium*

Bifidobacterium, Mycobacterium, Nocardia

Actinomyces, Franckia, Actinoplanes, Dermatophilus, Micromonospora, Microbispora, Streptomyces, Streptosporangium

Группа 15. Палочки и кокки, образующие эндоспоры

Аэробные *Bacillus, Sporolactobacillus, Sporosarcina, Thermoactinomyces*

Анаэробные *Clostridium, Desulfotomaculum, Oscillospira*

Б. Грам-отрицательные бактерии

Группа 7. Грам-отрицательные аэробные палочки и кокки

Аэробные *Pseudomonas, Xanthomonas, Zoogloea, Gluconobacter, Acetobacter*

Azotobacter, Azomonas, Beijerinckia, Derxia

Rhizobium, Agrobacterium, Alcaligenes

Brucella, Legionella, Thermus

Группа 12. Грам-отрицательные аэробные хемолитотрофные бактерии

Аэробные *Nitrobacter, Nitrospina, Nitrococcus, Nitrosomonas, Nitrosospira, Nitrosococcus, Nitrosolobus*

Thiobacillus, Sulfolobus¹, Thiobacterium, Thiovulum.

Группа 3. Хламидобактерии

Аэробные *Sphaerotilus, Leptothrix; Streptothrix, Crenothrix*

Группа 8. Грам-отрицательные факультативно-анаэробные палочки

Факультативно-анаэробные *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, Erwinia*

Yersinia

Vibrio, Aeromonas, Photobacterium

¹ По современным данным, *Sulfolobus* относится к архебактериям. – Прим. ред.

Группа 9. Грам-отрицательные анаэробные бактерии

Строго анаэробные *Bacteroides, Fusobacterium, Leptotrichia*

Группа 13. Метаобразующие и другие архебактерии

Строго анаэробные *Methanobacterium (Г+)¹, Methanothermus (Г+), Methanosarcina (Г+), Methanotherix, Methanococcus*

Аэробные *Halobacterium, Halococcus (Г+), Sulfolobus, Thermoplasma*

Анаэробные *Thermoproteus, Pyrodictium, Desulfurococcus*

3. Изогнутые палочки или гибкие клетки**Группа 6. Грам-отрицательные спиралевидные и изогнутые бактерии**

Аэробные *Spirillum, Aquaspirillum, Azospirillum, Oceanospirillum, Campylobacter*

Bdellovibrio, Microcyclus, Pelosigma

Группа 9. Грам-отрицательные изогнутые анаэробные бактерии

Анаэробные *Desulfovibrio*

Succinivibrio, Butyrivibrio

Selenomonas

Группа 5. Спирохеты

Аэробные и анаэробные *Spirochaeta, Cristispira, Treponema, Borrelia, Leptospira*

4. Большие особые группы**Группа 2. Скользящие бактерии (все грам-отрицательные)**

Myxococcus, Archangium, Cystobacter, Melittangium, Stigmatella, Polyangium, Nannocystis, Chondromyces

Cytophaga, Sporocytophaga, Flexibacter, Herpetosiphon, Saprospira

Beggiatoa, Thiothrix, Thioploca, Achromatium, Leucothrix, Vitreoscilla

Simonsiella, Alysiiella

Группа 4. Почкующиеся и стебельковые бактерии

Hyphomicrobium, Hyphomonas

Caulobacter, Asticcacaulis, Planctomycetes

¹ (Г+) – положительная окраска по Граму.

Ancalomicrobium, Prosthecomicrobium, Metallogenium, Blastobacter, Seliberia, Gallionella, Nevskia

Группа 18. Obligatно-паразитические бактерии: риккетсии и хламидии

Rickettsia, Coxiella, Chlamydia

Группа 19. Группа микоплазмы (Mollicutes)

Mycoplasma, Acholeplasma, Spiroplasma

Группа 1. Анаэробные аноксигенные фототрофные бактерии

Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium¹

*Chromatium, Thiocystis, Thiosarcina, Thiocapsa, Thio-
spirillum, Thiopedia, Amoebobacter, Ectothiorhodospira,
Lamprocystis, Thiodictyon*

*Chlorobium, Prosthecochloris, Pelodictyon, Chloroherpeton
Chloroflexus*

Группа 20. Аэробные, оксигенные фототрофные бактерии: цианобактерии (сине-зеленые водоросли)

Synechococcus, Gloeocapsa, Gloeotheca, Gloebacter

Pleurocapsa, Dermocarpa, Myxosarcina

*Oscillatoria, Spirulina, Lyngbya, Phormidium, Plectonema
Anabaena, Nostoc, Calothrix, Fischerella*

3.3 Грам-положительные кокки (группа 14)

К грам-положительным коккам в широком смысле из молочнокислых бактерий относятся такие бактерии, как *Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus* (разд. 8.2). Энергию они получают в результате брожения, не содержат (за некоторыми исключениями) геминных пигментов (цитохромов) и микроаэротолерантны. Им как бы противостоят аэробные и факультативно-анаэробные роды *Micrococcus* и *Staphylococcus*, а также облигатно-анаэробные роды *Sarcina, Peptococcus, Peptostreptococcus* и *Ruminococcus*.

К роду *Micrococcus* относятся пигментированные бактерии, желтые и оранжевые колонии которых часто встречаются на экспонированных в пыльном воздухе чашках Петри (разд. 2.2.8). Из-за того что они образуют пакеты клеток (тетрады), их относили к роду *Sarcina*. В настоящее время *Sarcina lutea, S. flava, S. aurantiaca* и другие виды объединяют в вид *Micrococcus luteus*. К нему относят также *Micrococcus lysodeikticus* – вид, названный так А. Флемингом за его выраженную чув-

¹ По современной классификации, сюда относятся также *Rhodocyclus, Rhodobacter, Rhodopina*. – Прим. ред.

ствительность к лизоциму. *Micrococcus* – облигатный аэроб, он отличается высоким содержанием GC (66–72%).

Название рода *Staphylococcus* происходит от вида его клеток под микроскопом; они собраны подобно ягодам в гроздьях (staphyli) (см. рис. 2.6); такое расположение клеток объясняется их нерегулярным делением в разных плоскостях. Представители этого рода – факультативные анаэробы; они образуют цитохромы только в аэробных условиях и относительно устойчивы к высушиванию. *S. aureus* из-за его токсинов и экзоферментов патогенен, вызывает нагноение. Другие штаммы при росте на неохлажденных пищевых продуктах образуют энтеротоксины и тем их отравляют.

Sarcina ventriculi (см. рис. 2.33) – микроаэротолерантная бактерия, легко выделяемая из почвы, но встречается также в содержимом желудка при желудочных заболеваниях. Эта бактерия отличается своими размерами (диаметр клетки 4 мкм), объединением клеток в крупные пакеты (более 64 клеток, связанных целлюлозой), широкой толерантностью к изменениям pH (рост при pH от 0,9 до 9,8), а также способностью к образованию эндоспор.

3.4 Грам-отрицательные кокки (группы 10 и 11)

В этой группе объединяются грам-отрицательные неподвижные кокки и короткие палочки. Они могут быть аэробными и анаэробными (некоторые – возбудители инфекционных болезней). Среди них встречаются обитатели почвы, слизистых оболочек и кишечного тракта млекопитающих.

Аэробные кокки (группа 10). Род *Neisseria* дает положительную оксидазную реакцию и включает бактерии, патогенные для животных и человека. *N. gonorrhoeae* – возбудитель гонореи, венерической болезни, которая благодаря чрезвычайно высокой чувствительности этой бактерии к пенициллину (бактериостатическая концентрация 1 мкг/мл) ныне почти забыта. *N. gonorrhoeae* трудно культивировать, ей необходимы 10% CO₂ в воздухе, она очень чувствительна к свету и высушиванию, поэтому заражение может произойти только при интимном контакте. *N. meningitidis* встречается в носоглотке, но может также проникнуть в кровеносное русло и вызвать воспаление мозговых оболочек. *Moraxella* также дает положительную реакцию на оксидазу и очень чувствительна к пенициллину. Существуют коккобациллы, не способные использовать углеводы. *Acinetobacter* – бактерия, дающая отрицательную реакцию на оксидазу; встречается в почве и в воде. Накопительную культуру можно получить в питательной среде с pH 5,5–6,0, содержащей 0,2% ацетата, и легко выделить бактерию; она, как правило, не использует глюкозу, ди- и полисахариды, но в остальном по разносторонней способности использовать субстраты сходна с *Pseudomonas*. Между штаммами

Acinetobacter calcoaceticus возможна передача генетических признаков путем трансформации.

Важная для дифференциальной диагностики этой группы оксидазная реакция основана на превращении диметил-*n*-фенилдиамина (N,N-диметил-1,4-диаминобензола) в окрашенное соединение под действием растворимого цитохрома *c*. Капли реактива наносят на колонии, выращенные на агаре, и наблюдают за появлением красной окраски.

Анаэробные кокки (группа 11). Наиболее известны грам-отрицательные строго анаэробные кокки *Veillonella alcalescens* (прежнее название – *Micrococcus lactilyticus*) и *Megasphaera (Peptostreptococcus) elsdenii*. И те и другие не способны сбраживать углеводы. *V. alcalescens* встречается в слюне человека и животных и в рубце жвачных. Они сбраживают органические кислоты, в особенности лактат, превращая их в пропионат, ацетат, CO₂ и H₂ (см. разд. 8.3 и 14.1). *Megasphaera elsdenii* сбраживает глутаминовую кислоту и другие аминокислоты; по-видимому, это обычный обитатель пищеварительного тракта животных.

3.5 Грам-положительные палочки, не образующие споры (группа 16)

Грамм-положительные бесспорные бактерии, способные расти в присутствии кислорода и при сбраживании углеводов (глюкозы, лактозы) превращающие их главным образом в молочную кислоту, объединяют под общим названием «молочнокислых бактерий». Сюда относят роды *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* и *Bifidobacterium*. Однако в определителе Берги в группе 16 приводятся только палочковидные молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*; роды, представленные кокками, отнесены к группе 14, а *Bifidobacterium* – к актиномицетам (группа 17). Все эти бактерии будут рассматриваться в связи с молочнокислым брожением (разд. 8.2).

По форме клеток и другим морфологическим и физиологическим признакам грамм-положительные бактерии можно расположить в ряд. Тогда палочковидные молочнокислые бактерии окажутся в самом начале этого ряда. Большинство молочнокислых бактерий – палочки правильной формы. Тенденция к образованию булавовидных и слабо ветвящихся клеток у них только намечается, в то время как у коринеформных бактерий, к которым относятся роды *Corynebacterium* и *Arthrobacter*, такая морфологическая изменчивость уже стала нормой. Способность к ветвлению еще больше выражена у клеток микобактерий. Это сближает их с проактиномицетами, которые временно образуют мицелий. Актиномицеты находятся в конце этого ряда. Многие представители названных групп легко распознаются по форме клеток и колоний и по физиологическим особенностям, но некоторых можно идентифицировать только по различным биохимическим признакам.

В качестве дополнения здесь нужно еще упомянуть бактерию

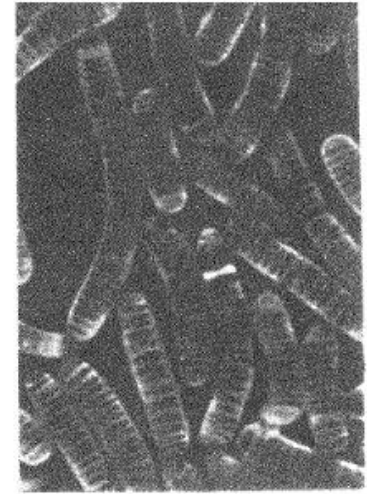


Рис. 3.1. *Caryophanon latum* – бактерия с перитрихальным расположением жгутиков, образующая иити. (Фото М.П. Пешкова.)

Caryophanon latum, которая обладает жгутиками и образует трихомы; ее, как правило, удается выделить из коровьего навоза. Это грамм-положительные, разделенные на клетки палочки (рис. 3.1) необычно крупных размеров (3 × 15 мкм).

3.6 Коринеформные бактерии (группа 17)

Коринебактерии. Чтобы выделить бактерии булавовидной формы (греч. согупе – булава), в 1896 г. был создан род *Corynebacterium*, в который входят виды, сходные с дифтерийной палочкой *C. diphtheriae*. Помимо плеоморфизма для представителей этого рода характерно «защелкивание» клеток при их делении. Оно происходит из-за того, что соединяющая дочерние клетки перегородка расслаивается на разных сторонах с разной скоростью, так что клетки внезапно оказываются под углом друг к другу. Наряду с этим наблюдается и множественное деление клеток, при котором из одной длинной палочки получается много коротких. *Corynebacterium diphtheriae* – возбудитель дифтерии. В физиологическом отношении эта бактерия – нетипичный представитель группы: она живет в микроаэробных и анаэробных условиях, тогда как большинство коринебактерий – аэробы. Она поражает полость зева и миндалин; патогенность ее обусловлена выделением экзотоксина, циркулирующего в крови и воздействующего на сердечную мышцу, почки и нервы («постдифтерийные параличи»). Токсин образуется только при субоптимальном обеспечении клеток железом; токсигенными являются только лизогенные штаммы.

К роду *Corynebacterium* относятся и другие виды, в том числе патогенные для животных, а также распространенные возбудители болезней растений (*C. michiganense*, *C. poinsettiae*, *C. fascians*). *C. mediolanense* – пер-

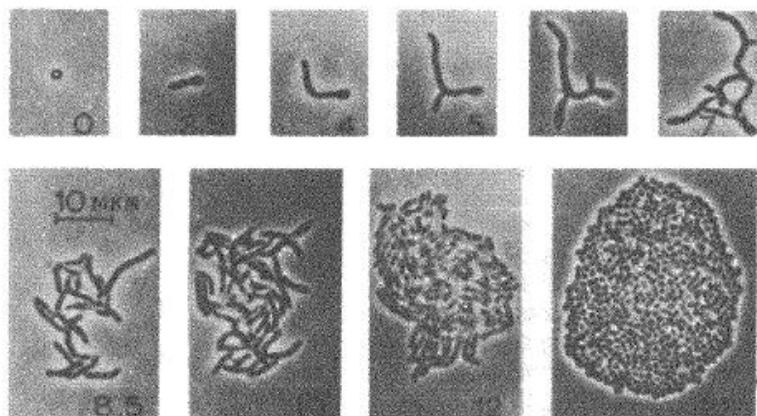


Рис. 3.2. Развитие микроколонии *Arthrobacter pyridinolis* на агаровой пластинке. Цифры указывают время инкубации (в часах). Фазовый контраст. (Kolenbrander P. E., Lotong N., Ensign J. C., Arch. Microbiol., 110 [1976], 239.)

вая бактерия, которая была использована для биологической трансформации стероидов (1938).

Артробактер. К роду *Arthrobacter* относят несколько видов коринформных бактерий, широко распространенных в почве. Этот род отличается сильно выраженной тенденцией к ветвлению клеток и к образованию кокков. Некоторые формы подвижны благодаря наличию жгутиков. Все виды — аэробы. *Arthrobacter* особенно легко выделяется из сухих почв; *Arthrobacter* и бациллы переживают многомесячное хранение почвы в сухом виде, большинство же бактерий, не образующих спор, погибает. *Arthrobacter* плеоморфен (т.е. морфологически многообразен) — на питательных средах в молодых колониях он растет в виде длинных палочек неправильной формы, а старые культуры содержат коккоидные формы (рис. 3.2). К коринформным почвенным бактериям относятся также некоторые виды *Cellulomonas*, использующие целлюлозу.

Формы, объединяемые в род *Arthrobacter*, приурочены к различным местообитаниям. По-видимому, *Arthrobacter* — это численно преобладающий представитель автохтонных почвенных микроорганизмов, т.е. он доминирует в почвах, в которых легко разлагаемые органические соединения уже разрушены и основной оставшейся фракцией органического вещества является гумус. При неблагоприятных условиях *Arthrobacter* способен медленно расти в виде кокков. Можно предполагать, что кокки, которые Виноградский находил в почвах, были в большинстве случаев клетками *Arthrobacter*. Другие штаммы *Arthrobacter* встречаются на растениях и в активном иле очистных сооружений.

Другие роды и виды. Многие коринформные бактерии выделяют в среду глутаминовую кислоту (разд. 10.2.2) и другие аминокислоты, по-

этому они приобрели промышленное значение. Другие формы этих бактерий растут на мягких сырах, как, например *Brevibacterium linens*, обладают умеренной протеолитической активностью и участвуют в созревании сыров. К коринформным бактериям с недавних пор относят также и виды *Propionibacterium* (разд. 8.3).

Коринформные бактерии как в морфологическом, так и в физиологическом отношении занимают промежуточное положение между молочнокислыми бактериями и микобактериями. Тенденция к ветвлению возрастает в ряду от пропионовых бактерий и коринформных бактерий в более узком смысле к микобактериям. В этом ряду можно обнаружить также переход от анаэробного к строго аэробному метаболизму. Однако, несмотря на ряд попыток, четко разграничить между собой роды, сведенные в группу коринформных бактерий, еще не удалось. Для новой классификации представителей этой чрезвычайно важной и экологически дифференцированной группы потребуются сведения о содержании GC, составе муреина и других признаках, а также данные нумерической таксономии.

3.7 Микобактерии (группа 17)

Всем микобактериям свойственно аэробное дыхание. По особенностям морфологии их следует расположить между коринформными и проактиномицетами (нокардиями). Мицелий они не образуют, но растут в виде слабо ветвящихся клеток неправильной формы. Микобактерии грамположительны и неподвижны. От коринформных они отличаются «кислотоустойчивостью»: в 1882 г. Эрлих обнаружил, что туберкулезные бактерии (*Mycobacterium tuberculosis*) после окраски анилиновыми красителями не удается обесцветить кислотой.

Обычно мазки бактерий, фиксированные по методу Циля — Нельсена, прогревают в присутствии карболового раствора фуксина, промывают и дифференцируют, обрабатывая спиртом с соляной кислотой. Микобактерии и нокардии при такой обработке кислотой не обесцвечиваются — они в этом смысле кислотоустойчивы. Некоторые сапрофитные микобактерии удается обесцветить соляной кислотой со спиртом, но не водным раствором HCl. Кислотоустойчивость обусловлена высоким содержанием в клеточных стенках миколовых кислот, которые делают поверхность микобактерий воскообразной и сильно гидрофобной.

Что касается состава клеточных стенок *Corynebacterium*, *Mycobacterium* и *Nocardia*, то здесь можно выделить как общие черты, так и различия. Их муреиновый каркас подобен остову стенок грамположительных бактерий; однако он связан с арабиногалактаном — полисахаридом, состоящим из арабинозы и галактозы, а с ним в свою очередь связаны липиды — миколовые кислоты. Это разветвленные 3-гидроксикислоты ($R^1-CHON-CHR^2-COOH$), которые в положениях 2 и 3 замещены алифатическими цепями. Эти цепи имеют различную длину. В миколовых кислотах коринформных бактерий 32–36 атомов углерода,

у нокардий 48–58, а у микобактерий 78–95; только кислоты с очень длинными цепями придают клеткам кислотоустойчивость.

Mycobacterium tuberculosis – возбудитель туберкулеза, болезни, поражающей преимущественно физически ослабленных людей и ставшей менее грозной лишь после того, как появились антибиотики и изониазид.

Микобактерии распространены и в почве. Многие из них могут хорошо расти на средах с парафинами, ароматическими и гидроароматическими углеводородами; их можно заставить расти на простой среде, содержащей только неорганические питательные соли, в парах нефти, нафталина или других летучих углеводородов, выделяющихся из почвы. Почвенные микобактерии не нуждаются в добавке других субстратов и растут относительно быстро, в то время как патогенные виды требуют сложных питательных сред и растут медленно.

3.8 Актиномицеты в узком смысле (группа 17)

К актиномицетам в узком смысле следует отнести бактерии, образующие подобие мицелия. Встречаются они главным образом в почве. Эти бактерии грам-положительны и связаны с коринеформными бактериями и микобактериями почти непрерывным рядом переходных форм. Почти все они аэробы.

Свое название актиномицеты получили от первого из описанных видов – анаэроба *Actinomyces bovis* – «лучистого грибка», который вызывает болезнь крупного рогатого скота актиномикоз, образует в тканях и челюстных костях большие друзы, имеющие лучистую структуру.

Актиномицеты хорошо растут на простых средах и различаются между собой по росту на поверхности и в глубине агара, по образованию воздушного и субстратного мицелия, образованию спор, спорангиев и т. п. (рис. 3.3 и 3.4). Проактиномицеты (род *Nocardia*) образуют как субстратный, так и воздушный мицелий, который распадается в старых колониях на палочковидные клетки; настоящих спор нет (рис. 3.3 и 3.5).

В отличие от этого у стрептомицетов – представителей большого рода *Streptomyces* – мицелий сохраняется. Воздушный мицелий часто бывает сильно развит; имеются особые воздушные гифы (спорофоры), от которых отщипываются конидии, служащие для распространения вида. Строение этих спорофоров (прямые, волнистые, спиральные, собранные в пучки, мутовчатые и т. д.), форма колоний, их цвет и величина, а также запах позволяют различать многочисленные виды и штаммы. Стрептомицетами обусловлен и тот запах, который исходит весной от свежевспаханной почвы. Из *Streptomyces griseus* было выделено масло, которому принадлежит этот запах; оно получило название «геосмин»; оказалось, что это 1,10-диметил-9-декалол. По мере роста промышленного значения стрептомицетов как продуцентов антибиотиков знания о них постепенно расширялись. Из сотен выделенных антибиотиков наиболее эффективными оказались стрептомицин (продукт *S.*



Рис. 3.3. Микобактерии, нокардии и актиномицеты: а – форма колоний, характерная для данного рода; б – разрез через заросшую бактериями поверхность агара. Показаны типичные формы роста субстратного мицелия (СМ) и воздушного мицелия (ВМ), спорофоры (Сна) и спорангии (Сно), а также лишённые жгутиков и обладающие жгутиками споры (Сно).

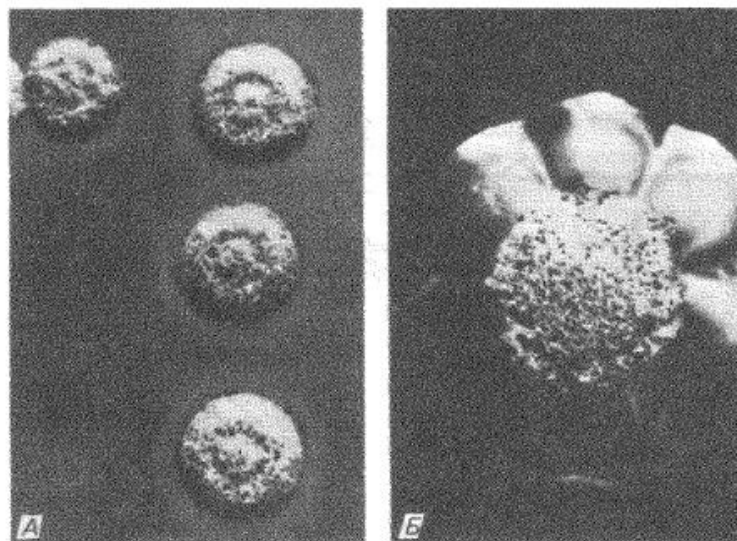


Рис. 3.4. Формы колоний стрептомицетов. А. Колонии *Streptomyces* с воздушным мицелием после 5 недель роста на глицерол-нитратном агаре. Б—начало образования воздушного мицелия колонией одного штамма *Streptomyces*. (Фото Р. Hirsch.)

griseus), хлоромидетин (продукт *S. venezuelae*), ауреомидин и тетрациклины (продукты *S. aureofaciens*).

Многие стрептомицеты используют целлюлозу, хитин и другие трудно разлагаемые природные вещества. В почве и в гнилых илах водоемов широко распространен разлагающий целлюлозу актиномицет

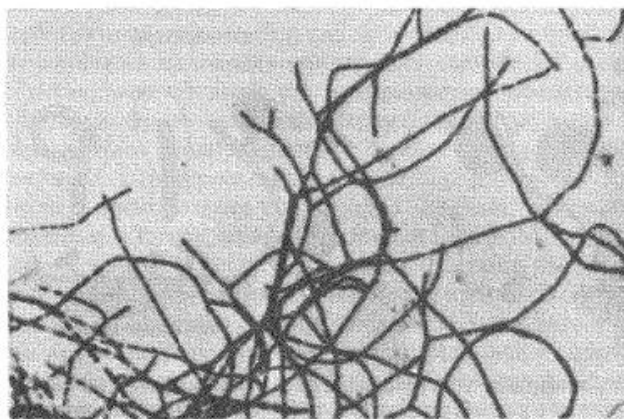


Рис. 3.5. Гифы субстратного мицелия *Nocardia saturnea*. Снимки мазка, окрашенного карболовым фуксинном, в световом микроскопе. (Фото Р. Hirsch.)

Micromonospora. Он образует плоские колонии, воздушного мицелия нет; споры располагаются поодиночке на концах слабо разветвленных спорофоров. *Microbispora* выглядит сходно, но образует воздушный мицелий и по две конидии.

Некоторые актиномицеты (*Actinoplanes*, *Streptosporangium*, *Ampullariella*) образуют споры не прямо на воздушных гифах, а в спорангиях. *Streptosporangium*—аэробный стрептомицет, разрушающий целлюлозу. На твердых субстратах он растет, образуя сначала субстратный мицелий, а затем воздушный. Кончики воздушных гиф набухают и превращаются в шаровидные спорангии диаметром 5–8 мкм, которые при созревании могут достигать 18 мкм. Гифа-носитель вырастает в шаровидную концевую клетку, закручивается в спираль и отшнуровывает спорангиоспоры. Последние у *Streptosporangium* неподвижны. *Actinoplanes* растет под поверхностью растительных остатков и тоже образует споры внутри головчатого спорангия. Когда спорангии открываются, спорангиоспоры становятся подвижными благодаря пучкам жгутиков.

Еще один актиномицет, образующий подвижные споры,—*Dermatophilus congolensis*. Это возбудитель распространенного у овец и лошадей дерматоза, поражающего кожу спины; он растет на твердых субстратах, образуя шероховатые или гладкие колонии с плотным субстратным мицелием. Гифы делятся продольно и поперечно, так что образуется до восьми параллельных рядов кокковидных клеток, которые могут высвободиться в результате желатинизации и лизиса стенки гиф. Кокковидные споры способны к передвижению с помощью жгутиков.

Споры актиномицетов не термостойки, но выдерживают высушивание. Единственный терморезистентный спорообразующий актиномицет—это *Thermoactinomyces vulgaris*. Он термофил и является одним из микроорганизмов, вызывающих саморазогрев заскирдованного влажного сена и органических отходов. По своему строению и по содержанию дипиколиновой кислоты споры этого вида сходны с эндоспорами *Bacillus* и *Clostridium*.

3.9 Палочки и нонни, образующие эндоспоры (группа 15)

Способность образовывать более или менее терморезистентные споры, за немногими исключениями, ограничивается группой палочек, большинство из которых имеет перитрихально расположенные жгутики. Это грам-положительные бактерии. Аэробные и факультативно-анаэробные палочки сведены в роды *Bacillus*, *Sporolactobacillus* и *Sporosarcina*, а анаэробные—в роды *Clostridium* и *Desulfotomaculum*. Многие спорообразующие виды хорошо известны благодаря своим биохимическим особенностям. Здесь будут рассмотрены лишь некоторые представители больших родов *Bacillus* и *Clostridium*.

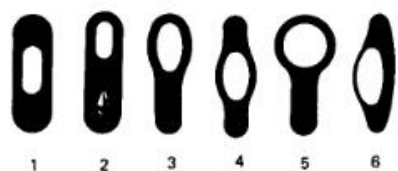


Рис. 3.6. Схематическое изображение типичных форм спорообразующих клеток. 1—центральная расположенная спора, которая не увеличивает размера материнской клетки (*Bacillus megaterium*); 2—терминальная спора, не увеличивающая размеров материнской клетки (*Bacillus thuringiensis*), с белковыми включениями; 3—терминальная спора, расширившая материнскую клетку булавовидно (*Bacillus macerans*); 4—центральная спора, придающая материнской клетке веретенообразную (кlostридиеподобную) форму (*Bacillus polymyxa*); 5—круглая терминальная спора, придавшая материнской клетке форму барабанной палочки (плектридальную форму) (*Bacillus sphaericus*); 6—латеральная спора; материнская клетка увеличилась в размерах, приняв форму веретена (*Bacillus laterosporus*).

Аэробные спорообразующие бактерии. Бактерии этого типа обитают в почве. Многие бациллы образуют цепочки клеток или нити. По форме спор и материнских клеток (рис. 3.6) бациллы могут быть разделены на три группы:

(I) Споры овальные или цилиндрические, не толще материнской клетки. Таковы споры большинства бацилл (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*).

(II) Овальные споры шире материнской клетки; они «раздувают» клетку изнутри в ходе споруляции (*B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. circulans*).

(III) Почти круглая спора в набухшем конце материнской клетки (*B. pasteurii*).

I. *Bacillus megaterium* с клетками величиной 2×5 мкм является гигантом среди зубактерий. Несколько меньше *B. cereus*; к этому виду теперь причисляют также вариант, получивший название «*mycoides*» за грибовидный рост на поверхности агара (*B. cereus* var. *mycoides*). Существуют «право- и левозакрученные» штаммы, но общий вид колоний очень типичен (рис. 3.7). В близком родстве с *B. cereus* находятся возбудитель сибирской язвы *B. anthracis*, который не имеет жгутиков и окружен капсулой из глутаминовой кислоты, и патогенная для насекомых бактерия *B. thuringiensis*. Вид *Bacillus subtilis*, получивший название «сенной палочки» (так как накопительные культуры получают из сеного экстракта), а также *B. licheniformis* образуют полипептидные антибиотики. Вторая из названных бацилл способна расти, получая энергию не только за счет кислородного дыхания, но также за счет брожения и анаэробного нитратного дыхания.

II. Бактерия *B. polymyxa* (ранее называвшаяся *B. asterosporus*) получила нынешнее свое название из-за того, что образует большое количество слизи (а также боченкообразные, в поперечном сечении звездчатые споры). Как и *B. licheniformis*, она образует 2,3-бутандиол. *B. ste-*

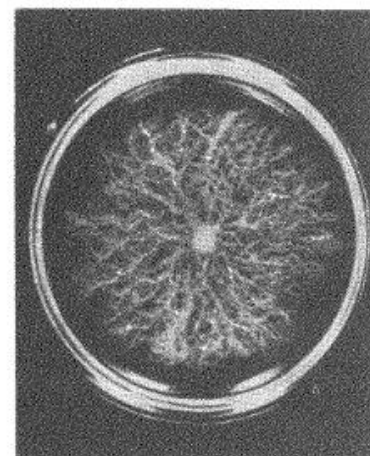


Рис. 3.7. Нитевидные цепочки клеток *Bacillus cereus* var. *mycoides*. На агаризованных средах они вырастают в колонии, сходные по виду с колониями грибов. (Фото D. Claus.)

arothermophilus—выраженный термофил (температурный оптимум для роста $50-65^{\circ}\text{C}$).

III. Вид *B. pasteurii* известен как классический пример бациллы, разлагающей мочевины; он конститутивно синтезирует уреазу, гидролизует мочевины до CO_2 и аммиака и приспособлен к высоким значениям pH. По своей физиологии с ним сходна *Sporosarcina ureae*, которая в морфологическом отношении, собственно, относится к сардинам, но по основным физиологическим признакам должна быть отнесена к бациллам (аэроб; образует терморезистентные споры, содержащие дипиколиновую кислоту).

Анаэробные спорообразующие бактерии. Для роста этих бактерий кислород не нужен. Виды, объединенные в род *Clostridium*, как правило, не имеют цитохромов и каталазы. Из-за высокого содержания флавиновых ферментов многие кlostридии при контакте с кислородом воздуха образуют перекись водорода, которая оказывает на их клетки токсическое действие. Ввиду того что сульфатредуцирующие бактерии, образующие споры, содержат протогеминные пигменты, их выделили из рода *Clostridium* в новый род *Desulfotomaculum* (*D. nitrificans*, *D. orientis*, *D. ruminis*). У анаэробных спорообразующих бактерий спора обычно значительно шире, чем вегетативная клетка. Материнская клетка в зависимости от положения споры может иметь различную форму.

Кlostридии обрабатывают большое число субстратов, включая полисахариды, белки, аминокислоты и пурины (разд. 8.5). По предпочитаемым субстратам можно различать **сахаролитические кlostридии** (например, *Clostridium butyricum*, *C. acetobutylicum*, *C. cellulosaedissolvens*), **пептолитические кlostридии** (*C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. botulinum*) и **кlostридии, разлагающие мочевую кислоту** (*C. acidurici*). Продуктами брожения являются бутират, бутанол, ацетон, 2-пропанол и во многих случаях большие количества газа (H_2 , CO_2). *C. pasteurianum*

и многие другие сахаролитические клостридии фиксируют молекулярный азот. *S. aceticum* превращает фруктозу или смесь CO_2 и молекулярного водорода в ацетат.

В качестве дополнения следует указать на *Oscillospira guilliermondii* — необычно крупную (5×100 мкм) анаэробную бактерию, разделяющуюся на клетки и образующую споры. Ее часто находят в слепой кишке морской свинки и в рубце жвачных.

3.10 Псевдомонады и другие грам-отрицательные палочки (группы 7, 12 и 3)

«Псевдомонадами» принято называть все грам-отрицательные палочковидные бактерии с полярно расположенными жгутиками. Поэтому к ним часто относят физиологически крайне специализированные зубактерии — *Nitrosomonas*, *Methylomonas*, тиобациллы и даже фототрофные бактерии (*Rhodospseudomonas*). При столь свободном применении этого названия оно отражает только морфологические признаки и не соответствует никакой таксономической категории.

Семейство Pseudomonadaceae объединяет грам-отрицательные организмы — прямые или слабо изогнутые палочки с полярно расположенными жгутиками, не образующие спор и растущие в аэробных условиях. Энергию они получают путем аэробного, а некоторые виды и анаэробного дыхания (денитрификация, нитратное дыхание), но не за счет брожения. Псевдомонады — хемоорганотрофы, но некоторые факультативно могут расти как хемолитотрофы. Род *Pseudomonas* представляет собой прототип семейства. Этот род, как и всю группу 7, можно охарактеризовать определенными метаболическими особенностями. Его представители способны усваивать большое число органических субстратов, в том числе гетероциклические и ароматические соединения, не используемые другими бактериями. Сахара, как правило, расщепляются ими по пути Энтнера — Дудорова (разд. 7.2.3). Некоторые виды *Pseudomonas* окисляют сахара не до конца — с выделением сахарных кислот (глюконовой, 2-оксглюконовой).

Благодаря своей нетребовательности псевдомонады встречаются повсеместно: в почве, водоемах, сточных водах и в воздухе. Если оставить открытой питательную среду, содержащую минеральные соли и органические кислоты или сахара, то псевдомонады обычно заселяют ее первыми. Часто их можно обнаружить по выделяемым водорастворимым пигментам, таким, например, как сине-зеленое производное феназина — пиоцианин, а также производные птерина с желто-зеленой флуоресценцией. Некоторые из выделяемых флуоресцирующих пигментов играют роль сидерофоров (разд. 7.7).

Виды псевдомонад. *Pseudomonas aeruginosa* (прежнее название — *P. pyocyanea*) — водная бактерия. Однако она обладает широкой приспособ-

ляемостью, может даже поражать людей и вызывать у них воспаление среднего уха, раневую инфекцию с образованием сине-зеленого гноя, а у ослабленных людей — и бактериемию. *P. fluorescens* и *P. putida* — широко распространенные водные и почвенные бактерии, способные окислять необычайно большое число различных органических соединений. Многие штаммы, патогенные для растений, были недавно сведены в один вид *P. syringae*. На примере *P. saccharophila*, водородной бактерии, был открыт путь катаболизма глюкозы Энтнера — Дудорова.

Ксантомонады. Патогенные для растений псевдомонады, имеющие желтый пигмент, были объединены в род *Xanthomonas*. Их пигмент представляет собой бромсодержащее полиеновое соединение. Штаммы *Xanthomonas campestris* выделяют плохо расщепляемые ферментами полисахариды, которые получают промышленным способом: водные растворы их используют как добавки для повышения вязкости (например, пудингов, диетических супов, типографских красок).

Другие аэробные грам-отрицательные палочки. Очень похожи на псевдомонад по своему метаболизму роды *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, уксуснокислые бактерии *Acetobacter* и *Gluconobacter* (разд. 10.1) и свободноживущие азотфиксирующие бактерии (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*; разд. 13.2).

В роды *Alcaligenes*, *Rhizobium* и *Agrobacterium* объединены бактерии, которые сходны по энергетическому обмену (дыхание) с аэробными псевдомонадами, но отличаются тем, что жгутики расположены у них не полярно, а субполярно или их имеется всего лишь 2–6 (дегенеративное перитрихальное жгутикование). К роду *Alcaligenes* относят факультативно-автотрофную водородную бактерию *A. eutrophus* (разд. 11.4). Бактерии рода *Rhizobium*, будучи эндосимбионтами бобовых растений, способны фиксировать молекулярный азот (разд. 13.1). *Agrobacterium tumefaciens* вызывает опухоли на корневых шейках, стеблях или листьях различных растений (разд. 4.3).

Хемолитотрофные бактерии (группа 12). Аэробные хемолитоавтотрофные бактерии (гл. 11) способны использовать неорганические ионы или соединения в качестве источников водорода или соответственно доноров электронов. Источником углерода для них может служить углекислота, которую они фиксируют в рибулозобисфосфатном цикле. Большинство этих бактерий, однако, лишь факультативные автотрофы: они могут использовать и органические субстраты. К числу автотрофов относятся представители многих родов, среди них *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Xanthobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus* и *Nocardia*.

В группу 12 в определителе Берги включены только бактерии, использующие аммиак, нитрит, соединения серы или железо (например, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Thiobacillus*); некоторые из них — облигатные автотрофы. Они будут подробно рассмотрены в разделах 11.1–11.3.

Хламидобактерии (группа 3). Наиболее известна нитчатая бактерия *Sphaerotilus natans*. Эта бактерия растет в загрязненных проточных во-



Рис. 3.8. *Sphaerotilus natans* с клетками в частично опустевшем чехле. (Stokes J. L., J. Bacteriol., 67 [1954], 278.)

дах, в отстойниках сахарных заводов, на плотинах и в градирнях. Она образует нити и хлопья или, прочно прикрепившись к подложке, длинные, напоминающие мех полотнища или чехлы. За короткое время *S. natans* может полностью забить трубы, отстойники и каналы.

Sphaerotilus natans — это одноклеточная грам-отрицательная бактерия с полярным пучком жгутиков, которую можно отнести к псевдомонадам. Характерна форма ее роста: она растет в виде длинных нитей, которые состоят из цепочки клеток, удерживаемых вместе тонким трубчатым чехлом (рис. 3.8). Этот чехол состоит из гетерополисахарида, и его следует рассматривать как капсулу. Бактерии размножаются внутри чехла поперечным делением и могут покинуть его в виде подвижных клеток. На агаризованных средах часто происходит «диссоциация», т.е. образуются колонии двух типов — шероховатые, состоящие главным образом из нитей, и гладкие, состоящие в основном из отдельных клеток. По величине клеток, толщине нитей и другим признакам различают много разновидностей.

Нитчатые бактерии широко распространены в водах, богатых железом $[Fe(OH)_2]$: в канавах, источниках, дренажных трубах и болотах. Раньше их называли «охровыми бактериями» (*Leptothrix ochracea*). Естественные места их обитания бедны пригодными для них органическими веществами, но богаты железом. Их чехлы поэтому пронизаны и окружены частицами окиси железа. После работ Виноградского (1888) эти бактерии долгое время рассматривались как автотрофные микроорганизмы, окисляющие железо; но, поскольку ни физиологические, ни биохимические исследования не подтвердили это предположение, сейчас *L. ochracea* и отличающуюся от нее по форме роста *Cladothrix dichotoma* считают просто экологическими вариантами *Sphaerotilus*.

3.11 Грам-отрицательные факультативно-анаэробные палочки (группа 8)

Все принадлежащие к этой систематической группе виды характеризуются продуктами осуществляемого ими брожения; в анаэробных условиях необходимую для роста энергию они получают с помощью процессов брожения и выделяют при этом ряд органических кислот. Количественно не преобладающим, но все же характерным продуктом бывает муравьиная кислота. Типичные представители этой группы, такие как *Escherichia coli*, *Salmonella* и *Shigella*, обитают в кишечнике (enteron), поэтому всю группу называют Enterobacteriaceae. Эти бактерии будут рассмотрены в разд. 8.4.

3.12 Грам-отрицательные анаэробные бактерии (группа 9)

Грамм-отрицательные анаэробные палочки и бактерии, имеющие вид вибрионов, широко распространены в анаэробных экосистемах. К изучению этих бактерий приступили относительно поздно; оказалось, что они численно преобладают в кишечном тракте, рубце жвачных и гниющем иле. Это обусловлено главным образом их чувствительностью к кислороду и потребностью в CO_2 . Палочки либо неподвижны, либо подвижны и обладают перитрихально расположенными жгутиками.

Виды рода *Bacteroides* (*B. fragilis*, *B. succinogenes*) относятся к доминирующим грам-отрицательным бактериям в человеческом кале. Каловые массы могут на 30% (по весу) состоять из бактерий. В 1 г сырой массы насчитывают 10^{10} представителей рода *Bacteriodes*, 10^6 – 10^8 колиформных бактерий и примерно столько же стрептококков и лактобацилл. Численное отношение строго анаэробных бактерий к факультативным анаэробам составляет примерно 40:1. Все виды рода *Bacteroides* осуществляют только брожение и превращают глюкозу в сукцинат, ацетат, формиат, лактат и другие кислоты.

Род *Fusobacterium* получил свое название за веретеновидную форму клеток; это относительно длинные палочки. Для рода характерно то, что главным продуктом брожения является бутират. Различные виды встречаются в кишечнике и кале, а также в полости рта.

Leptotrichia имеет форму нитей длиной до 200 мкм, лишенных жгутиков. *L. buccalis* встречается во рту. Главный продукт сбраживания глюкозы — DL-лактат.

Примыкающие к этим трем родам бактерии, имеющие форму вибрионов, будут рассмотрены в разд. 3.13 (*Selenomonas*, *Butyrivibrio*, *Succinivibrio*) или, в зависимости от особенностей экологии и метаболизма, в других разделах (*Desulfovibrio* в разд. 9.2, *Selenomonas* в разд. 8.3, *Butyrivibrio* в разд. 8.5).

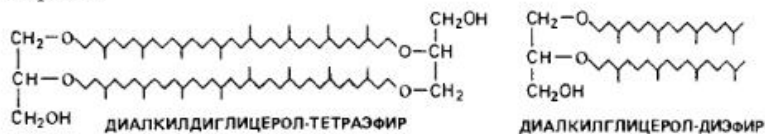
3.13 Метанобразующие бактерии и другие архебактерии (группа 13)

К группе 13 в определителе Берги отнесены метанобразующие бактерии. По многим причинам их в последнее время объединяют с двумя другими группами под общим названием «архебактерии». От всех остальных бактерий — зубактерий — они отличаются рядом важных признаков, и их находят в местообитаниях с экстремальными условиями. Эти условия сходны с теми, которые, вероятно, существовали на заре развития земной жизни. Среди архебактерий есть литоавтотрофы и гетеротрофы, анаэробы и аэробы. Все они имеют много общих признаков, свойственных только им. Однако между отдельными представителями архебактерий, по-видимому, имеются такие же различия в отношении формы клетки, ее компонентов и обмена веществ, какие существуют и между представителями зубактерий. Современное состояние исследований позволяет выделить среди архебактерий три группы: метанобразующие бактерии, галобактерии и термоацидофильные бактерии.

Общие признаки. У архебактерий есть целый ряд общих особенностей. Это касается состава клеточной стенки, липидов, аппарата транскрипции и трансляции, простетических групп и коферментов, механизма автотрофной фиксации CO_2 , а также способа получения энергии. Хотя результаты исследований еще весьма фрагментарны, мы попытаемся сделать общий обзор этой группы.

Клеточная стенка не имеет пептидогликанового остова, в лучшем случае она содержит псевдомуреин или только белки и полисахариды. Этим объясняется нечувствительность архебактерий к антибиотикам, нарушающим синтез клеточных стенок у зубактерий, — к пенициллину, цефалоспорины и D-циклосерину.

Плазматическая мембрана вместо глицериновых эфиров жирных кислот содержит глицериновые эфиры с C_{20} (фитанил)- и C_{40} (бифитанил)-изопrenoидными алкилами. В качестве нейтральных липидов встречаются также свободные C_{15} - и C_{30} -изопrenoидные углеводороды:



Архебактерии отличаются от зубактерий по составу ДНК-зависимых РНК-полимераз; эти ферменты состоят у них из более чем четырех субъединиц и нечувствительны к антибиотикам рифампицину и стрептолидигину. Рибосомные нуклеиновые кислоты (16S и 5S) существенно отличаются по последовательности нуклеотидов. Трансляция нечувствительна к хлорамфениколу, однако тормозится дифтерийным токсином,

который не действует на зубактерии, но подавляет синтез белка у эукариот.

Среди коферментов и простетических групп встречаются компоненты, которые хотя и сходны с таковыми у зубактерий и эукариот, но не идентичны им: производное 5-деазарибофлавина F_{420} , никельтетрапиррольный фактор F_{430} , метаноптерин, кофермент М и другие. Эти факторы были обнаружены у метанобразующих бактерий (разд. 9.4). Однако обобщающие выводы делать еще рано.

Автотрофная фиксация CO_2 осуществляется не с помощью рибулозобисфосфатного цикла. Метаногенные бактерии используют для этого путь ацетил-СoА (разд. 9.4). Такой путь, однако, функционирует и у ряда зубактерий.

Процесс преобразования энергии (регенерации АТФ), вероятно, основан на создании протонного потенциала и функционировании АТФ-синтетазы, и его можно рассматривать как примитивное «анаэробное дыхание». Акцептором электронов служит CO_2 , сера или (у немногих архебактерий) молекулярный кислород.

Метанобразующие бактерии. Среди бактерий, образующих метан, встречаются практически все формы, известные у зубактерий: кокки (*Methanococcus vannielii*), палочки (*Methanobacterium formicicum*), короткие палочки (*Methanobrevibacter ruminantium*, *M. arboriphilicus*), спирали (*Methanospirillum hungatei*), пакеты кокков (*Methanosarcina barkeri*) или нити (*Methanotherix soehngenii*) и даже формы, образующие пластины из клеток (*Methanoplanus limicola*). Существуют мезофильные и термофильные виды (*Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanothermus fervidus*). В настоящее время уже выделяют шесть семейств, а число описанных родов и видов быстро растет. Содержание GC варьирует в пределах от 27 до 61 мол. %. Об экологии и метаболизме этих бактерий будет сказано в разд. 9.4.

Галобактерии. Роды *Halobacterium* и *Halococcus*¹ содержат экстремально галофильные формы. Это аэробы и гетеротрофы. Их находят в солевых растворах, где добывают морскую соль. Во время массового размножения галобактерий, содержащих каротиноиды, вода кажется ярко-красной. Они лучше всего растут в 3,5–5 М растворе NaCl. Еще одна их особенность — это способность использовать в своем метаболизме энергию света (разд. 12.3).

Термоацидофильные бактерии. В этой группе до сих пор объединяют неметаногенные термофильные архебактерии, имеющие между собой мало общего. Среди них есть автотрофы и гетеротрофы, крайне ацидофильные и нейтрофильные, аэробные и анаэробные представители.

Для *Sulfolobus acidocaldarius* местом обитания служат кислые горячие источники, где эта бактерия окисляет серу до сульфата (разд. 11.2). Особняком стоит *Thermoplasma acidophilum*; так же как и микоплазма,

¹ В последнее время описаны три новых вида галобактерий: *Haloarcula*, *Natrobacterium* и *Natrococcus*. — Прим. ред.

она не имеет клеточной стенки. Эта бактерия лучше всего растет при 59°C и pH 1–2. Место ее обитания – самонагревающиеся терриконы угольных шахт, но она была найдена и в горячих источниках. Ее геном – наименьший из всех изученных геномов непаразитических бактерий (1·10⁹). Она способна расти в дрожжевом экстракте как аэробный гетеротроф. Перечисленным аэробным видам противостоит группа анаэробных видов, объединяемых под названием *Thermoproteales*. Они были выделены из горячих источников на склонах вулканов и на дне морей. Это крайние термофилы (оптимумы от 85 до 105°C), и им свойствен тип метаболизма, называемый «серное дыхание» (разд. 9.3); они окисляют H₂ и восстанавливают элементарную серу до сероводорода. Среди них встречаются факультативные автотрофы (*Thermoproteus tenax*), облигатные автотрофы (*Thermoproteus neutrophilus*, *Pyrodictium occultum*) и гетеротрофные бактерии (*Desulfurococcus*, *Thermococcus*, *Thermodiscus*).

По мере изучения этой группы организмов становится все яснее, что архебактерии, судя по особенностям их клеточных компонентов, очень рано отделились от эубактерий; при этом большинство из них – вероятно, прямые потомки тех прабактерий, которые научились использовать доступные на заре эволюции неорганические Н-доноры (H₂) и Н-акцепторы (CO₂, серу) и содействовали появлению уже более 3 млрд. лет назад отложений восстановленного углерода в осадочных породах.

3.14 Изогнутые палочки: спириллы и вибрионы (группы 6 и 9)

Спириллы и вибрионы – грам-отрицательные водные бактерии, способные передвигаться с помощью жгутиков.

Спириллы отличаются спиральным строением клетки и биполярным расположением жгутиков; энергию они получают за счет дыхания. Выделяют несколько родов спирилл. Род *Spirillum* представлен только одним видом – *S. volutans*. Это гигантская спирилла, которую всегда можно найти в свиной навозной жиже; она получила известность благодаря открытию «волютина» (полифосфатов); в чистой культуре растет только при пониженной концентрации O₂ (примерно 5%), ее следует поэтому считать микроаэротолерантной. Большая часть спирилл объединена в род *Aquaspirillum* (*A. itersonii*, *A. serpens*). Эти организмы тоже обычно не переносят нормального парциального давления кислорода.

Вибрионы. Вибрионы – факультативные анаэробы и по своему метаболизму сходны с энтеробактериями (смешанное кислотное брожение). Наиболее известен *Vibrio cholerae*, возбудитель холеры. Он распространяется с водой (через сточные воды); растет в кишечнике, выделяя токсин и вызывая ферментативный лизис слизистой, что приводит к большой потере воды организмом.

Bdellovibrio bacteriovorus – аэробная бактерия, паразитирующая на

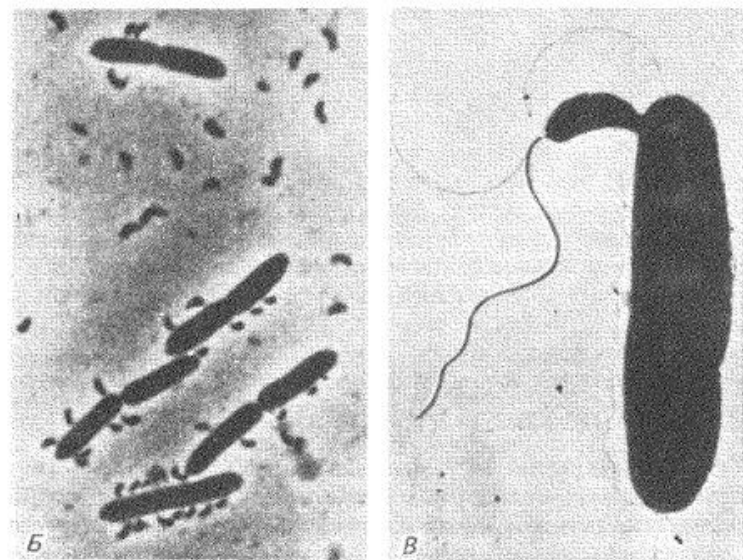
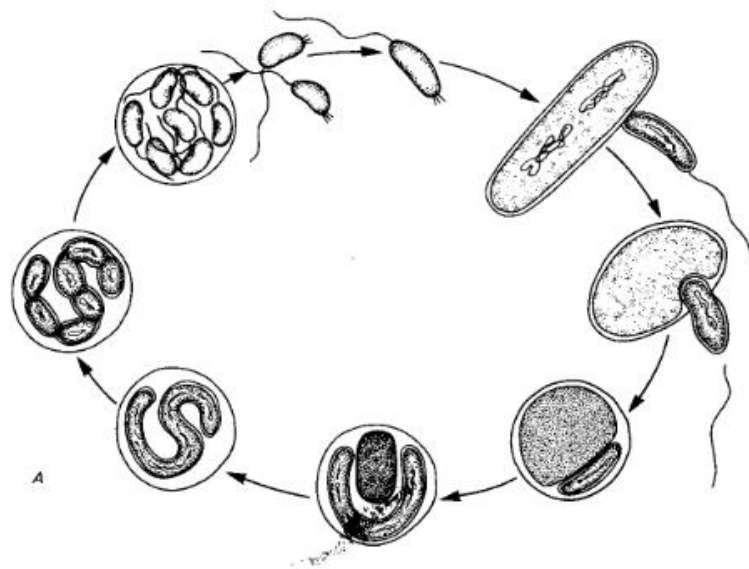


Рис. 3.9. Бактерия *Bdellovibrio bacteriovorus*, паразитирующая на других бактериях. А. Цикл роста в бактерии-хозяине. Б. Бактерии *Erwinia carotovora*, пораженные *Bdellovibrio*; 2200 ×. В. Начальная стадия поражения псевдомонады; 20 000 ×. (Stolp H., *Naturwissenschaften*, 55 [1968], 57.)

других бактериях. Клетки относительно малы и очень подвижны благодаря толстому (50 нм) жгутику (рис. 3.9); за 1 с они перемещаются на 100 мкм, что равно 70-кратной длине собственного тела. Когда паразит наталкивается на бактерию-хозяина, он прикрепляется к ее клеточной стенке передним (противоположным месту расположения жгутика) концом (рис. 3.9). Иногда паразит вращается вокруг продольной оси. Пораженная им клетка вскоре округляется, превращаясь в подобие сферопласта. *Bdellovibrio* проникает через клеточную стенку в периплазматическое пространство. Там клетка паразита растет в длину до тех пор, пока не будут израсходованы питательные вещества, извлекаемые из постепенно уменьшающегося протопласта хозяина. Затем происходит множественное поперечное деление, при котором образуется несколько клеток равной величины. В конце концов клетка хозяина растворяется, а потомство бактерии-паразита освобождается и может снова нападать на другие бактерии. По мере размножения и распространения паразита лизис бактерий становится макроскопически заметным: на бактериальном газоне появляются зоны лизиса, или «дырки», а в суспензиях уменьшается светорассеяние. В отличие от бактериофагов, которые размножаются только в растущих бактериях, *Bdellovibrio* поражает и лизирует также и нерастущие клетки. Штаммы *Bdellovibrio*, выделенные из различных почв, различаются кругом своих хозяев. Они лизируют главным образом грам-отрицательных бактерий, предпочитают псевдомонад и энтеробактерий. Во время как дикий тип — облигатный паразит и всегда нуждается в «кормовых бактериях», некоторые мутанты способны расти как сапрофиты на сложных средах. Есть основание предполагать, что паразитизм *Bdellovibrio* служит приспособлением к жизни в среде, бедной питательными веществами.

Строго анаэробные вибрионы. Вторая группа бактерий, имеющих вид вибрионов, включает строгих анаэробов *Desulfovibrio*, *Selenomonas*, *Butyrivibrio* и *Succinivibrio*. *Desulfovibrio* по типу метаболизма относится к сульфатредуцирующим бактериям (разд. 9.2). *Selenomonas sputigena* встречается в ротовой полости человека в налете на зубах, а *S. ruminantium* — в рубце жвачных. Оба вида характеризуются латерально расположенными жгутиками и растут, сбраживая углеводы до пропионовой и уксусной кислот.

3.15 Спирохеты (группа 5)

Спирохеты — группа одноклеточных хемогетеротрофных бактерий с очень характерной морфологией. Строением своих клеток и способом передвижения они отличаются от всех других бактерий. Клетка спиралевидная, как у спириллы, но не ригидная, а чрезвычайно гибкая. В сравнении с длиной (5–500 мкм) толщина ее необычно мала (0,1–0,6 мкм). Поэтому спирохеты проходят через мелкопористые фильтры (с отверстиями 0,2–0,45 мкм), задерживающие большинство бактерий, и путем фильтрации можно получать их накопительные

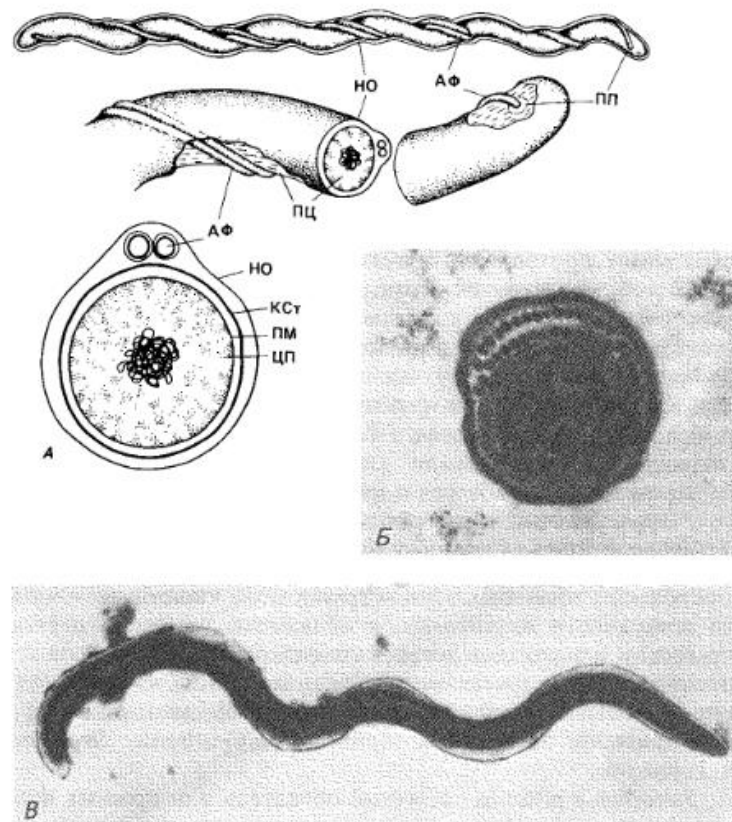


Рис. 3.10. Клетка спирохеты. А. Протоплазматический цилиндр (ПП) обвит аксостилем, состоящим в данном случае из двух осевых фибрилл (АФ), каждая из которых на одном конце прикреплена к протоплазматическому цилиндру (ПП — прикрепительная пора). Фибриллы, идущие от разных концов клетки, перекрываются. Аксостиль и протоплазматический цилиндр окружены наружной оболочкой (НО). КСт — клеточная стенка; ПМ — плазматическая мембрана; ЦП — цитоплазма. (Holt S. C., Microb. Rev., 42 [1978], 114.) Б и В. Электронные микрофотографии поперечного среза (Б, 110 000 ×) и всей клетки (В, 7000 ×) спирохеты из ротовой полости с несколькими осевыми фибриллами. (Listgarten H., J. Bacteriol., 88 [1964] 1087.)

культуры. Из-за малой толщины клетки спирохет трудно увидеть в светлом поле, и их обычно наблюдают в условиях фазового контраста или в темном поле.

Строение клетки. В клетках спирохет можно различать три главных компонента: протоплазматический цилиндр, осевые фибриллы и наружную оболочку (рис. 3.10). Спирально извитой протоплазматический цилиндр снаружи окружен комплексом из плазматической мембраны

и клеточной стенки. Вокруг цилиндра обвиваются нити, называемые по отдельности осевыми фибриллами, а в совокупности — аксостилем. Каждая фибрилла одним концом прикреплена вблизи конца клетки, а другой ее конец свободен. Число фибрилл варьирует от вида к виду: у *Treponema pallidum* и *Leptospira* имеется чаще всего 4 фибриллы, у *Borrelia* до 18, а у *Cristispira* более сотни. На обоих концах клетки прикреплено примерно одинаковое число фибрилл; в середине или по всей длине клетки фибриллы перекрывают друг друга. Наружная мембрана охватывает протоплазматический цилиндр и фибриллы.

Способ передвижения. Хотя спирохеты не обладают жгутиками, они способны плавать, не соприкасаясь с твердыми поверхностями и не скользя по ним. Вероятнее всего, в движении участвуют фибриллы. Фибриллы сходны с жгутиками по своему составу (состоят из белка флагеллина), способу прикрепления к телу клетки и спиральному расположению рядов субъединиц. По-видимому, фибриллы, вращаясь или же сокращаясь, обуславливают характерное для спирохет движение: эти бактерии могут изгибаться и передвигаться змееобразно или толчками.

Распространение, места обитания и важнейшие представители. Свободноживущие спирохеты могут быть обнаружены во многих водоемах (в лужах, прудах и в море). Другие относятся к нормальной автохтонной микрофлоре животных. Они встречаются в кишечнике млекопитающих, на поверхности жгутиковых, в кишечнике термитов, переваривающих древесину, и тараканов, в кристаллическом стебельке моллюсков, в рубце жвачных и в других местообитаниях. Лишь немногие из них патогенны (вызывают сифилис, возвратный тиф, лептоспирозы).

Различают пять родов: *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema*, *Borrelia* и *Leptospira*.

Spirochaeta plicatilis — обычный обитатель ила пресных и соленых водоемов. Она никогда не растет в очистных илах, но неизменно присутствует в мезосапробных зонах водоемов, в деревенских прудах и лужах, а также в иле с большим количеством пурпурных бактерий. *S. plicatilis* обращает на себя внимание своим характерным безостановочным движением. В лаборатории ее удается культивировать лишь в течение короткого времени. *Spirochaeta zuelzeri* встречается в гниющих илах водоемов. Она строго анаэробна, может расти на питательной среде с дрожжевым экстрактом и глюкозой, способна использовать многие сахара и крахмал; лучше всего она растет при 37–40°C. Как по внешнему виду, так и по антигенной структуре эта бактерия сходна с *Treponema pallidum* и дает положительную реакцию связывания комплекта с сифилитической сывороткой. *S. zuelzeri*, так же как и спирохеты из рубца жвачных, сбраживает глюкозу до лактата, ацетата, сукцината, CO₂ и H₂, т.е. сходна по типу брожения с *Escherichia coli*.

Cristispira живет в кристаллическом стебельке и желудочно-кишечном тракте пресноводных и морских двусторчатых моллюсков (*Anodonta*, *Pecten*, *Venus* и др.). Витки спирали более крутые, чем у *Spirochaeta plicatilis*; толщина тела клетки составляет 0,5–3 мкм; во-

круг клетки — нежная оборка, винтообразно обвивающая цилиндр. Эта оборка (*crista*) по своему расположению соответствует аксиальной нити. Она состоит более чем из 100 отдельных фибрилл.

К *Treponemaceae* относятся более мелкие формы спирохет, в том числе *Treponema pallidum* (возбудитель сифилиса) и *T. pertenue* (возбудитель тропической болезни фрамбезии). Некоторые трепонемы — относительно безобидные паразиты ротовой полости; *T. macrodentum* легко можно выделить из слюны и налета на зубах. *T. pallidum* еще никогда не удавалось надежно выращивать на искусственных средах.

К роду *Borrelia* относят анаэробных спирохет, легко окрашиваемых анилиновыми красителями. Это паразиты различных членистоногих, а также возбудители болезней человека и других позвоночных («спирохеты крови»). *B. recurrentis* — возбудитель возвратного тифа. На *B. anserina* Эрлих и Гата испытывали мышьяковистые препараты против сифилиса, пока не достигли успеха, найдя весьма действенное химиотерапевтическое средство — сальварсан.

К роду *Leptospira* относятся самые мелкие аэробные спирохеты; толщина их 0,1–0,25 мкм, а длина 4–8 мкм. Они отличаются крючкообразно загнутыми концами клеток. *L. biflexa* — аэробная бактерия, обитает в пресной воде (прудах, лужах; ее можно выделить из водопроводной воды), растет на обычных питательных средах. Из патогенных лептоспир были исследованы *Leptospira icterohaemorrhagiae* (возбудитель «болезни Вейля»), *L. pomona* (возбудитель болезни свинопасов) и *L. canicola* (возбудитель инфекционной желтухи). Эти лептоспиры попадают в организм с водой или пищей, проникают в кровь, почки и печень и нарушают функцию этих органов, что приводит к кровоизлияниям и желтухе.

3.16 Скользящие бактерии (группа 2)

Способностью передвигаться путем скольжения обладают лишь немногие бактерии. Их объединяют в группу «скользящих» бактерий и подразделяют на ряд подгрупп:

I. Бактерии, накапливающие в своих клетках серу, в том числе формы, образующие трихомы (*Beggiatoa*, *Thiothrix*), и одноклеточные формы (*Achromatium*).

II. Не накапливающие серу бактерии, образующие трихомы, такие как *Vitreoscilla*, *Leucothrix* и *Saprospira*, а также «ротовые осциллярии» *Simonsiella* и *Allysiella* (см. рис. 3.16).

III. Одноклеточные палочковидные бактерии, к которым относятся миксобактерии, группа *Cytophaga* и группа *Flexibacter*.

IV. Передвигающаяся путем скольжения нитчатая бактерия *Chloroflexus*; она будет рассмотрена среди анаэробных фототрофных бактерий (разд. 12.1).

V. Цианобактерии, если они вообще подвижны, тоже передвигаются путем скольжения. Они описаны в разд. 3.21.

Подгруппа I. *Beggiatoa*—бесцветная нитчатая серобактерия. Она образует трихомы из клеток одинаковой ширины, очень похожа по своему строению на цианобактерию *Oscillatoria*. По диаметру нитей (от 1,5 до 35 мкм) различают несколько видов. Клетки обычно заполнены капельками серы, и поэтому бесцветные нити кажутся белыми. Нити движутся путем скольжения. *Beggiatoa*—аэроб; образует паутиноподобный покров на черном иле медленно текущих вод или же в море, там, где содержащая H_2S вода приходит в соприкосновение с воздухом. Сульфид окисляется до сульфата, и в качестве промежуточного продукта внутри клеток временно может накапливаться элементарная сера. Исследуя *Beggiatoa*, Виноградский (1888) развил представление о хемолитоавтотрофном типе обмена веществ; клетка может получать энергию путем окисления восстановленных неорганических соединений и при этом синтезировать органические вещества из CO_2 . Однако некоторые из природных штаммов *Beggiatoa* нуждаются в органических субстратах.

Клетки *Thiothrix* не могут свободно двигаться. Трихомы пучками прикреплены своими основаниями к субстрату; каждая трихома от основания к верхушке постепенно сужается от 5 до 2 мкм. Для размножения служат гонидии, образующиеся в результате округления апикальных клеток; они проявляют способность скользить по твердым поверхностям. Обычно несколько гонидий одновременно оседают, и затем из них вырастают многоклеточные нити. Бактерии рода *Thiothrix* значительно больше распространены, чем *Beggiatoa*; они растут во всех водоемах, где происходит гниение органического материала с образованием сероводорода.

Подгруппа II. *Vitreoscilla*—бесцветная аэробная бактерия, образующая многоклеточные нити, способная перемещаться путем скольжения и размножающаяся путем разлома нитей (рис. 3.11). Выделить ее можно из коровьего помета. *Leucothrix* растет как эпифит на морских водорослях и по типу роста может рассматриваться как органотрофный аналог *Thiothrix*. Нити чаще всего растут пучками и прикреплены своими основаниями к твердым поверхностям.

С винтообразно закрученной цианобактерией *Spirulina* можно сопоставить сходную с ней по морфологии серобактерию *Thiospirillopsis floridana* и органотрофную бактерию *Saprospira grandis*. На рис. 3.12 изображены морфологически сходные представители трех метаболических типов (фототрофные цианобактерии, бесцветные бактерии, окисляющие сероводород, и бактерии, окисляющие органические вещества). На рисунке они расположены так, чтобы внешне сходные формы оказались рядом.

Подгруппа III. К миксобактериям относятся строго аэробные хемогетеротрофы, передвигающиеся путем скольжения. Это почвенные бактерии. В природе они привлекают к себе внимание благодаря образованию плодовых тел, которые, однако, очень малы (меньше 1 мм). Такие плодовые тела находят на разлагающемся растительном материале,

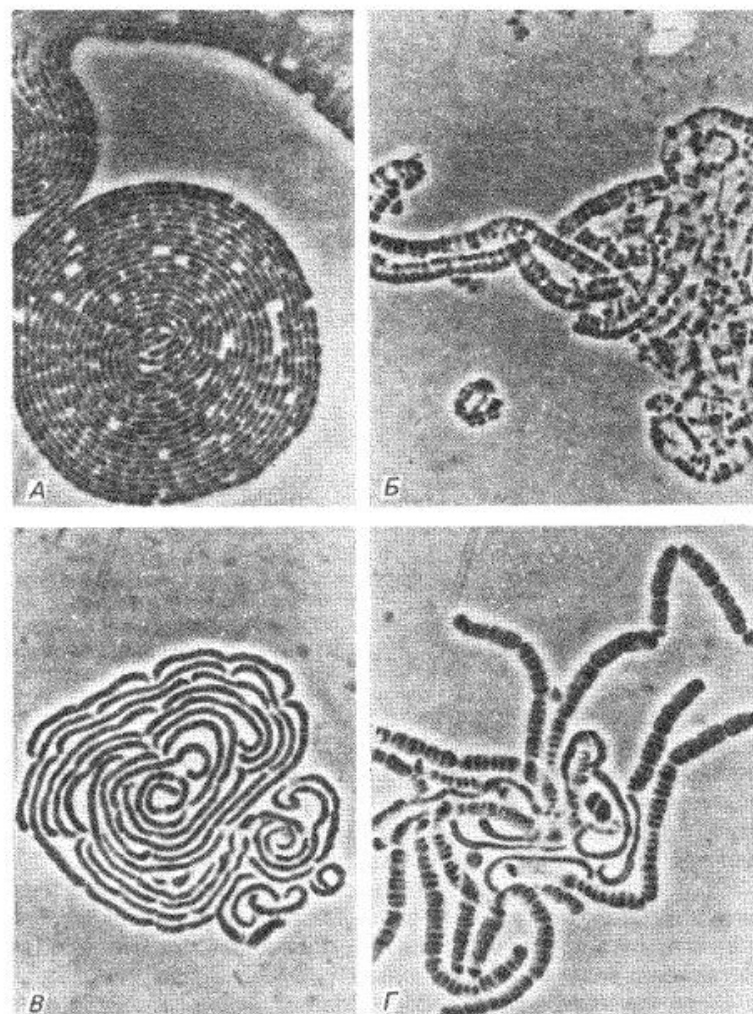


Рис. 3.11. Бактерии, образующие нити. А. Колония *Vitreoscilla* sp. Б. *Alysiella filiformis*. В. Колония *Simonsiella crassa* до начала «ползания». Г. Лежащие плашмя и на ребре нити *S. crassa*, некоторые из них «ползают». (Микрофотографии в светлом поле V. B. D. Skerman.)

гниющей древесине, коре деревьев и на комках помета растительных животных. Бактерии можно выделить из помета (мышей, зайцев), если комки его несколько недель выдержать на влажной земле.

На твердых средах миксобактерии образуют плоские разрастающиеся вширь колонии. Как только вегетативные клетки в нескольких местах в пределах колонии сползаются вместе, начинается образование пло-

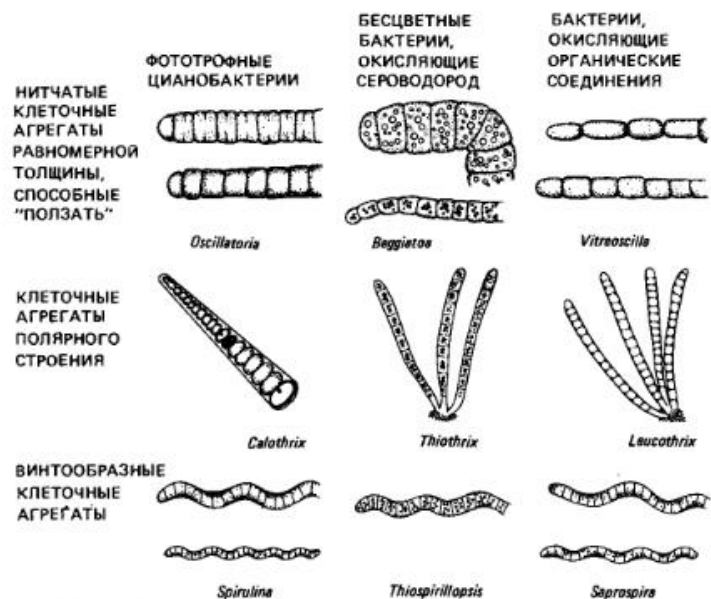


Рис. 3.12. Сравнение нескольких цианобактерий и сходных по морфологии нефототрофных бактерий.

довых тел, которые отличаются друг от друга по форме, величине и пигментации. По этим признакам можно определять различные роды и виды миксобактерий (рис. 3.13 и 3.14). По мере созревания клетки, находящиеся внутри плодовых тел, превращаются в покоящиеся клетки — миксоспоры. Миксоспоры могут иметь вид шариков (у *Mucosoccus*) или палочек (рис. 3.13) и могут быть заключены в цисты.

В зависимости от источников питания различают бактериолитические и целлюлозолитические виды. Большинство миксобактерий способно растворять другие бактерии с помощью экзоферментов. Целлюлозолитические виды содержит только род *Polyangium*.

К группе *Cytophaga* относятся роды *Cytophaga* и *Sporocytophaga*. Они известны тем, что способны в почве в аэробных условиях разлагать целлюлозу. Так же как и миксобактерии, они передвигаются путем скольжения, но не образуют плодовых тел. Некоторые виды являются факультативными анаэробами и сбраживают глюкозу с образованием органических кислот.

Веретенообразные вегетативные клетки *Sporocytophaga* могут превращаться в длительно сохраняющиеся круглые клетки, окруженные капсулой. Они похожи на миксоспоры *Mucosoccus* (рис. 3.15), но называют их микроцистами. Накопительные культуры *Cytophaga* и *Sporocytophaga* легко получить на целлюлозе (фильтровальной бумаге) (разд. 14.1).

Виды *Flexibacter* — водные бактерии. Они состоят из длинных,

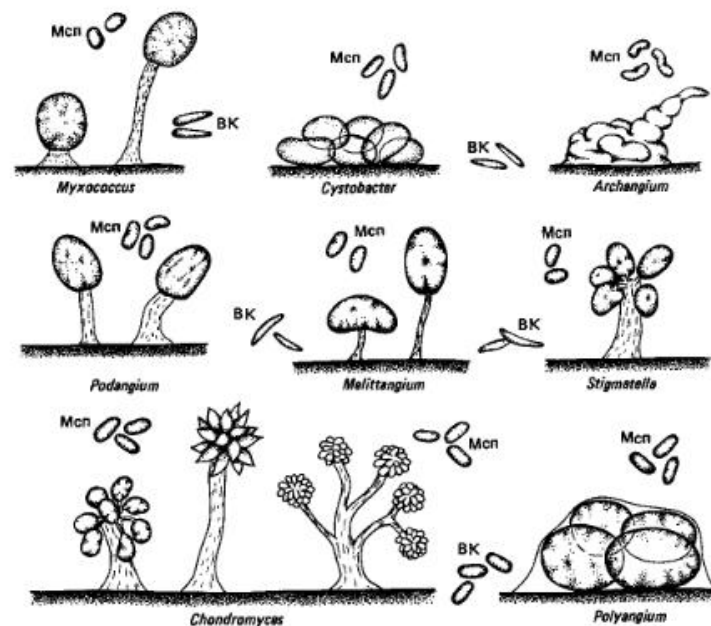


Рис. 3.13. Плодовые тела и формы микроспор и вегетативных клеток некоторых миксобактерий. Плодовые тела изображены схематично и в разном масштабе. У родов, представленных в двух верхних рядах, вегетативные клетки веретенообразные (палочки с заостренными концами), а у *Chondromyces* и *Polyangium* — палочковидные с тупыми концами. *Mcn* — миксоспоры; *BK* — вегетативные клетки. (Reichenbach H., *Biologie in unserer Zeit*, 4 [1974], 33.)

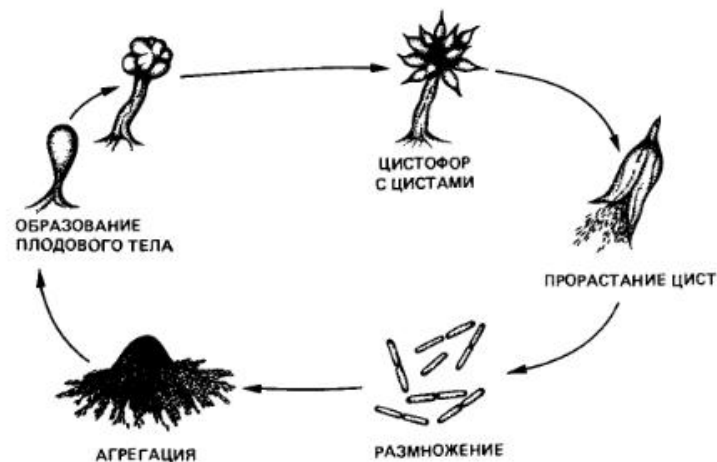


Рис. 3.14. Цикл развития с образованием плодового тела у *Chondromyces apiculatus*. После агрегации клеток начинается образование плодового тела, состоящего из слизистого стебелька и цист. Цисты служат органами распространения и при созревании освобождают миксоспоры, из которых образуются вегетативные клетки.

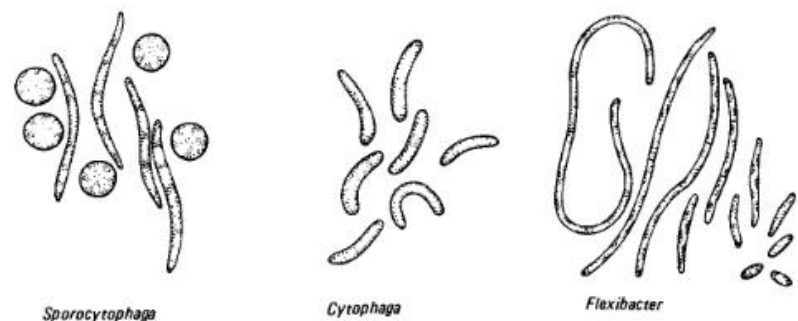


Рис. 3.15. Формы клеток у представителей родов *Sporocytophaga*, *Cytophaga* и *Flexibacter*. В молодых культурах *Flexibacter* образуются нити длиной 100 мкм из нескольких клеток, почти не разделенных поперечными стенками; эти нити оживленно движутся. При более длительной инкубации они распадаются на более короткие нити, а затем и на коккоидные клетки. (Reichenbach H. Biologie in unserer Zeit, 4 [1974], 33).

нерасчлененных, очень гибких клеток (рис. 3.15). При их культивировании образуются все более короткие нити, которые затем распадаются на коккоидные формы. Многие формы содержат каротиноиды и окрашены в желтый, розовый или оранжевый цвет. К роду *Flexibacter* с недавних пор относят и возбудителя болезни рыб *F. columnaris* (*Chondrococcus columnaris*).

3.17 Почкующиеся и стебельковые бактерии (группа 4)

В эту группу объединяют бактерии, заметно отличающиеся по форме от «обычных» бактерий; у них имеются выступы, гифоподобные выросты или стебельки из слизистых выделений (возможно и массивное выделение слизи) (рис. 3.16, 3.17).

Почкующиеся бактерии и простековые бактерии. Способ размножения клеток, типичный для дрожжей, называют почкованием. В отличие от бинарного деления (деления пополам) почкование представляет собой неравное деление клетки и основано на локальном росте. Дочерняя клетка (почка) обычно меньше материнской и достигает нормальной величины только после того, как становится самостоятельной. К почкующимся бактериям относится ряд водных и почвенных бактерий. *Hypomicrobium vulgare* – денитрифицирующая бактерия, и ее накопительную культуру можно получить, используя среду с метанолом и нитратом. Этот вид регулярно встречается в стоячих водах, даже в водяных банях в лаборатории; у него образуются почки на длинных гифах. Сходна с ним по внешнему виду пурпурная бактерия *Rhodomicrobium vannielii*, не содержащая серы. Выросты и стебельки бактерий называют простеками (греч. *prostheka* – придаток), и название

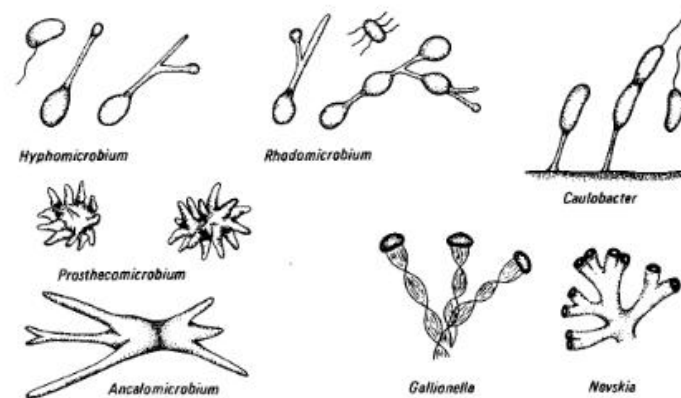


Рис. 3.16. Простековые и стебельковые бактерии.

«простековые бактерии» означает, что у них имеются выросты. Наиболее известные виды относятся к группе *Caulobacter* (*Caulobacter vibrioides*, *Asticcacaulis*); они тоже встречаются в плесневидных пленках на водяных банях, имеют характерную форму и проходят сложный цикл развития.

Палочки с полярными жгутиками прикрепляются полюсом, на котором находится жгутик, к твердым поверхностям, в том числе и к другим бактериям. Затем от этого полюса отрастает стебелек; клетка пре-

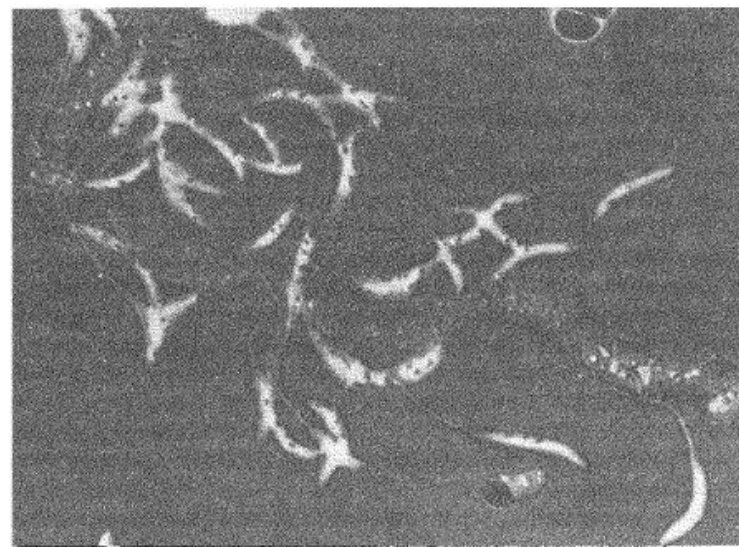


Рис. 3.17. *Caulobacter* на мертвых клетках *Bacillus megaterium*. (Электронная микрофотография после напыления металла; ~ 4000 ×; Houwink A. L.)

терпеваает обычное (бинарное) деление, после чего дочерняя клетка на свободном полюсе снова образует жгутик.

При тщательном обследовании водорослей, панцирей ракообразных и обитателей водной поверхности (нейстона) были найдены и другие бактерии странной формы, из которых мы можем здесь упомянуть *Prosthecomicrobium*, *Ancalomicrobium* и *Pedomicrobium*.

«Стебельковые» бактерии. Некоторые широко распространенные бактерии сидят на стебельках, состоящих из слизи. *Gallionella ferruginea* представляет собой бобовидную клетку. На вогнутой стороне она выделяет слизь в виде тонких фибрилл, которые, как видно под микроскопом, образуют спирально извитую ленту, инкрустированную гидроокисью железа. *Gallionella* – наиболее известная железобактерия. Она встречается в водоемах, содержащих железо (ручьях, дренажных трубах и т.п.), и, особенно весной, растет в массовом количестве. Бактерию *Nevskia ramosa* многократно выделяли из пленки на поверхности прудов, болотных канав и водяных бань. Характерное полярное выделение слизи имеет место, по-видимому, только при недостатке питания.

3.18 Obligatные внутриклеточные паразиты (группа 18)

Ранее (разд. 3.14) мы уже отмечали, что некоторые бактерии, как, например, *Bdellovibrio bacteriovorus*, для своего размножения нуждаются в целых клетках других бактерий. Вероятно, многие бактерии – эндосимбионты насекомых или инфузорий – неразрывно связаны со своими хозяевами. Причину такого обязательного внутриклеточного паразитизма, как правило, надо искать в упрощении обмена веществ. Среди бактерий к наиболее изученным облигатным внутриклеточным паразитам относятся риккетсии и хламидии. И те и другие – возбудители болезней человека и животных; по структуре своих клеточных стенок это грам-отрицательные организмы.

Риккетсии. Риккетсии получили свое название в честь американского исследователя Х. Т. Риккетса, впервые описавшего возбудителя болезни, известной как пятнистая лихорадка Скалистых гор. По наиболее изученному возбудителю (*Rickettsia prowazekii*) и вызываемой им болезни всю эту группу называют также группой сыпного тифа. Природными носителями риккетсий являются членистоногие (клещи, пухоеды, блохи, вши), в которых эти микробы обитают, по-видимому, как безвредные паразиты или даже симбионты. Попав в организм других хозяев – животных или человека (при укусе насекомого, при расчесывании кожи или с вдыхаемым воздухом), риккетсии могут вызывать тяжелые патологические явления.

Хотя риккетсии по своим размерам сравнимы с некоторыми вирусами, они четко отличаются от них. Клетки риккетсий содержат как ДНК, так и РНК (в отношении 1:3,5); они окружены клеточной стенкой, содержащей мурамовую кислоту и чувствительной к лизоциму. На элек-

тронных микрофотографиях ультратонких срезов можно видеть область ядра и клеточную стенку.

Большинство риккетсий никогда не удавалось выращивать вне живой клетки, но их можно размножать в инкубируемых яйцах и в тканях животных; из желточного мешка куриного яйца можно получить 10^9 клеток. В изолированных клетках риккетсий можно выявить некоторые ферменты промежуточного обмена. В ходе культивирования интенсивность метаболизма таких клеток ослабевает, но добавление АТР, органических кислот и аминокислот вновь стимулирует их дыхание. Риккетсии, таким образом, обладают собственным обменом веществ; однако они, вероятно вследствие изменения проницаемости клеточной поверхности, не способны регулировать поглощение и выведение метаболитов.

Самые известные возбудители болезней среди риккетсий принадлежат к группе сыпного тифа. *Rickettsia prowazekii* – возбудитель эпидемического сыпного тифа. Резервуаром является сам человек. Возбудителя переносят вши (платяные и головные). Зараженные вши сами через несколько дней погибают. Инфекция передается через экскременты вшей. *R. typhi* – возбудитель эндемического, или крысиного, тифа; по клинической картине эта болезнь похожа на сыпной тиф, но менее тяжелая. Ее возбудителя распространяют крысы, но у них он не вызывает никаких симптомов. От крысы крысе и иногда человеку его передают крысиные блохи.

Перечисленные риккетсии относительно чувствительны к высокой температуре и высыханию, однако возбудитель лихорадки Q – *Coxiella burnetii* – способен выживать и вне тела своего хозяина. Клещи передают его овцам, козам и коровам. Человек заражается не только при укусе клеща, но также через шерстяную и меховую пыль, инфицированную почву и молоко. Обычная пастеризация молока (60°C, 30 мин) кокциеллу не убивает.

Хламидии. Хламидии известны как возбудители болезней человека. *Chlamydia trachomatis* – возбудитель трахомы («египетской глазной болезни»), начинающейся с конъюнктивита и приводящей к слепоте, и она же вызывает венерическую болезнь lymphogranuloma venereum. В обоих случаях заражение происходит при контакте. *Chlamydia psittaci* – возбудитель орнитозов, из которых наиболее известен пситтакоз, проявляющийся в воспалении легких и лихорадке; главными хозяевами этих хламидий служат птицы.

То, что хламидии относятся не к вирусам, как думали раньше, а к бактериям, удалось установить по биохимическим признакам. Они содержат РНК и ДНК в характерном для бактерий соотношении и вырабатывают вещества, которые не могут синтезироваться эукариотическими клетками хозяев, например мурамовую кислоту, диаминопимелиновую кислоту, D-аланин и фолиевую кислоту. Эти их свойства согласуются также с фактом их чувствительности к пенициллину и сульфамидам. Геном хламидий очень мал ($0,66 \cdot 10^9$ Да); таким образом, он

содержит в четыре раза меньше генетической информации, чем геном *Escherichia coli*.

Хламидии развиваются только в живых клетках. Их можно выращивать на куриных эмбрионах или в тканевых культурах. Зависимость хламидий от метаболизма клетки-хозяина объясняется, по-видимому, отсутствием у них системы регенерации АТФ. Они не способны ни фосфорилировать глюкозу, ни расщеплять ее. С другой стороны, хламидии необычайно проницаемы для АТФ и кофермента А. Поэтому их можно рассматривать как «энергетических паразитов».

Облигатный внутриклеточный паразитизм, очевидно, является результатом регрессивной эволюции. Приспособленность к существованию внутри клетки-хозяина сопряжена с утратой способности к ряду синтетических процессов.

3.19 Микоплазмы (группа 19)

Представители группы микоплазм (класс Mollicutes) — самые мелкие прокариоты, способные самостоятельно размножаться. Они не имеют клеточных стенок. Так как протопласт снаружи ограничен только плазматической мембраной, клетки осмотически чрезвычайно лабильны. У большинства микоплазм (*Mycoplasma* и *Ureaplasma*) геном в четыре раза меньше, чем у *Escherichia coli* (всего лишь $0,5 \cdot 10^9$ Да); таким образом, среди прокариот, способных к самостоятельной репродукции, они обладают самым малым геномом. Порядок Mycoplasmatales выделили в отдельный класс бактерий, получивший наименование Mollicutes («мягкокожные»); этим подчеркивается филогенетическое отличие микоплазм от всех остальных бактерий.

Первый из описанных представителей группы микоплазм — возбудитель плевропневмонии крупного рогатого скота. На агаризованных питательных средах с сывороткой он образует небольшие колонии, похожие на яичницу-глазунью. Формы, растущие подобным образом, называли PPLO (от англ. pleuropneumonia-like organisms). Микоплазмы оказались также возбудителями многих других болезней; они инфицируют культуры тканей, но среди них встречаются и безвредные паразиты.

Колонии состоят из отдельных клеток и агрегатов разной величины, которые можно описать как кокковидные клетки, нити, диски и розетки. Размножение происходит путем обычного деления клеток, распада нитей и колец на кокковидные клетки, а также процесса, сходного с почкованием. В жидких средах, кроме того, появляются клетки очень неправильной формы, часто даже разветвленные (рис. 3.18), которые, подобно вирусам, проходят через мембранные фильтры.

Распространение и виды. Представители группы микоплазм (роды *Mycoplasma*, *Acholeplasma* и *Spiroplasma*) — паразитические бактерии. Они, однако, не убивают своих хозяев, а вызывают обычно хронические инфекции, и в этом отношении их можно считать весьма хорошо приспособившимися паразитами.

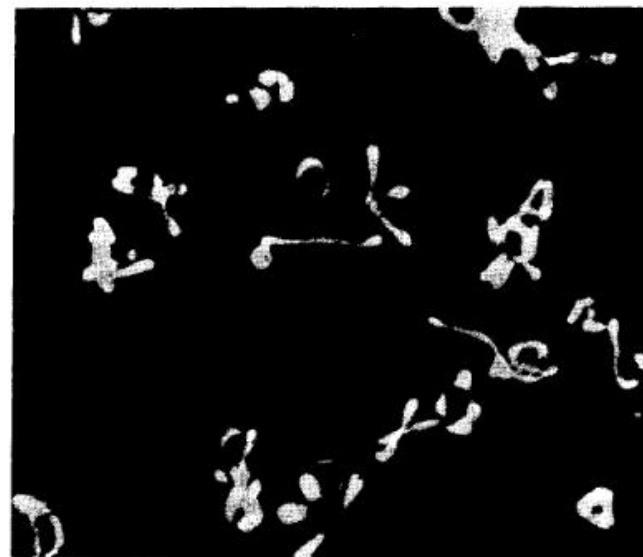


Рис. 3.18. Микоплазмы. Растущие в питательном растворе клетки возбудителя бронхопневмонии крыс; электронная микрофотография; $11\,200 \times$. (Klieneberger-Nobel E., Cuchow F. W., J. Gen. Microbiol., 12 [1955] 95.)

У животных они встречаются, по-видимому, как относительно безвредные паразиты на слизистых оболочках дыхательных путей и половых органов (у млекопитающих и птиц). Эти организмы являются мембранными паразитами, т. е. прочно прикрепляются к эпителиальным клеткам слизистых. Они не выделяют токсинов, но благодаря их тесному контакту с лишенными стенок клетками хозяина даже такие слаботоксичные продукты обмена, как ионы аммония и перекись водорода, оказывают неблагоприятное действие на мембрану пораженных клеток.

Различают два рода микоплазм, паразитирующих на животных. Представители рода *Mycoplasma* могут расти в чистой культуре лишь на средах с холестерином или комплексными добавками, содержащими стероиды (например, с сывороткой крови). Виды, не нуждающиеся в холестероле, выделены в род *Acholeplasma*. Заражение микоплазмами у одних животных не вызывает никаких болезненных симптомов, у других же развивается воспаление дыхательных путей, легких или вымени. Специфичность в отношении хозяина отражена в видовых названиях, таких как *Mycoplasma canis*, *M. gallisepticum*, *M. hominis* и др.

У растений микоплазмы являются возбудителями болезней этиолирования. Они преимущественно локализируются во флоэме и в связи с их внешним сходством со спираллами объединены в род *Spiroplasma*. *Spiroplasma citri* — возбудитель болезни этиолирования цитрусовых. Сходные формы были найдены у других растений (кукурузы, опунции,

бермудской травы, риса). *Spiroplasma* была обнаружена также у пчел и кузнечиков; можно думать, что насекомые служат не только переносчиками, но и хозяевами видов *Spiroplasma*.

Биохимические особенности. Микоплазмы отличаются от большинства других бактерий не только отсутствием клеточной стенки, но и рядом биохимических признаков. Они растут только в изотонических или гипертонических средах (с добавлением сорбитола или сахарозы) и нуждаются в пуринах, пиримидинах и липидах, в том числе стероидах. Отсутствие у микоплазм хинонов и цитохромов дает основание заключить, что у них весьма ограниченная цепь дыхания.

Отношение к L-формам. Из одной клеточной популяции *Streptobacillus moniliformis* в 1934 г. был выделен штамм, размножавшийся в виде протопластов неправильной формы. Эти клетки были названы L-формами в честь Института Листера. Клетки, растущие как голые протопласты, удается выделить и из культур *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus* и других бактерий, если выращивать их на агаре с сывороткой в присутствии пенициллина (100 мкг/мл). При этом вырастают колонии в форме яичницы-глазуньи, чрезвычайно сходные с колониями микоплазм. Были выделены два типа L-форм: лабильные L-формы, которые в отсутствие пенициллина вновь превращаются в нормальные клетки, и стабильные L-формы, которые и без пенициллина не образуют клеточных стенок. Вначале предполагали, что виды *Mycoplasma* возникли из обычных бактерий в результате мутации, приведшей к образованию стабильных L-форм; однако данные о величине генома и содержании GC в ДНК микоплазм противоречат гипотезе об их происхождении от эубактерий и указывают на то, что это отдельный класс бактерий.

3.20 Анаэробные аноксигенные фототрофные бактерии (группа 1)

Анаэробные фототрофные бактерии (Rhodospirillales) обладают фотосинтетическими пигментами и нуждаются в свете как источнике энергии. Исходя из существенных физиологических особенностей, различают четыре семейства: пурпурные серобактерии (Chromatiaceae), пурпурные несерные бактерии (Rhodospirillaceae), зеленые серобактерии (Chlorobiaceae) и группу *Chloroflexus* (Chloroflexaceae). Это естественная филогенетическая группа¹. Она будет рассмотрена в связи с фотосинтезом в гл. 12.

¹ Сейчас выделяют семейство Ectothiorhodospiraceae, куда включены бактерии рода *Ectothiorhodospira*, ранее относившиеся к семейству Chromatiaceae.—Прим. ред.

3.21 Аэробные оксигенные фототрофные бактерии (цианобактерии)

Основываясь на способе размножения—бинарном делении, цианобактерии уже давно объединили вместе с бактериями под названием Schizophyta. Из-за общих физиологических особенностей их, однако, относили к растениям и называли сине-зелеными водорослями. Поэтому для них были действительны правила ботанической номенклатуры. Только с тех пор, как научились ясно отличать прокариот от эукариот, эту группу организмов причисляют к бактериям.

С водорослями и высшими растениями цианобактерии имеют то общее, что все они осуществляют фотосинтез с выделением кислорода и содержат хлорофилл *a*, а также ряд других общих с растениями пигментов. Поэтому их и отнесли к водорослям под названием сине-зеленых водорослей. Но уже Ф. Кон, учитывая способ их деления, назвал их Schizophyceae и объединил со Schizomycetes (бактериями), сведя в группу высшего порядка Schizophyta. Действительно, если судить по строению клетки, наличию муреиновой клеточной стенки, 70 S-рибосомам и другим определяющим признакам, приходится отнести их к грам-отрицательным прокариотам. Цианобактерии—самая обширная, наиболее богатая формами и самая распространенная группа фотосинтезирующих прокариот. Благодаря способности расти в экстремальных условиях и фиксировать молекулярный азот они приобрели большое значение в сложном «хозяйстве» природы.

Некоторые цианобактерии подвижны. Однако передвижение их никогда не осуществляется с помощью жгутиков, а только путем скольжения по твердой поверхности.

Морфология и систематика. Цианобактерии включают одноклеточные и многоклеточные формы, и по морфологическим признакам их можно подразделить на пять групп (рис. 3.19).

Группа 1: **хроококковые цианобактерии.** Это одноклеточные палочки и кокки. Клетки существуют по отдельности или в виде агрегатов (колоний), в которых они объединены капсулами или слизью. Размножение клеток происходит исключительно бинарным делением или почкованием. К этой группе относят *Synechococcus* (прежнее название—*Anacystis nidulans*), *Gloeotheca* и *Gloeobacter violaceus*.

Группа 2: **плеврокапсовые цианобактерии.** Это тоже одноклеточные формы, но только такие, которые могут размножаться и множественным делением. При этом внутри делящейся клетки появляется много маленьких клеток, так называемых беопитов. В качестве примеров можно упомянуть роды *Pleurocapsa*, *Dermocapsa* и *Myxosarcina*.

Последующие три группы характеризуются нитчатными объединениями клеток; эти бактерии образуют трихомы, т.е. цепочки из клеток. Рост осуществляется интеркалярно—путем деления клеток внутри трихомы. Трихомы способны двигаться путем скольжения. В ряде случаев при размножении происходит «разлом» трихомы и образование гормо-

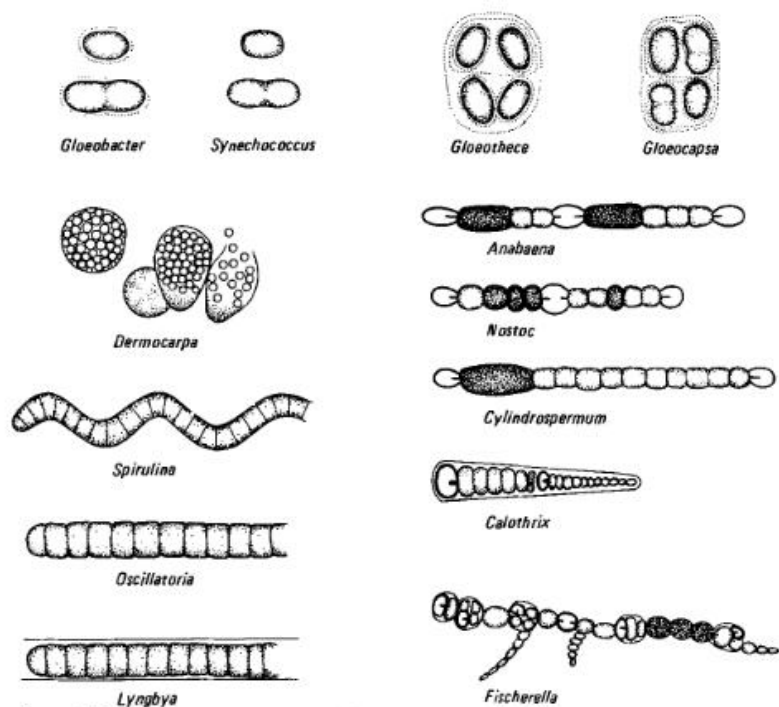


Рис. 3.19. Схематические изображения некоторых цианобактерий. Клетки с толстыми стенками и полярными гранулами – гетероцисты; темные клетки – акинеты; тонкие линии вне трихом – контуры чехлов. (По Rippka R. et al., J. Gen. Microbiol., 111 [1979], 1; перерисовано заново.)

гониев. По этой причине нитчатые формы иногда называют гормоногиевыми сине-зелеными водорослями. В настоящее время различают три группы цианобактерий, образующих трихомы.

Группа 3: **нитчатые цианобактерии без гетероцист**. Трихомы состоят только из вегетативных клеток. Типичными для группы являются *Oscillatoria* (известная «осциллирующая водоросль»), *Spirulina*, *Lyngbya*, *Phormidium* и *Plectonema*.

Группа 4: **нитчатые цианобактерии с гетероцистами**. В трихомах, растущих в отсутствие связанного азота, происходит дифференциация клеток с образованием гетероцист. У некоторых форм встречаются также акинеты. К этой группе относятся роды *Anabaena*, *Nostoc* и *Calothrix*.

Группа 5: это тоже **нитчатые цианобактерии с гетероцистами**. Представители этой группы отличаются от предыдущего типа делением клеток более чем в одной плоскости. Наиболее известен род *Fischerella*.

Экология. Цианобактерии распространены в озерах и других водоемах, в почве и на рисовых полях. Невооруженным глазом их можно увидеть в виде темно-синей или черной пленки на скалах, в зоне приобя

по берегам пресноводных озер и на морской литорали. Черные («чернильные») полосы на известняковых скалах, характерные для мест, где стекает вода, объяснены своим происхождением хроококковым цианобактериям. В эвтрофных озерах часто бывают вспышки массового размножения сине-зеленых (*Anabaena*) или красных (*Oscillatoria rubescens*) цианобактерий, так называемое цветение воды (разд. 17.1.2). Благодаря своей способности фиксировать молекулярный азот многие формы цианобактерий первыми заселяют места, бедные питательными веществами, например морской песок или скалы в пустыне, где в узких щелях они находят защиту и влагу. Они не боятся и иных экстремальных условий. Некоторые одноклеточные цианобактерии (*Synechococcus lividus*) настолько устойчивы к действию кислот и термофильны, что способны расти в кислых горячих источниках (рН 4,0, 70°C). Другие виды растут как симбионты: *Nostoc* в составе лишайника *Peltigera*, а также в корнях *Cycas* и *Gunnera*; *Anabaena azollae* – в полостях листьев тропического водного папоротника *Azolla*.

Клетка, ее строение и субклеточные компоненты. В отношении тонкой структуры клеток цианобактерии во многом сходны с грам-отрицательными бактериями (рис. 2.4). Протопласт окружен клеточной стенкой, в которой поверх пептидогликанового слоя имеются еще «наружная мембрана» и липополисахаридный слой. У многих форм имеет место выделение экзополисахаридов, которые либо переходят в раствор в виде слизи, либо образуют капсулы вокруг клеток и чехлы вокруг трихом.

Фотосинтетический аппарат представлен тилакоидами, которые либо расположены параллельно плазматической мембране, либо сильно извиты и помещаются в периферических участках цитоплазмы (рис. 3.20). Тилакоидная мембрана содержит хлорофилл *a*, β -каротин и оксикаротиноиды, такие как миксоксантофилл, эхиненон и зеаксантин, а также компоненты цепи фотосинтетического переноса электронов. Отличительной особенностью цианобактерий (и красных водорослей) является наличие фикобилисом. Это дисковидные образования, прилегающие снаружи к тилакоидам. Они состоят из фикобилипротеинов, чаще всего – фикоцианина (75%), аллофикоцианина (12%) и фикоэритрина, а также бесцветных полипептидов, которые все вместе составляют 12%. Фикобилипротеины в свою очередь состоят из белка и простетических групп – фикоцианобилина или фикоэритробилина. По своей функции это светособирающие пигменты цианобактерий; поглощенная ими энергия передается главным образом фотосистеме II. Хлорофилл *a* снабжает энергией только фотосистему I. Фикобилисомы могут составлять до половины всего белка клетки.

Фикобилины во многом сходны с желчными пигментами. Их синтез начинается с образования порфирина; при размыкании кольца углерод из метинового мостика выделяется в виде CO. Синтез фикобилинов – один из немногих известных процессов, при которых образуется окись углерода.

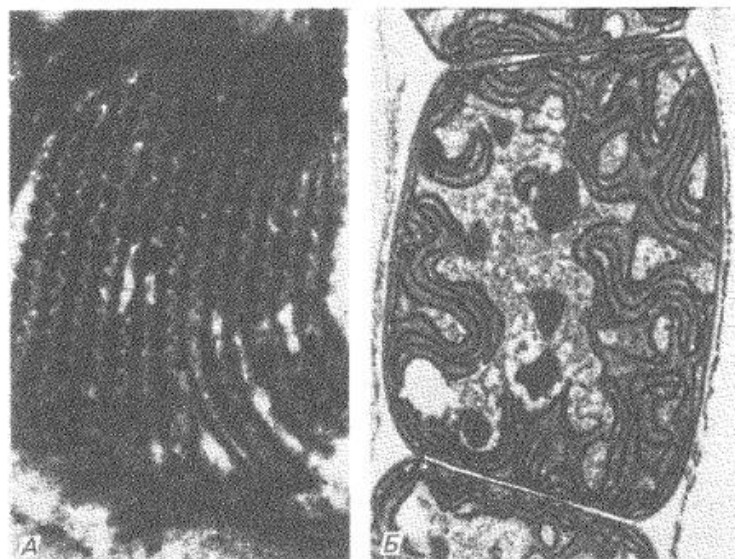


Рис. 3.20. Системы фотосинтетических мембран в клетках цианобактерий. А. Ряды фикобилизом на тилакоидных мембранах *Microcoleus vaginatus*. (Wildman R. V., Bowen C. S., J. Bacteriol., 117 [1974], 866.) Б. У *Nostoc muscorum* двойные ламеллы (тилакоидные мембраны) располагаются волнообразно поодиночке или группами. Видна наружная граница многослойной клеточной стенки. (Menke W., Z. Naturforsch., 16b [1961], 543.)

Только у одной цианобактерии — *Gloeobacter violaceus* — нет тилакоидов и фикобилизом; хлорофилл *a* находится в плазматической мембране, а фикобилипротеины располагаются непосредственно у внутренней поверхности мембраны сплошным слоем.

У многих цианобактерий соотношение синего и красного пигментов зависит от спектрального состава света. При зеленом и синем свете образуется преимущественно фикоэритрин, при красном — фикоцианин. Такая комплементарная «хроматическая адаптация» помогает эффективно поглощать свет в различных местообитаниях (под пологом листвы или в голубом свете в глубине водоема).

Клеточные включения. По-видимому, все цианобактерии способны к накоплению полисахарида (в виде гликогеновых гранул) и гранул полифосфата. Поли- β -гидроксимасляную кислоту накапливают лишь немногие виды.

Запасным веществом, встречающимся только у цианобактерий, являются **гранулы цианофицина**. Они связывают вещества, окрашивающие белки, и это выдает их полипептидную природу. У полипептида, построенного из остатков аспарагиновой кислоты, все свободные карбоксильные группы последней связаны с аргинином; таким образом, молекула цианофицина состоит из аспартата и аргинина в соотношении

1 : 1. Этот полимер, очевидно, служит запасным источником азота; при недостатке азота количество полимера убывает, а при добавлении в среду источника азота оно вновь возрастает. Цианофицин накапливается главным образом в гетероцистах. Он может также служить энергетическим резервом (хотя и незначительным), так как аргинин и в анаэробных условиях расщепляется с образованием орнитина и карбамоилфосфата, что в конечном счете приводит к регенерации АТФ.

Карбоксисомы (см. в конце разд. 2.2.6) у цианобактерий очень широко распространены. Водные формы цианобактерий, обитающие в стратифицированных озерах, а также вызывающие цветение воды, почти все имеют **газовые вакуоли**.

Специализированные клетки. У цианобактерий имеются сильно дифференцированные клетки, которым нет аналогов ни в одной другой группе бактерий. Рассмотрим отдельные типы таких клеток.

Гетероцисты уже при исследовании в световом микроскопе обратили на себя внимание своими толстыми клеточными стенками, слабой пигментацией и сильно преломляющими свет полярными гранулами. Электронная микроскопия дала возможность изучить их тонкую структуру (рис. 3.21). Что касается полярных гранул, то они оказались цианофициновыми гранулами; плотные же слои, расположенные поверх грам-отрицательной клеточной стенки, состоят из полисахаридов, в которых глюкоза, галактоза, манноза и ксилоза соединены между собой β -1,3-гликозидными связями. Гетероцисты устойчивы к действию лизоцима. С соседними клетками трихомы гетероцисты связаны порами, своего рода плазмодесмами. По своей функции гетероцисты — это места **фиксация азота** (N_2) в аэробных условиях. Они образуются у нитчатых цианобактерий при недостатке связанного азота (NH_4^+ , NO_3^-). Одновременно с морфологической дифференциацией происходят биохимические изменения. В гетероцистах синтезируется нитрогеназа, а фикобилипротеины

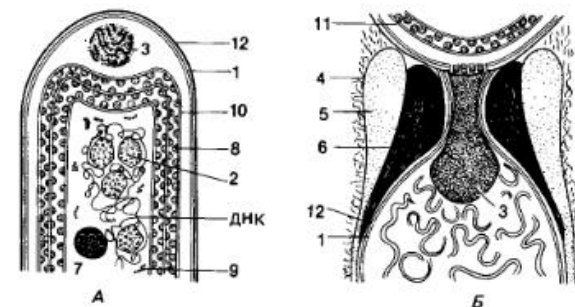


Рис. 3.21. Схематическое изображение клеток цианобактерий в продольном разрезе. А. Вегетативная клетка. Б. гетероцист. 1 — плазматическая мембрана; 2 — карбоксисома; 3 — гранулы цианофицина; 4 — волокнистый слой; 5 — однородный слой; 6 — ламеллярный слой; 7 — полифосфат; 8 — фикобилизомы; 9 — рибосомы; 10 — тилакоид; 11 — вегетативная клетка; 12 — клеточная стенка. (Stanier R. Y., Cohen-Bazire G., Ann. Rev. Microbiol., 31 [1977], 225; перерисовано заново.)

распадаются, тогда как хлорофилл *a* сохраняется. Таким образом, зрелые гетероцисты не содержат ни фикобилипротеинов, ни функционирующей фотосистемы II и поэтому не могут выделять O₂. Они имеют только фотосистему I, дающую им возможность осуществлять так называемое циклическое фотофосфорилирование и регенерацию АТФ. В гетероцистах, таким образом, создаются все условия, необходимые для функционирования нитрогеназы, которая чувствительна к кислороду. Соединениями углерода их снабжают вегетативные клетки, а связанный азот гетероцисты отдают преимущественно в форме глутамина.

Акинеты представляют собой покоящиеся клетки. Они выделяются своими размерами, сильной пигментацией и толстой клеточной стенкой. Подобно гетероцистам, это морфологически дифференцированные клетки; они могут быть расположены в середине трихомы (у *Anabaena*) или на ее конце (у *Cylindrospermum*), внутри или на поверхности (рис. 3.19).

Гормогонии – короткие отрезки, получающиеся при разрыве длинных трихом. Они служат для размножения. При образовании гормогония осцилляториям приходится жертвовать по меньшей мере одной клеткой трихомы, так как клетки связаны общим пептидогликановым слоем, который не может быть разорван на границе клеток. В этом случае говорят о трансцеллюлярном разрыве.

Беоциты («мелкие клетки») – это репродуктивные клетки плеврокапсовых цианобактерий. Они образуются в результате множественного бинарного деления материнской клетки – очень крупной клетки с толстой волокнистой экзополисахаридной оболочкой. Примером может служить *Dermocarpa*, у которой быстро, одно за другим, происходят бинарные деления и из одной материнской клетки получается от 4 до 1000 беоцитов.

Скользание движение. Многие цианобактерии подвижны. Таковы, например, формы, образующие трихомы, все гормогонии и многие беоциты. Они могут передвигаться только путем скольжения, а для этого необходим твердый субстрат. Движение сопровождается вращением трихомы вокруг продольной оси; при этом кажется, что нити начинают колебаться, осциллировать (отсюда название *Oscillatoria*). Например, у *Oscillatoria princeps* точка на поверхности трихомы (поставленная тушью) в процессе продвижения описывает винтовую линию крутизной в 60°. Исследование тонкой структуры клеточной стенки показало, что в ней имеются фибриллы, проходящие под таким же углом крутизны. Это позволяет предполагать, что движение основано на торсионных волнах, создаваемых фибриллами. Направление движения может меняться на обратное. Многие цианобактерии способны к фототаксису и концентрируются в области с подходящей для них освещенностью.

Фиксация азота. Связывать N₂ способны все цианобактерии, образующие гетероцисты. Гетероцисты – это клетки, морфологически и физиологически специализированные для фиксации азота (см. выше). Неожиданным было открытие, что генетическая информация (гены *nif*), необходимая для образования нитрогеназы, имеется даже в клетках

плеврокапсовых цианобактерий, хотя среди них нет нитчатых форм, образующих гетероцисты (группа *Oscillatoria*). В обычных условиях роста на свету фиксации N₂ у них, правда, не происходит, так как фермент нитрогеназа очень чувствителен к кислороду. Однако с помощью особого приема удалось все-таки вызвать синтез нитрогеназы и обнаружить этот фермент. Если клетки инкубировать в отсутствие связанного азота в анаэробных условиях на свету и, добавив в среду дихлорфенилметилмочевину, подавить функцию фотосистемы II (так что выделение O₂ прекратится), то будет синтезироваться нитрогеназа. Таким способом удалось доказать, что более половины изученных штаммов способны к образованию нитрогеназы.

Среди одноклеточных хроококковых цианобактерий некоторые штаммы также способны связывать N₂. Каким образом у этих бактерий нитрогеназа защищена от кислорода, выделяемого при фотосинтезе, пока неизвестно.

Анаэробный метаболизм. Многие цианобактерии живут в слоях воды, содержащих в значительных концентрациях (примерно 5 мМ/л) сероводород. Исследования, проведенные на *Oscillatoria limnetica*, показали, что фотосистема II в присутствии сероводорода выключается, и начинает протекать иной, бескислородный (аноксигенный) фотосинтез по схеме



известной для анаэробных пурпурных серобактерий. Но способность многих цианобактерий выживать и в анаэробных условиях, вероятно, имеет значение лишь в немногих местообитаниях.

Облигатная фотоавтотрофия. По-видимому, многие цианобактерии – облигатные фотоавтотрофы; они могут расти только на свету. Лишь некоторые штаммы могут существовать и как хемоорганотрофы, окисляя сахара в темноте. В таких условиях скорость их роста всегда намного меньше, чем в фотоавтотрофных условиях.

Прохлорон (*Prochloron*). Недавно был найден новый фотосинтезирующий организм, соединяющий в себе ряд признаков прокариот и зеленых водорослей. С одной стороны, у него типичная прокариотическая клетка (грам-отрицательная клеточная стенка с пептидогликаном, нет органелл и истинного ядра, размеры генома 3,6 · 10⁹ Да); с другой стороны, наряду с хлорофиллом *a* он имеет и хлорофилл *b*, свойственный только зеленым водорослям и высшим растениям. От цианобактерий он отличается также отсутствием фикобилипротеинов, цианофидина и поли-β-гидроксимасляной кислоты. Эта переходная форма получила название *Prochloron*, и ее относят к самостоятельной группе протохлорофитов. *Prochloron* растет как эктосимбионт на различных асцидиях¹.

¹ Недавно появились сведения о выделении свободноживущей фототрофной бактерии, содержащей хлорофиллы *a* и *b*. – Прим. ред.

4. Вирусы: распространение и структура

Название «вирус» (лат. *virus* – яд) применяли сначала для обозначения различных малоизученных болезнетворных агентов. Позднее оно закрепилось за группой возбудителей, открытых в 1892 г. Ивановским, которые оказались способными проходить через бактериальные фильтры. Их стали называть «фильтрующимися вирусами» или просто «вирусами». Вирусы отличаются от микроорганизмов следующими особенностями: 1) они содержат нуклеиновую кислоту только одного типа – или ДНК, или РНК; 2) для их репродукции необходима только нуклеиновая кислота; 3) они не способны размножаться вне живой клетки. Вирусы, таким образом, не являются самостоятельными организмами, а используют для своего размножения живые клетки: их репродукция происходит в клетке-хозяине. Клеточные механизмы нужны как для репликации нуклеиновой кислоты, так и для синтеза белковой оболочки вируса. Развитие вируса приводит к гибели клетки-хозяина. Вне клетки вирус существует в виде вирусной частицы (вириона), которая состоит из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки – капсида. Поэтому вирусную частицу называют также нуклеокапсидом.

Вирусы распознаются по последствиям своего развития в клетках хозяина. Они разрушают целые комплексы клеток и вызывают поражения тканей, что ведет к появлению некротических пятен или зон лизиса (рис. 4.1). Обычные хозяева вирусов – это растения, животные и микроорганизмы.

Вирусы растений (фитопатогенные вирусы). Эти вирусы попадают внутрь растительных клеток через повреждения, а не в результате активного внедрения. Количественное определение фитопатогенных вирусов основано на учете некрозов, возникающих в тех местах, где искусственно были созданы первичные повреждения. В естественных условиях распространение фитопатогенных вирусов происходит путем прямого контакта или через переносчиков. Нередко вирусы попадают в лист через повреждения, возникшие в результате трения листьев друг о друга. Передаче вирусов могут способствовать и растения-паразиты. Например, повилика (*Cuscuta*), проникая в растения своими гаусториями, создает прямую связь между растениями через систему своих проводящих пучков, по которой вирусы могут распространяться.

Переносчиками многих вирусов служат насекомые. Иногда вирусы размножаются в пищеварительном тракте насекомого (персистентные

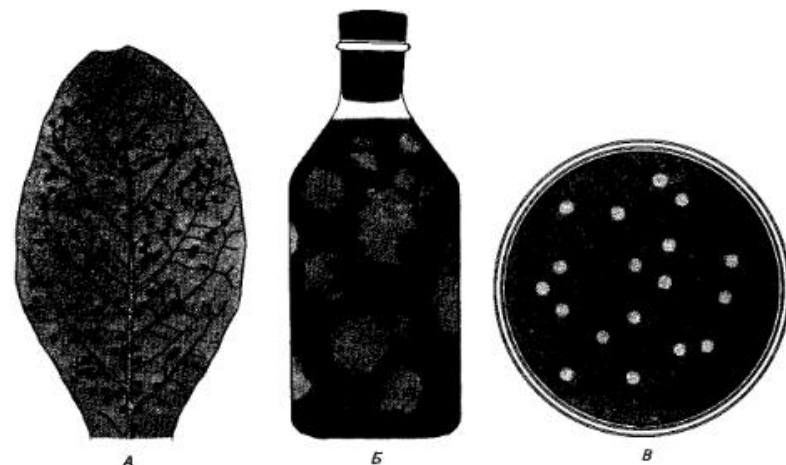


Рис. 4.1. Выявление вирусов по местным некрозам, зонам лизиса или стерильным пятнам. А. Местные некрозы, вызванные вирусом табачной мозаики на листе табака. Б. Зоны лизиса, возникшие в культуре ткани под действием вируса полиомиелита. В. Стерильные пятна, или «бляшки», на бактериальном газоне — результат заражения бактериофагом.

вирусы); в таких случаях заражение нового растения возможно лишь после некоторого инкубационного периода в насекомом. Неперсистентные вирусы передаются прямо при механическом повреждении растения ротовыми частями насекомого. Вирусы вызывают у растений множество болезней. Большое хозяйственное значение имеют вирусы, поражающие картофель. Лучшее всего изучен вирус табачной мозаики. Генетическим материалом фитопатогенных вирусов чаще всего служит РНК.

Вирусы, патогенные для животных и человека. У людей и животных вирусы вызывают такие болезни, как оспа, ветрянка, корь, бешенство, полиомиелит (детский паралич), гриппозные инфекции, насморк, ящур и т. п. Так же как и вирусы растений, они передаются либо при контакте, либо через насекомых и попадают в клетки, по-видимому, в результате фагоцитоза или пиноцитоза. В лабораторных исследованиях для размножения вирусов приходится использовать подопытных животных или куриных эмбрионов. Некоторые вирусы животных удается выращивать и количественно определять на тканевых культурах. Генетическим материалом этих вирусов может быть либо ДНК, либо РНК. В то время как ДНК почти всегда представлена двойной спиралью, вирусная РНК состоит из одной полинуклеотидной цепи.

Вирусы бактерий. Вирусы, поражающие бактерии, называются *бактериофагами*. Вряд ли существуют бактерии, для которых при достаточно усердных поисках нельзя было бы найти соответствующего фага. Бактериофаги выявляются по образованию «стерильных пятен» («бляшек»)

в сплошном бактериальном газоне. В бактериальной взвеси они размножаются так быстро, что за короткое время способны лизировать все клетки. Нуклеиновая кислота фага – это либо двухцепочечная или одноцепочечная ДНК, либо одноцепочечная РНК. В качестве модельных объектов служат бактериофаги *Escherichia coli*. Исследование фагов и различных циклов их развития существенно помогло выяснению механизмов передачи генетического материала от клетки к клетке.

4.1 Вирусы

Строение вирусов. Вирусная частица, называемая также вирионом, состоит из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), окруженной белковой оболочкой. Эту оболочку называют капсидом. Такая единица (капсид + нуклеиновая кислота = нуклеокапсид) может быть «голой», а в других случаях окружена оболочкой (рис. 4.2 и 4.3). Голыми нуклеокапсидами являются, например, частицы вируса табачной мозаики, вируса, вызывающего бородавки, и аденовируса. Дополнительная оболочка окружает вирусы гриппа и герпеса.

Капсид в свою очередь состоит из субъединиц – капсомеров. Он чаще всего имеет симметричное строение. Различают два вида симметрии – спиральную и кубическую. В табл. 4.1 различные вирусы сгруппированы по их структуре. Ниже будут рассмотрены четыре вируса, которые известны как возбудители болезней: два вируса со спиральной симметрией, из них один с голыми частицами (вирус табачной мозаики) и один с дополнительной оболочкой (вирус гриппа), и два типа вирусов с кубической симметрией – с голыми частицами (вирус полиомиелита) и другие полиэдрические вирусы) и с оболочкой (вирус герпеса).

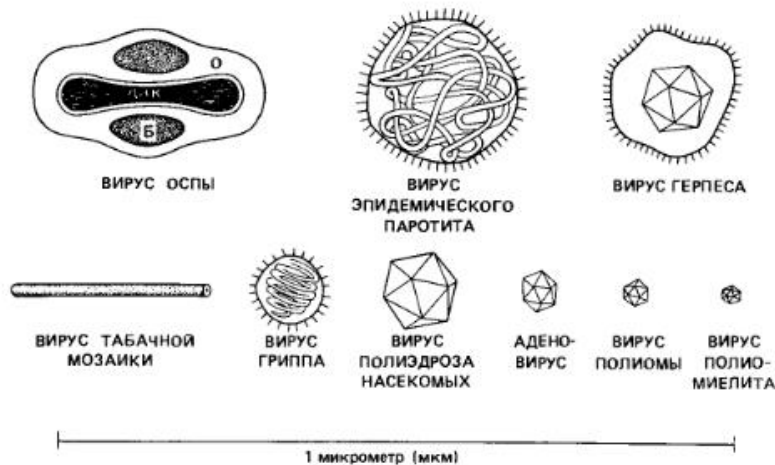


Рис. 4.2. Форма и величина частиц (вирионов) некоторых вирусов. Б – эллиптическое белковое тельце; О – оболочка.

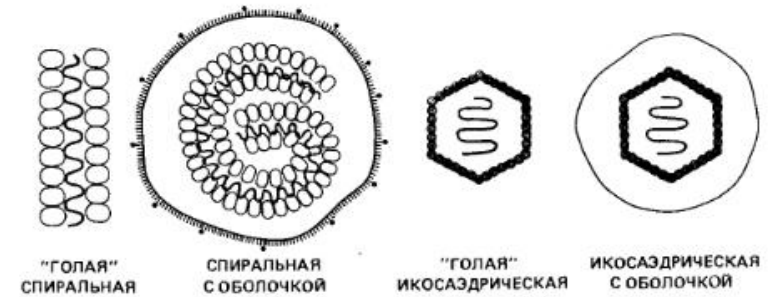


Рис. 4.3. Структурные типы вирусных частиц. Изображены четыре формы: две со спиральной симметрией и две с кубической симметрией (в обоих случаях один вирион «голый» и один – с оболочкой).

Таблица 4.1. Морфологические классы вирусов

Спиральная структура		
РНК	Голые капсиды Вирус табачной мозаики РНК и многие другие вирусы растений	Капсиды с оболочкой Миксовирусы: вирусы гриппа, вирусы парагриппа (свинка, корь)
ДНК	Колифаг fd	
Полиэдрическая структура (икосаэдры)		
РНК	Голые капсиды Пикорнавирусы: вирусы ящура, ЕСНО, полиомиелита, реовирусы	Капсиды с оболочкой Ретровирусы (онкогенные): вирусы саркомы, лейкозов, карциномы
Кольцевая ДНК	Пановавирусы (онкогенные): вирусы папилломы, полиомы, SV40	Тогавирусы: вирус лесов Семлики, вирусы энцефалита, желтой лихорадки
Одноцепочечная кольцевая ДНК	Колифаги ϕ X174, M13	Вирусы простого герпеса, опоясывающего лишая, ветряной оспы, вирус Эпштейна-Барр (инфекционного мононуклеоза)
Сложные вирусы (икосаэдрическая головка + спиральный хвост)		
ДНК	Большие бактериофаги (T2, T4, T6)	
ДНК	Сложные вирионы Вирусы оспы, корь, ветряной оспы	

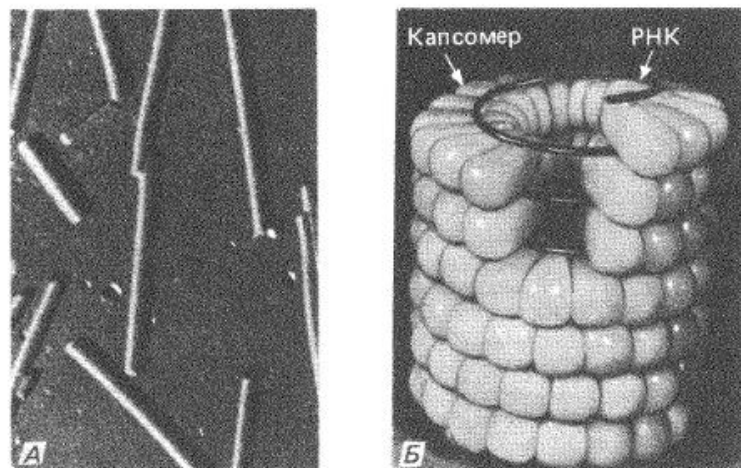


Рис. 4.4. Вирус табачной мозаики. А. Электронная микрофотография после ко-го напыления углеродом и платиной; $65\,000\times$. (Фото Н. Frank.) Б. Модель. (Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart, Thieme, 1980.)

Вирус табачной мозаики. Это типичный пример вируса со спиральной симметрией. Его легко выделить из выжатого сока зараженных растений. Частицы представляют собой палочки толщиной 18 нм (рис. 4.4, А). Этот палочковидный нуклеокапсид состоит примерно из 2100 капсомеров. Они расположены по винтовой линии и образуют полый цилиндр. Каждый капсомер состоит из одной полипептидной цепи (158 аминокислот, последовательность которых определена). В стенке полого цилиндра между капсомерами помещается цепь РНК, которая тоже идет по винтовой линии (рис. 4.4, Б).

Вирус гриппа. Частицы вируса гриппа имеют диаметр 110 нм (рис. 4.5, А). Нуклеокапсид, как и у вируса табачной мозаики, имеет спиральное строение, но он не палочковидный, а многократно закрученный (рис. 4.5, Б). Нуклеокапсид окружен оболочкой – фрагментом мембраны клетки-хозяина, из которой вышел вирион. Оболочка имеет на своей наружной стороне шипы, которые служат для адсорбции вириона на поверхности новой клетки-хозяина и содержат мукопротеины и фермент нейраминидазу. Этот фермент отщепляет от мукопротеинов инфицируемой клетки один компонент – N-ацетилнейраминовую кислоту – и, по-видимому, играет определенную роль в разжижении слизи, покрывающей эпителиальные клетки носоглотки. Размножение вируса происходит внутри клеток. Освобождение вириона напоминает процесс почкования; при этом наружная оболочка вирусной частицы образуется из мем-

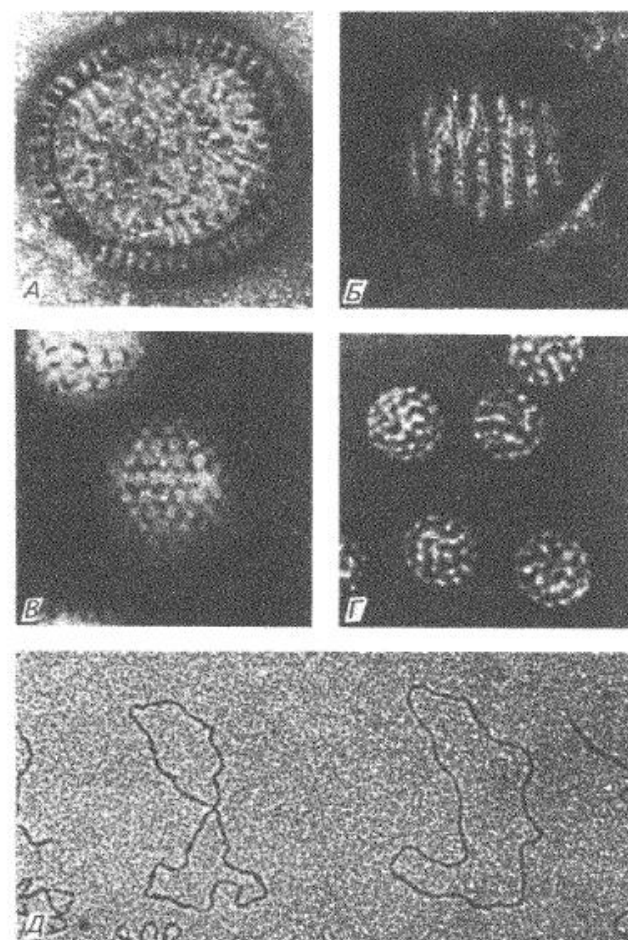
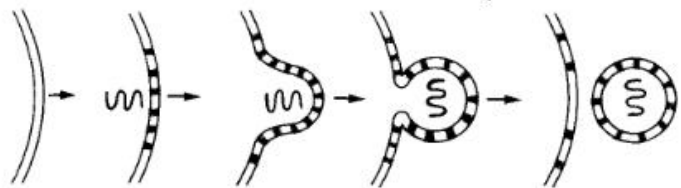


Рис. 4.5. Различные вирусы, патогенные для животных. А. Вирус гриппа А2. Б. Нуклеокапсид вируса гриппа А2; в частицу с лопнувшей оболочкой проникло контрастирующее вещество – фосфорновольфрамовая кислота, и нуклеокапсид стал видимым. В. Аденовирус; видно, что его частицы имеют икосаэдрическую форму. Г. Вирус SV40. Этот опухолевый вирус значительно меньше по величине, чем аденовирус. Он тоже имеет икосаэдрическую форму, но кажется сферическим. Д. ДНК вируса SV40; ее двухцепочечные кольцевые молекулы имеют длину контура примерно 1,6 мкм (справа и слева видны концы разорванных колец). А–Г: $250\,000\times$, негативный контраст (фосфорновольфрамовая кислота; Д: $65\,000\times$. (Фото А, Б, Г, Д – Н. Frank, В – Н. Gelderblom, Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen.)

браны клетки-хозяина, которая может быть модифицирована добавлением белков вирусного происхождения (например, нейраминидазы).



Существует много различных разновидностей вируса гриппа. Какую именно ткань будет поражать вирус, зависит от специфичности вируса по отношению к клеткам-хозяевам и от рецепторных свойств клеток. Вирус может вызвать нарушение клеточного метаболизма или даже гибель клетки. Кроме того, он действует как антиген и стимулирует образование антител в организме хозяина. Вирусы, ответственные за большие эпидемии гриппа, отличаются друг от друга по своей вирулентности и патогенности.

Полиэдрические вирусы без наружной оболочки. Многие вирусы, кажущиеся сферическими, на самом деле имеют форму многогранника. Чаще всего это икосаэдр (двадцатигранник) — тело, ограниченное 20 равносторонними треугольниками и имеющее 12 вершин (рис. 4.5, В и 4.6). Капсид икосаэдрического вируса состоит из капсомеров двух типов: в вершинах располагаются *пентоны*, состоящие из пяти белковых мономеров (протомеров); остальную поверхность граней и ребра образуют *гексоны*, состоящие из шести протомеров. Построение капсида из капсомеров следует законам кристаллографии; в соответствии с этим на-

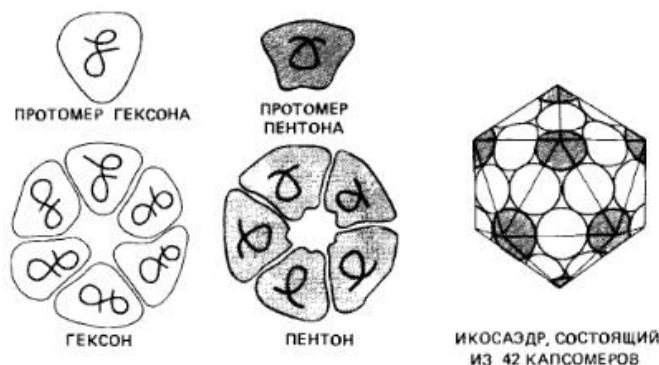


Рис. 4.6. Возможные структурные элементы капсида икосаэдрических вирусов. Изображены капсомеры двух типов: гексагональный (гексон) и пентагональный (пентон); первый состоит из шести, второй — из пяти протомеров, каждый из которых в свою очередь состоит из одной или из двух полипептидных цепей. Справа — икосаэдр, состоящий из 12 пентонов и 30 гексонов, т. е. 42 капсомеров.

именный икосаэдрический капсид должен состоять из 12 пентонов, следующий по величине — из 12 пентонов и 20 гексонов. Существуют вирусы из 252 и даже 812 капсомеров.

По принципу икосаэдра построено очень много вирусов: вирусы полиомиелита, ящура, аденовирусы (рис. 4.5, В) и онкогенный вирус SV40 (рис. 4.5, Г).

То, что вирусный капсид состоит из большого числа идентичных субъединиц, станет понятным, если мы учтем, что масса нуклеиновой кислоты у многих вирусов очень невелика; цепи ДНК или РНК так коротки, что содержащейся в них информации хватает для кодирования лишь немногих полипептидных цепей, большая часть которых выполняет ферментативные функции при репродукции вируса внутри клетки-хозяина. Принцип построения капсида из множества идентичных субъединиц гарантирует максимальный эффект при минимуме генетического материала.

Полиэдрические вирусы с наружной оболочкой. Икосаэдр, окруженный оболочкой, — такова форма возбудителей ветряной оспы, опоясывающего лишая и простого герпеса.

Икосаэдрический капсид вируса герпеса состоит из 162 капсомеров. Наружная оболочка, несомненно, образуется из внутренней ядерной мембраны клетки-хозяина. Вирусы герпеса размножаются в ядрах клеток; капсиды новых вирусных частиц одеваются оболочкой из ядерной мембраны, «отпочковываются» от ядра и выводятся наружу по системе эндоплазматического ретикулума.

Ветряная оспа — относительно легкая детская болезнь. Вирус инфицирует верхние дыхательные пути, разносится кровью по всему телу и, закрепляясь в коже, в конечном счете вызывает здесь образование пузырьков. Опоясывающий лишай возникает у частично иммунных лиц; он появляется в результате реактивации вируса ветряной оспы. Таким образом, оба заболевания вызываются одним и тем же вирусом.

Вирусы оспы. Вирусы оспы — наиболее крупные из зоопатогенных вирусов. Их частицы устроены совсем не так, как у вирусов четырех представленных выше типов. Они содержат ДНК, белок и несколько липидов, из-за чего их иногда называют комплексными вирионами (табл. 4.1). Частицы вирусов натуральной оспы (*vaccinia*) и коровьей оспы (*vaccinia*) имеют вид округленных блоков. Они состоят из внутреннего тельца, содержащего двухцепочечную ДНК, двойного слоя, содержащего белок, эллиптических белковых телц и наружной мембраны; частицу обвивают плотно прилегающие к ней нити. Эти вирусные частицы очень устойчивы к высыханию и поэтому чрезвычайно инфекционны. Натуральной оспой могут заболеть только люди и обезьяны. Вирусом коровьей оспы могут заражаться также коровы, кролики и овцы. Оба вируса имеют общие антигены. Поэтому людям профилактически прививают вирус коровьей оспы, который получают от коров и который у человека вызывает весьма слабые симптомы болезни. Такая активная вакцинация приводит к образованию антител, которые обуславливают иммунитет также и к натуральной оспе.

4.2 Вирусы бактерий (бактериофаги)

Выделение и выявление. Выделить бактериофаг нетрудно. Нужно лишь взять материал из естественного местообитания соответствующего вида бактерий и вместе с бактериями залить питательной средой. Если такую накопительную культуру инкубировать в условиях, благоприятных для данных бактерий, то вскоре размножатся и содержащиеся в пробе фаги. Вирус размножается всегда только в растущих клетках. Можно путем центрифугирования или фильтрации удалить оставшиеся бактерии, а затем в надосадочной жидкости «лизате» — определить количество фагов. Если засеять плотную питательную среду бактериальной взвесью, не содержащей фагов, то на ее поверхности образуется сплошной газон из бактерий. Если же теперь высеять суспензию, содержащую небольшое число фагов, в газоне появятся свободные от бактерий участки (стерильные пятна, или бляшки). В том месте, куда попал фаг и где он поразил бактерию, лизируется все большее число бактериальных клеток; через некоторое время инфицированная фагом область становится заметной уже невооруженным глазом как пятно, не содержащее бактерий, на фоне бактериального газона (рис. 4.1, В). Используя подходящие методы, можно быстро размножать бактериофаги на бактериальных газонах на твердых средах или в суспензиях бактерий. Затем отделяют бактериальные клетки центрифугированием, убивают оставшиеся бактерии хлороформом и получают таким образом фаговый лизат, содержащий обычно от 10^{10} до 10^{13} фагов в 1 мл.

Морфология бактериофагов. Строение бактериофагов в основном изучали на примере фагов серии Т *Escherichia coli*. Колифаг Т2 состоит из полиэдрической головки длиной 100 нм и отростка, или «хвоста», примерно такой же длины. Поэтому говорят о «составных» вирусах (табл. 4.1). Головка состоит из капсомеров и содержит внутри ДНК. Количество белка и ДНК примерно одинаково. Отросток фага Т2 имеет сложное строение. В нем можно различить не менее трех частей: полый стержень, окружающий его сократимый чехол и находящуюся на дистальном конце стержня базальную пластинку с шипами и нитями (от последних зависит специфическая адсорбция на клетке-хозяине). На электронных микрофотографиях, полученных при негативном контрастировании, можно видеть фаговые частицы в двух состояниях: у одних частиц головка очень резко выделяется на электроплотном фоне и чехол отростка растянут, у других головка мало отличается от фона по плотности и чехол находится в сокращенном состоянии. Это схематически изображено на рис. 4.7. Первое состояние (А) характерно для активного фага, в головке которого заключена ДНК, второе (Б) — для фага, который инъецировал свою ДНК в бактериальную клетку.

Многие бактериофаги имеют более простое строение. В зависимости от формы зрелых фаговых частиц различают ряд типов, которые представлены на рис. 4.8 и 4.9. Большинство фагов содержит двухцепочечную ДНК. В последние годы, однако, было обнаружено несколько фа-

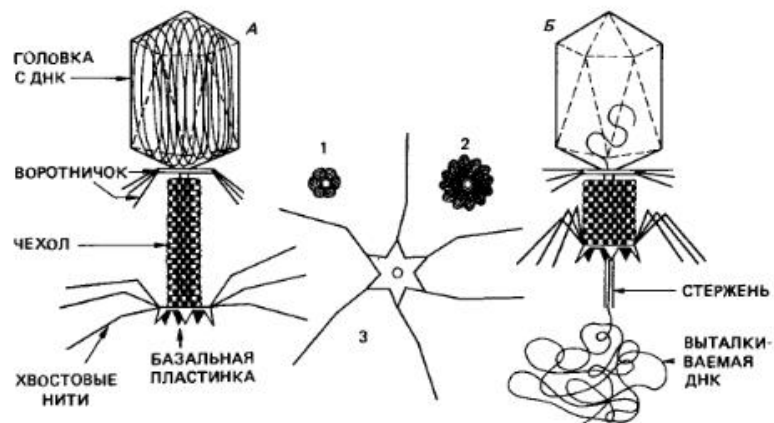


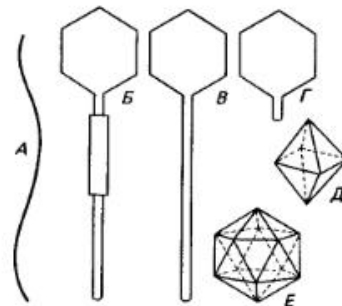
Рис. 4.7. Модель фага Т2. А. Фаг с вытянутым чехлом до адсорбции. Б. Фаг с сократившимся чехлом после адсорбции и инъекции. 1 — поперечный разрез вытянутого отростка: видны 6 белковых субъединиц чехла в одной плоскости; 2 — поперечный разрез сократившегося чехла: видны 12 белковых субъединиц чехла в одной плоскости; 3 — базальная пластинка готового к адсорбции фага со свободными нитями.

гов с одноцепочечной ДНК и несколько с одноцепочечной РНК. Содержащие РНК фаги fr (рис. 4.9, Д), R17, Q β и другие обладают наименьшими из известных геномов: в них 3500–4500 нуклеотидов.

4.2.1 Размножение вирулентного фага: литический цикл

Репродукция вируса в клетке-хозяине — процесс очень сложный. Его отдельные этапы, от заражения клетки-хозяина до освобождения зрелых инфекционных частиц, довольно хорошо изучены с биохимической, генетической и морфологической стороны на примере фагов серии Т (Т2, Т4, Т6). Благоприятной предпосылкой для таких исследований явилось

Рис. 4.8. Различные формы бактериофагов (А–Г) и геометрические формы головок фагов (Д, Е). А. Нитевидная форма (колифаг fd). Б. Головка (гексагональный контур) с отростком и сократимым чехлом (например, колифаги Т2, Т4 и Т6). В. Головка с длинным, гибким несократимым отростком (например, колифаги Т1 и Т5). Г. Головка с коротким отростком (например, колифаги Т3 и Т7, фаг сальмонеллы P22). Д. Октаэдр. Е. Икосаэдр. (Bradley D. E., *Bacteriol. Rev.*, 31 [1967], 230.)



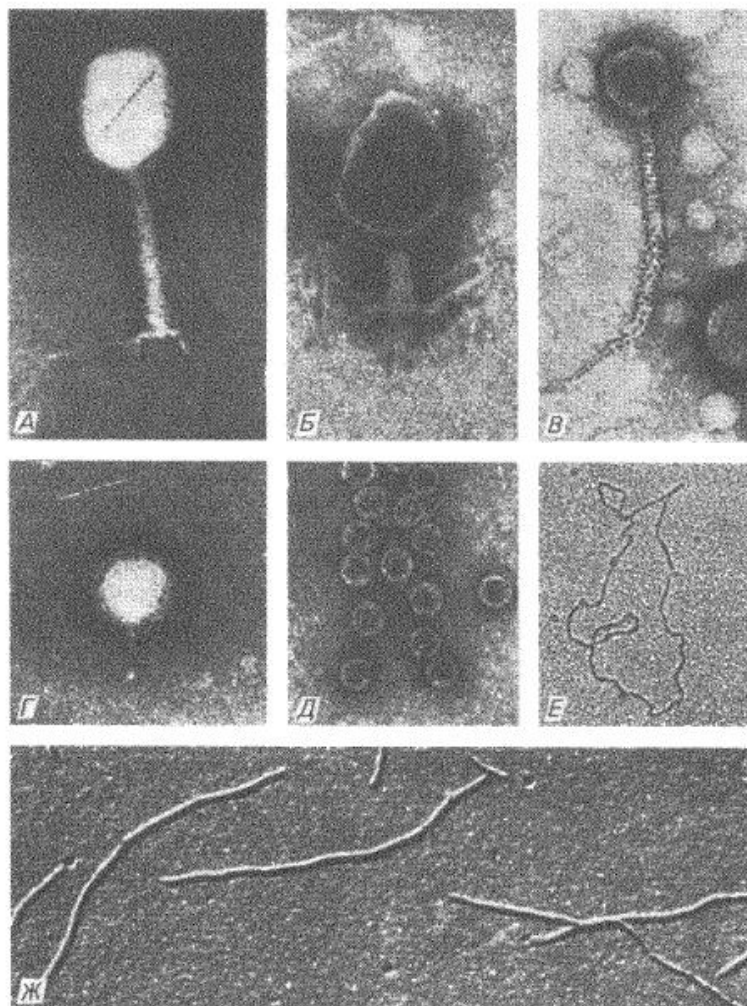


Рис. 4.9. А. Фаг T2; 168 000 ×, негативный контраст (фосфорновольфрамовая кислота). Б. Фаг T2 с сократившимся чехлом и пустой головкой; 168 000 ×, негативный контраст (фосфорновольфрамовая кислота). В. Фаг лямбда; 168 000 ×, негативный контраст (уранилацетат). Г. Фаг T7 с коротким отростком; 168 000 ×, негативный контраст (уранилацетат). Д. РНК-фаг fd; 168 000 ×, негативный контраст (уранилацетат). Е. Кольцевая молекула ДНК (репликативная форма) фага fd; 50 000 ×, после распрямления в цитохроме конусное напыление. Ж. Фаг fd с кольцевой одноцепочечной ДНК; 50 000 ×, напыление под углом. (Фото Н. Frank.)

то, что в фаговой ДНК вместо цитозина содержится 5-гидроксиметилцитозин, и поэтому ее синтез легко проследить по появлению этого основания. Кроме того, можно получить мутантные формы фага, у которых та или иная стадия процесса репродукции блокирована или же протекает только в определенных условиях. С помощью таких мутантов удалось выяснить, как происходит внутри клетки-хозяина морфологическое развитие (морфопозз) фага, т.е. в какой временной последовательности синтезируются и соединяются различные компоненты фаговых частиц.

Подобно другим вирусам, фаги неподвижны. При смешивании взвеси свободных фагов со взвесью бактерий фаговые частицы в результате случайных столкновений с клетками прикрепляются к поверхности последних (адсорбция) и вводят в клетку свою ДНК (инъекция). По прошествии некоторого времени, необходимого для процессов синтеза и созревания, клетки лизируются и новообразованные фаговые частицы выходят наружу (см. рис. 4.13).

Адсорбция. Не всякий фаг адсорбируется на любой бактерии. Специфичность отношений хозяина и фага определяется специфичностью адсорбции, которая зависит от рецепторов, имеющих в клеточной стенке. Рецепторы для одних фагов находятся в липопротеиновом слое, для других – в липополисахаридном. Фагорезистентность некоторых бактерий определяется, вероятно, отсутствием у них соответствующих рецепторов. При избытке бактериофага на одной клетке может адсорбироваться 200–300 фаговых частиц.

Внутриклеточное развитие фага. За адсорбцией следует инъекция, т.е. введение ДНК в клетку. У фага T2 при этом базальная пластинка, по видимому, фиксируется на клетке, чехол отростка сокращается и в результате этого полый стержень входит в бактериальную клетку. Опыты с фагом, у которого нуклеиновая кислота была помечена ^{32}P , а белок – ^{35}S , показали, что в клетку проникает только нуклеиновая кислота, а белковая оболочка остается снаружи. Можно было отделить эту оболочку от зараженной клетки без всякого ущерба для размножения фага. Во время так называемого **латентного периода**, продолжающегося у *Escherichia coli* в среднем 25 мин, в искусственно разрушенных бактериальных клетках не удается обнаружить фага. Инъекцированная ДНК фага прежде всего вызывает полную перестройку метаболизма зараженной клетки (рис. 4.10). Сразу же прекращается синтез бактериальной ДНК. Через несколько минут прекращается также синтез бактериальной РНК и бактериальных белков, хотя общее количество белка продолжает непрерывно возрастать. Синтез ДНК возобновляется, даже с повышенной скоростью. Сначала фаговая ДНК образуется за счет распавшейся бактериальной. Эту перестройку и последующее новообразование фаговой ДНК можно количественно проследить по увеличению количества 5-гидроксиметилцитозина – основания, специфичного для ДНК некоторых T-фагов. Необходимые для синтеза фаговой ДНК ферменты образуются уже вскоре после заражения; это так называемые

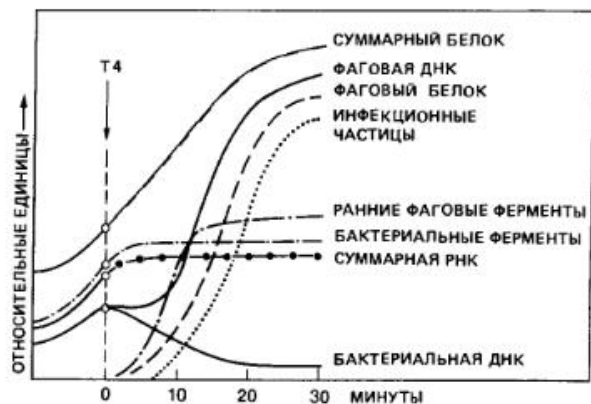


Рис. 4.10. Временной ход процессов биосинтеза у *Escherichia coli* после заражения клеток фагом T4. (Luria, Darnell, 1967.)

«ранние белки». К «поздним белкам» относятся белки оболочки и фаговые лизоцимы, или эндолизины; они образуются лишь во второй половине скрытого периода.

Заключительный процесс — **созревание** — состоит в соединении фаговой ДНК с белком оболочки и образовании зрелых инфекционных фаговых

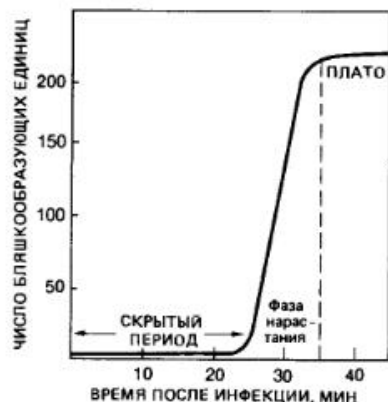


Рис. 4.11. Определение скрытого периода и урожая фага (на примере экспериментов с размножением фага T2 в клетках *Escherichia coli* B). Молодую культуру бактерий заражали суспензией фага, а затем свободные (не адсорбировавшиеся) фаговые частицы инактивировали добавлением антифаговой сыворотки. После сильного разведения через определенные интервалы времени брали пробы и высеивали на агар вместе с избытком бактерий, чувствительных к данному фагу. В течение 25 мин число бляшкообразующих единиц оставалось неизменно равным 5 (скрытый период), а затем возрастало до 235 (плато). Согласно этим данным, выход фага на одну инфицированную клетку бактерии (урожай фага) составлял в среднем 47 частиц.

частиц. Созревание T-фагов — сложный многоступенчатый процесс. Сначала образуются капсиды, наполненные внутри белками. После растворения этих внутренних белков готовые головки наполняются ДНК до определенной, зависимой от типа фага плотности и закрываются. После этого пристраиваются компоненты отростка. Последовательность этих процессов можно проследить на условно летальных мутантах, у которых при 25°C все процессы синтеза протекают нормально, а при 43°C тот или иной этап блокируется.

В конце концов клеточная стенка бактерии размягчается под действием фагового лизоцима, и новые фаги **освобождаются**. Такое внезапное разрушение клетки можно наблюдать под микроскопом в условиях темного поля. Продолжительность латентного периода и величина урожая фаговых частиц варьируют в широких пределах в зависимости от вида фага, вида бактерии и условий среды (рис. 4.11). Удалось инфицировать такие бактерии, как *Haemophilus influenzae* и *Bacillus subtilis*, нативной ДНК, выделенной из бактериофага. Подобную инфекцию, соответствующую генетической трансформации, называют трансфекцией.

4.2.2 Развитие умеренных фагов: лизогения

Описанные выше бактериофаги, как правило, лизируют зараженные ими бактерии, и потому их называют **вирулентными**. Некоторые фаги, однако, заражают бактерий-хозяев, но не размножаются в них автономно и не вызывают лизиса. Такие фаги называются **умеренными**. Видимо, их размножение происходит синхронно с размножением бактерий. Лишь очень редко, в одной из 10^2 – 10^5 таких «лизогенных» бактерий, фаг начинает спонтанно размножаться и клетка подвергается лизису. В этом случае для того, чтобы обнаружить выход инфекционного фага, в качестве индикатора нужен другой бактериальный штамм, для которого этот фаг вирулентен. Если смешать лизогенные бактерии с избытком бактерий-индикаторов и посеять смесь на агаризованную среду, то будут расти также и колонии лизогенных бактерий. Время от времени некоторые клетки будут лизироваться и выходящие из них фаговые частицы будут заражать находящиеся по соседству чувствительные (индикаторные) бактерии. Это приведет к появлению бляшек в сплошном бактериальном газоне. Однако в середине каждой такой бляшки сохранится колония лизогенной бактерии (рис. 4.12).

Лизогенные бактерии обладают потенциальной способностью продуцировать фаги, но эту способность нельзя обнаружить ни морфологическим, ни серологическим исследованием. Фаг в таком неинфекционном состоянии, передающийся только дочерним клеткам при делении, называют **профагом**. Подобно другим признакам бактериальной клетки, наличие в ней профага наследуется. Поскольку все потомство лизогенной клетки тоже лизогенно, профаг, очевидно, должен реплицироваться синхронно и регулярно вместе с хромосомой клетки-хозяина (рис. 4.13).

Лизогенные бактерии иммунны к заражению теми фагами, которые

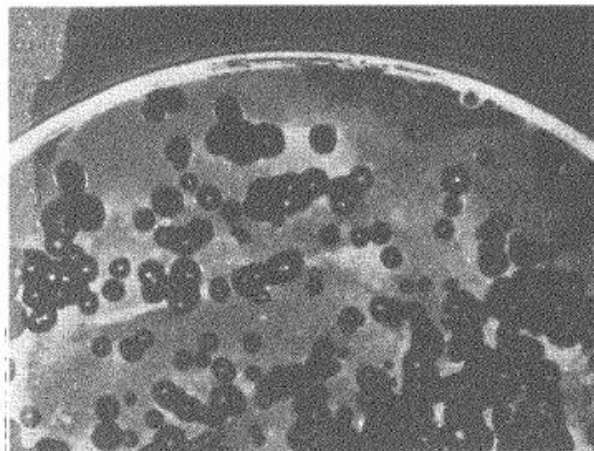


Рис. 4.12. Образование бляшек лизогенными бактериями и свободными фагами. На поверхность агара была нанесена плотная суспензия нелизогенных чувствительных бактерий (*Bacillus megaterium*), содержащая немного клеток лизогенного штамма того же вида и небольшое количество свободных фаговых частиц. Прозрачные бляшки—результат лизирующего действия одной частицы свободного фага; пятнышки в центре бляшек—колонии лизогенных бактерий.

присутствуют в них в виде профага. Обеспечиваемый профагами иммунитет обусловлен не невозможностью адсорбции (как при устойчивости к вирулентным фагам), а образованием особого цитоплазматического белка-репрессора, препятствующего размножению вегетативных фагов. Этот же репрессор препятствует обратному переходу профага в вегетативное состояние и подавляет синтез фаговых белков. Возникновение лизогенного состояния связано, таким образом, с образованием репрессорного белка.

Спонтанно, без воздействия извне лизогенные бактерии лизируются редко. Однако целый ряд факторов (ультрафиолетовые лучи, митомицин С или алкилирующие агенты) может индуцировать в каждой клетке развитие профага, ведущее к образованию и высвобождению инфекционного фага. Успех такой **индукции** зависит от генетической конституции профага, физиологического состояния хозяина и условий культивирования. Индукция связана, очевидно, с устранением или инактивацией имеющихся молекул репрессора. Некоторые мутанты умеренных фагов образуют термолabileльный репрессор, и тогда достаточно уже повышения температуры до 44°C, чтобы вызвать лизис бактерий.

Интеграция и индукция фага λ (лямбда). Изучение фага лямбда (λ), лизогенного для *Escherichia coli* K12, позволило выяснить, каким образом профаг связан с бактериальной хромосомой. Лизогенизация бактерий этим фагом может служить примером жизненного цикла умеренно-

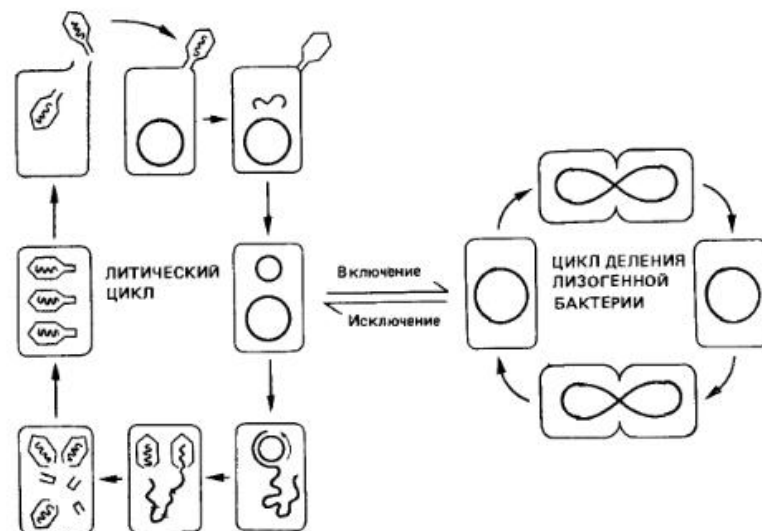


Рис. 4.13. Жизненные циклы умеренного фага (на примере фага лямбда). После инфекции *Escherichia coli* фагом лямбда происходит либо репродукция фага с последующим лизисом (литический цикл), либо лизогенизация бактерии. ДНК фага представлена линейной двойной спиралью. В бактерии она замыкается в кольцо. Это кольцо может оставаться автономным или интегрироваться в бактериальную ДНК. В первом случае разворачивается литический цикл. Замкнутая в кольцо ДНК реплицируется. В результате репликации по способу «катающегося кольца» получается цепочка из четырех копий фаговой ДНК. Гены фага запускают синтез и сборку белков головки и отростка и упаковку по одной копии ДНК в каждую головку фага. Головки спонтанно соединяются с отростками. При лизисе клетки-хозяина высвобождается около сотни зрелых фагов, которые в свою очередь могут инфицировать клетки. Однако кольцевая ДНК фага может также потерять свою автономию и включиться (интегрироваться) в ДНК хозяина. В этом случае клетка становится лизогенной. Латентный фаг, или «профаг», реплицируется совместно с хромосомой клетки-хозяина. Лизогенная бактерия может неограниченно делиться, не подвергаясь лизису. Исключение (из хромосомы) фаговой ДНК, приводящее к лизису клетки, может произойти спонтанно или под действием индуцирующего фактора—облучения или мутагена.

го бактериофага. Длина хромосомы фага лямбда оставляет всего 2% длины бактериальной хромосомы.

В свободных фаговых частицах ДНК присутствует в виде линейной (не кольцевой) двойной спирали (рис. 4.14). Каждая из цепей на одном конце выступает за пределы дуплекса на 12 нуклеотидов. Эти два одноцепочечных конца комплементарны друг другу; путем спаривания оснований они могут соединяться друг с другом, поэтому их называют «липкими» концами. Если поместить такие молекулы ДНК *in vitro* в раствор, то благодаря взаимодействию между комплементарными основаниями одноцепочечных концов наступает равновесие между ли-

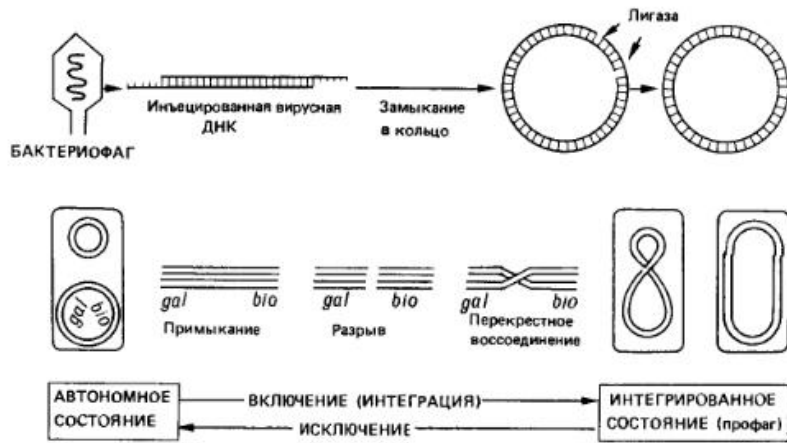


Рис. 4.14. Интеграция (включение) фага лямбда в хромосому *Escherichia coli* и его освобождение из хромосомы (исключение). В фаговой частице ДНК представлена линейной двойной спиралью с неспаренными комплементарными концами. В растворе или в бактериальной клетке «липкие» комплементарные концы связываются друг с другом, и разрыв в каждой цепи закрывается с помощью лигазы. После этого замкнутое двухцепочечное кольцо подходит к хромосоме (между генами *gal* и *bio*), обе двойные спирали разрываются и образовавшиеся свободные концы воссоединяются крест-накрест. В результате фаговая ДНК оказывается включенной (встроенной, или интегрированной) в хромосому хозяина. Фаг превратился теперь в профаг, и клетка стала лизогенной (в данном случае по фагу лямбда). В результате обратного процесса может произойти выключение ДНК фага и переход ее в автономное состояние.

нейными и кольцевыми ДНК. Такое же замыкание в кольцо происходит после того, как фаг лямбда инфицирует клетку. При этом оба разрыва между концами цепей закрываются полинуклеотид-лигазой. Функция этого бактериального фермента состоит в том, чтобы устранить разрывы в отдельных цепях двойных спиралей ДНК путем связывания нуклеотидов. Таким образом, для замыкания линейной ДНК фага в кольцо никакие фаговые ферменты не нужны.

В лизогенных клетках профаг прочно связан с хромосомой клетки-хозяина. При конъюгации клеток профаг вместе с хромосомой хозяина переносится из клетки-донора в клетку-реципиент. Генетические эксперименты показывают, что фаг лямбда присоединен к хромосоме хозяина в совершенно определенном месте (между галактозным опероном и биотиновым локусом). Вначале предполагали, что ДНК бактериофага только прикрепляется к хромосоме бактерии в этом участке. Однако в результате составления генетических карт фага, а также из опытов по рекомбинации стало ясно, что фаговая ДНК при лизогенизации не просто прикрепляется к бактериальной ДНК, а включается в нее.

Включение (интеграция) ДНК профага в хромосому клетки-хозяина происходит, очевидно, в результате разрыва и перекрестного воссоеди-

нения (рис. 4.14). За эту реакцию ответствен фермент, названный лямбда-интегразой. Он узнает две разные, негомологичные последовательности нуклеотидов—одну в хромосомной ДНК и одну в ДНК фага—и тесно сближает обе двойные спирали друг с другом; затем последние разрываются и снова соединяются крест-накрест. Отдельные этапы этой сайт-специфической рекомбинации показаны на рис. 4.14.

В интегрированном состоянии фаговая ДНК реплицируется вместе с бактериальной и подвержена тем же регуляторным воздействиям, что и удвоение бактериальной хромосомы. Информация, содержащаяся в фаговой ДНК, в это время не проявляется. Только в результате перехода профага в вегетативное состояние восстанавливается автономия фаговой ДНК и начинается размножение фага. Этот обратный процесс может произойти спонтанно или в результате индукции (например, под действием ультрафиолетового облучения). **Исключение** фаговой ДНК из бактериальной хромосомы происходит, вероятно, путем обращения процессов, приведших к ее включению, и осуществляется очень точно: более 99% фаговых частиц, освобождающихся из лизогенных клеток, идентичны с исходным (инфицирующим) фагом. Это означает, что фаговая ДНК при ее выключении выплывает точно в том же месте, где происходила интеграция. Только в редких случаях (одном из 100 000) выключение ДНК фага происходит аномально (см. разд. 15.3.3, где говорится о трансдукции).

Как только профаг в результате выключения перешел в вегетативное состояние, он опять становится автономным и может размножаться в бактериальной клетке как вирулентный фаг. Выключение, таким образом, приводит к лизису бактерии и высвобождению фага лямбда.

4.3 Отношение вирусов и плазмид к образованию опухолей (онкогенезу)

Возникновение злокачественных (раковых) опухолей может иметь различные причины, однако во всех случаях к этому причастен генетический материал клетки—ее ДНК. Что бы ни привело к образованию опухоли (раковому перерождению), последующим ростом ткани управляет ДНК безудержно делящихся опухолевых клеток. В основе превращения нормальной клетки в злокачественную—опухолевую трансформации—лежит перенос или иное изменение ДНК. Агент, вызывающий пролиферацию клеток,—это продукт гена. До сих пор, правда, не удается создать общую теорию, которая охватывала бы все формы ракового перерождения, однако изучение злокачественных опухолей, вызванных вирусами и плазмидами, уже сейчас позволяет сделать далеко идущие выводы.

Мы рассмотрим три примера онкогенеза: 1) образование опухолей у растений, 2) развитие опухолей у животных под действием ДНК-вирусов и 3) развитие опухолей у животных под воздействием РНК-вирусов (ретровирусов).



Рис. 4.15. Опухоль на стебле *Kalanchoë blossfeldiana*, образовавшаяся в результате прививки *Agrobacterium tumefaciens* в кору растения. (Фото U. Kaiser.)

Образование опухолей у растений. У многих растений встречаются опухоли корневой шейки. Эти разрастания ткани уменьшают поток питательных веществ между подземными и надземными частями. У многих растений такие опухоли можно вызвать экспериментально; типичные результаты получаются больше чем у половины изученных видов (рис. 4.15). Возбудителем является *Agrobacterium tumefaciens* – грам-отрицательная почвенная бактерия с перитрихальными жгутиками, сходная с представителями рода *Rhizobium*. Бактерии проникают в ткань через поврежденные участки и размножаются в межклетниках. Бывают вирулентные и авирулентные штаммы *A. tumefaciens*; вирулентные содержат большую плазмиду, так называемую Ti-плазмиду. После заражения ткани плазмиды проникают в растительные клетки.

Плазмидная ДНК прочно интегрируется в хромосомную ДНК растительных клеток и вызывает их опухолевый рост. Путем прививки таких клеток можно передать опухоль здоровому растению; таким образом, после того как клетки претерпели опухолевую трансформацию, бактерия и ее плазмиды становятся уже ненужными. Интегрированная ДНК плазмиды ответственна также за способность клеток вырабатывать новые ферменты, с помощью которых синтезируются аминокислоты октопин и нопалин, так называемые опиины. Эти аминокислоты могут использоваться бактерией *A. tumefaciens* в качестве источника углерода и азота. Благодаря Ti-плазмиде *Agrobacterium* получает, таким образом, преимущественный доступ к продуктам фотосинтеза растения: Ti-плазмиды обеспечивают образование аминокислот, которые могут быть усвоены только этой бактерией.

Наряду с этим Ti-плазмиды представляет собой естественный генный вектор для переноса чужеродной ДНК (см. разд. 15.3, рис. 15.21) в растения. Гены, определяющие опухолевый рост, можно выделить из плазмиды и заменить другими генами. Из тканей, состоящих из клеток, трансформированных видоизмененной плазмидой, удавалось регенерировать целые растения табака, которые росли совершенно нормально и вдобавок ко всему синтезировали опиины. Таким образом, гены чужеродной ДНК передавались как доминантные факторы в соответствии с обычными законами наследственности.

Онкогенез, вызываемый у животных ДНК-вирусами. Исследования канцерогенеза у животных нередко проводятся на культурах тканей. Если перенести клетки животных, например из органов кур или хомячков, или фибробласты человека в подходящую питательную среду, то на внутренней стенке культурального сосуда они начнут размножаться. Обычно клетки продолжают расти лишь до тех пор, пока не начнут соприкасаться между собой. Из-за контактного торможения образуется только однослойный клеточный газон. Если же эти нормальные клетки инфицировать опухолеродным вирусом, то контактное торможение снимается, клетки продолжают размножаться и начинают надвигаться друг на друга. Многослойный рост наблюдается только у клеток, претерпевших опухолевую трансформацию. Из клеточной массы легко выделить отдельные клетки и таким путем получить чистые линии (клоны) трансформированных клеток.

Вирусы полиомы и SV40 («Обезьяний вирус 40») относятся к группе паповавирусов. Они содержат двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. В эксперименте вирус можно перенести для размножения в клетки тканевой культуры. Размножаясь в некоторых (так называемых пермиссивных) клетках, вирус вызывает их лизис, и по мере его размножения клетки гибнут. В других (непермиссивных) клетках вирус ведет себя иначе. В этом случае размножение вируса подавляется, и примерно в одной из 10^5 клеток вирусная ДНК интегрируется в клеточную ДНК. Такое включение вирусной ДНК в геном клетки-хозяина может приводить к опухолевой трансформации. В трансформированной клетке образуется белок (Т-антиген), который запускает репликацию клеточной ДНК, и в результате начинается размножение клеток. Инъекция такого рода трансформированных клеток животным приводит к быстрому образованию опухолей.

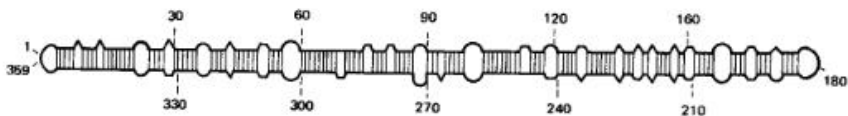
Онкогенез, вызываемый у животных РНК-вирусами. К образованию опухолей у животных могут быть причастны также и РНК-вирусы – ретровирусы. Они относятся к икосаэдрическим вирусам с оболочкой и содержат (+)РНК-геном (одноцепочечную РНК). В качестве онкогенных вирусов они, например, вызывают саркому Рауса у кур и лейкемию у мышей. Название «ретровирус» связано с тем, что в их размножении участвует обратная транскриптаза (см. конец раздела 15.1). РНК этих вирусов не может воспроизводиться путем простой репликации – необходима ее предварительная транскрипция в ДНК с по-

следующей интеграцией этой ДНК в одну из хромосом клетки-хозяина. Интеграция – необходимый этап репродукции вируса; только интегрированная вирусная ДНК будет транскрибироваться. Так как интеграция в клеточную ДНК входит в жизненный цикл вируса, частота интеграции очень велика. Вероятно, вирусная ДНК может включаться в клеточную в любом месте.

Размножение вируса не приводит к лизису клетки. Нуклеокапсид образуется внутри клетки, перемещается затем к плазматической мембране и выходит наружу, одетый в оболочку из этой мембраны. Интегрированная ДНК ретровируса реплицируется вместе с геномом клетки-хозяина и поэтому содержится в каждой клетке опухоли (саркомы). Опухолевый рост клеток обусловлен экспрессией вирусного гена «src». Этот ген кодирует белок, который, по-видимому, представляет собой киназу, фосфорилирующую белки. Можно думать, что эта киназа участвует в преобразовании дифференцированной клетки в клетку эмбрионального типа.

Недавно была выяснена последовательность оснований в вирусной РНК. Оказалось, что она сходна с последовательностью одного из генов человека. Отсюда можно заключить, что *src* – это ген животного происхождения, который в результате неточной транскрипции был включен в РНК вируса вместе с вирусными генами и закрепился в ней. Это мог быть ген, кодирующий важный для эмбриональной клетки фактор роста. Таким образом, опухоли, вызываемые ретровирусами, в конечном счете обусловлены переносом какого-то гена животного происхождения в клетку животного.

Вироиды. Недавно удалось установить, что возбудителями некоторых опухолей растений являются маленькие «голые», т.е. лишенные белковой оболочки, свободные молекулы РНК. Их назвали вироидами. Это замкнутые в кольцо одноцепочечные молекулы с длиной цепи примерно в 360 нуклеотидов (молярная масса $12 \cdot 10^4$ Да).



Таким образом, они в десять раз меньше инфекционных РНК самых мелких из известных до сих пор вирусов, и, следовательно, это самые мелкие возбудители болезней. Вироиды вызывают болезни картофеля, цитрусовых, огурцов, хризантем, хмеля, кокосовых пальм и других растений.

5. Грибы

Своим названием вся эта группа организмов обязана самым заметным ее представителям – шляпочным грибам (греч. *mykes*, лат. *fungus*). Грибы относятся к эукариотам. С растениями их сближает ряд общих признаков: наличие клеточной стенки и вакуолей, заполненных клеточным соком; хорошо видимое под микроскопом движение протоплазмы; способность к активному перемещению. У грибов, однако, нет фотосинтетических пигментов; это С-гетеротрофы (точнее, хемоорганогетеротрофы). Грибы растут в аэробных условиях и получают энергию путем окисления органических веществ. По сравнению с растениями, имеющими стебель, корни и листья, грибы слабо дифференцированы морфологически, и у них почти нет разделения функций между разными частями организма.

Вегетативное тело. Вегетативное тело (таллом) гриба состоит из нитей толщиной около 5 мкм, сильно разветвленных и разрастающихся по поверхности или во всем объеме питательного субстрата. Эти так называемые **гифы** состоят из клеточных стенок и цитоплазмы с ее включениями. Гифы либо не имеют поперечных перегородок (у низших грибов), либо разделены такими перегородками (септами) на клетки (у высших грибов). В последнем случае, однако, цитоплазма одной клетки сообщается с цитоплазмой соседней клетки через пору, находящуюся в центре перегородки (рис. 5.1).

Всю совокупность гиф грибного таллома называют **мицелием**. На определенных стадиях, например при переходе в фазу бесполого или полового размножения, мицелий образует плотные, похожие на паренхиматозную ткань сплетения, так называемую **плектенхиму**. Типичный пример плектенхимы – мясистые плодовые тела шляпочных грибов. У высших грибов мицелий образует также плотные тяжи – ризоморфы, функция которых связана с транспортом веществ.

Рост и размножение. Гифы грибов растут путем удлинения кончиков (апикальный рост). У большинства грибов любая часть мицелия способна к росту. Для посева достаточно маленького кусочка мицелия – из него образуется новый таллом. Структуры и механизмы, обеспечивающие размножение, исключительно многообразны и служат основой для классификации грибов. Различают два типа размножения – половое и бесполое. Большинство грибов размножается обоими способами.

Бесполое размножение осуществляется обычно при помощи спор, путем почкования или фрагментации. Наиболее широко распространено

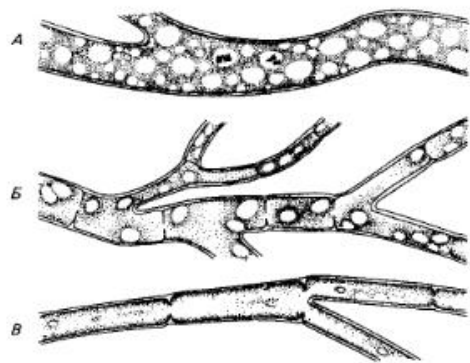


Рис. 5.1. Вегетативные гифы грибов. А. Гифы фикомицетов несептированные, т.е. не имеют поперечных перегородок. Б. Для зумицетов характерны гифы с перегородками—септированные. В. У оомицета *Leptomitium lacteus* гифы разделены неполными перетяжками.

и наиболее дифференцировано **спорообразование**. На концах гиф отшнуровываются **конидиоспоры** (у *Penicillium*, *Aspergillus*). Если споры образуются внутри спорангиев, то говорят о **спорагиоспорах** (у *Mucor*, *Rhizopus*). У низших грибов спорангиоспоры часто движутся с помощью жгутиков; в таком случае их называют зооспорами. Строение жгутиков такое же, как у всех эукариот: они отходят от лежащих в цитоплазме блефаропластов и состоят из 11 параллельных фибрилл, из которых 9 периферийных фибрилл расположены вокруг двух, находящихся в центре (структура типа 9 + 2).

Для дрожжей характерным видом бесполого размножения является **почкование**. При этом на материнской клетке образуется небольшая выпуклость—почка, в которую переходит одно ядро, после чего почка отшнуровывается (рис. 5.2). Размножение может осуществляться также путем разлома гиф на отдельные клетки—оидии или **артроспоры** (как, например, у молочной плесени *Endomyces lactis*). У некоторых грибов такие клетки окружаются толстой стенкой, и в этом случае их называют **хламидоспорами**. Наконец, некоторые представители дрожжей (*Schizosaccharomyces*), подобно бактериям, размножаются делением надвое.

Половое размножение у грибов, так же как у других эукариот, включает слияние двух ядер. Такое слияние ядер у разных грибов происходит через различные промежутки времени после первого контакта между родительскими клетками. В процессе полового размножения можно различить три фазы. Прежде всего происходит **плазмогамия**—соединение двух протопластов. Возникшая в результате этого клетка содержит два ядра. Эта пара ядер (дикарион) не обязательно сливается сразу же. Во время последующих делений клетки могут оставаться в дикариотической фазе. Оба ядра делятся при этом одновременно (сопряженное де-



Рис. 5.2. Бесполое размножение некоторых грибов. А. Почкование (у дрожжей). Б. Разделение гиф на отдельные клетки, называемые оидиями или артроспорами и ведущие себя как споры (у *Collybia* sp.). В. Образование толстостенных хламидоспор (у *Fusarium*). (Alexopoulos C.J., Einführung in die Mykologie, Stuttgart: Fischer, 1966.)

ление). Лишь позднее, часто только после образования плодового тела, происходит слияние обоих гаплоидных ядер (**кариогамия**) с образованием диплоидного ядра зиготы. За кариогамией следует **мейоз**, или редукционное деление, при котором число хромосом уменьшается до исходного (гаплоидного). Три названных процесса—плазмогамия, кариогамия и мейоз—у некоторых грибов следуют непосредственно один за другим, у других же происходят на самых различных стадиях развития гриба.

У низших грибов фаза полового размножения начинается с образования половых клеток, или **гамет**. Если гаметы, происходящие от мужской и женской родительских клеток, морфологически неразличимы, их называют изогаметами. Гаметы образуются часто в особых морфологически дифференцированных клетках—**гаметангиях**. Если эти последние различны по своей форме, то мужские гаметангии называют **антеридиями**, а женские—**оогониями**.

По способу **переноса гамет** и осуществления плазмогамии различают несколько типов грибов. У низших, преимущественно водных, грибов обе гаметы подвижны (планогаметы) и слияние их происходит вне гаметангиев. У оомицетов подвижна только мужская гамета; она проникает в оогоний и оплодотворяет яйцеклетку. Для зигомикетов характерна **гаметангиогамия**—слияние целых соприкасающихся друг с другом многоядерных гаметангиев в многоядерную **ценозиготу**.

Если женские и мужские гаметангии образуются на одном и том же вегетативном теле, развившемся из одной споры, то говорят о гомоталлических (гермафродитных) грибах. У гетероталлических грибов талломы различны в половом отношении, т.е. несут либо только мужские, либо только женские половые органы. У гомоталлических грибов возможно самооплодотворение (аутогамия). В тех случаях, когда само-

оплодотворению препятствует какого-то рода физиологический барьер, говорят об их **несовместимости**. Такая несовместимость наблюдается, например, у *Neurospora*. Хотя у этого гриба на одном и том же мицелии образуются гаметангии обоего пола, оплодотворение может происходить только между мицелиями разных половых знаков (+ и -). Мицелии одного и того же знака несовместимы.

Классификация. Классификация грибов, так же как и бактерий, преследует в основном практические цели; однако она учитывает при этом и филогенетические связи. Номенклатура бинарная: каждому виду присваивается родовое и видовое название (например, *Aspergillus niger*). Виды объединяются в роды, роды - в семейства (-aceae), семейства - в порядки (-ales), порядки - в классы (-mycetes). К отделу Мусота, или Fungi, т. е. к грибам, относятся истинные слизевики (миксомицеты), низшие грибы (фикомицеты) и, наконец, высшие грибы (собственно грибы, или зумицеты).

Полный обзор таксономии, морфологии и физиологии грибов читатель может найти в ряде руководств (Мюллера и Леффлера, Геймана, Алексопулоса, фон Аркса и др.). К этим руководствам и следует обращаться микологам и микробиологам, особо интересующимся отдельными группами грибов. Здесь мы можем рассмотреть лишь немногих представителей различных групп - формы, которые либо служат модельными системами при разного рода исследованиях, либо имеют большое практическое значение (табл. 5.1).

5.1 Анразиомицеты (слизевини, имеющие клеточное строение)

В отличие от истинных слизевиков, образующих плазмодий, представителей этого порядка называют также клеточными слизевиками (т. е. имеющими клеточное строение). Еще одно название - «колониальные амёбы» - связано с образованием характерных плодовых тел, состоящих из большого числа объединенных голых амёб. Ввиду внешнего сходства плодовых тел интересно сопоставить циклы развития акразиомицетов и миксомицетов, как это сделано на рис. 5.3.

К *Acrasiomycetes* относится около двух дюжин видов, живущих в почве. Наиболее изучены *Dictyostelium mucoroides* и *D. discoideum*. Эти виды легко выделить из почвы, богатой гумусом. В чистой культуре на агаре или в жидких средах амёбы питаются бактериями (обычно в экспериментах для этой цели служат клетки *Escherichia coli* или *Enterobacter aerogenes*).

Цикл развития (рис. 5.3, А). Основная форма существования акразиомицетов - одноядерные гаплоидные голые амёбы. Эти амёбы передвигаются по питательному агару с помощью псевдоподий, питаются бактериями (путем фагоцитоза) и размножаются. Через короткое время все они скапливаются в определенном месте и образуют агрегационный

Таблица 5.1. Некоторые важные группы грибов

Истинные слизевики (миксомицеты, Мухому- сеты)	Название гриба (фикоми- цеты, Phycomycetes)	Высшие грибы (зумицеты)	Несовершенные грибы (Fungi imperfecti, Deutero- mycetes)
	Сумчатые грибы (аскоми- цеты, Ascomycetes)	Базидиомицеты (Basidio- mycetes)	
<i>Fuligo septica</i>	Протоаскомицеты Endomycetaceae	Гетеробазидиомицеты Tremellales	<i>Aspergillus</i>
<i>Lycogala epidendron</i>	Saccharomycetaceae	Uredinales	<i>Penicillium</i>
<i>Cribraria rufa</i>	Эуаскомицеты	Ustilaginales	<i>Phoma</i>
<i>Physarum</i>	Плектомицеты (грибы, образующие клейстотеции) <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Гомобазидиомицеты Гименомицеты Polyporaceae Agaricaceae Boletaceae Hydnaceae Clavariaceae Corticaceae	<i>Momilia</i> <i>Candida</i> <i>Alternaria</i>
Слизевик, имеющее клеточное строение (Acrasiomycetes) <i>Dictyostelium</i>	Пиреномицеты (гри- бы, образующие пе- рициции) <i>Sordaria</i> <i>Neurospora</i> <i>Xylaria</i> <i>Nectria</i> , <i>Claviceps</i>	Гастеромицеты Lycoperdales Phallales Nidulariales	
	Дискомицеты (грибы, образующие апоте- ции) <i>Rhizisma</i> , <i>Peziza</i> , <i>Helvella</i> , <i>Morchella</i> , <i>Tuber</i>		

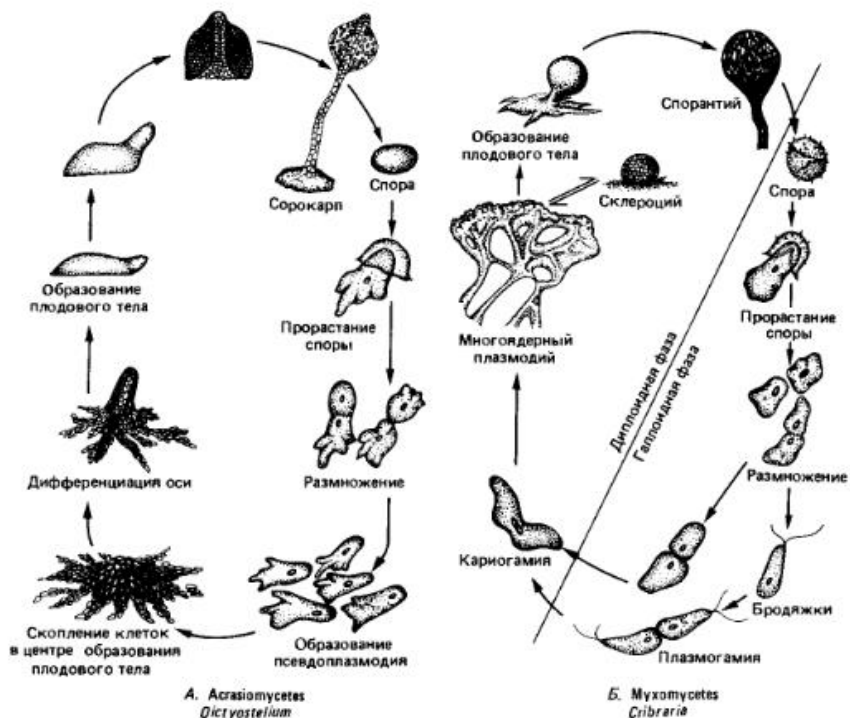


Рис. 5.3. Циклы развития акразиомицетов и миксомицетов, образующих плодовые тела. А. Цикл развития клеточного слизевика *Dictyostelium*. Голые одноядерные амебы образуют «рой» (агрегационный плазмодий), из которого затем дифференцируется плодовое тело, расчлененное на ножку и головку. Б. Цикл развития истинного слизевика. Миксаамебы объединяются в многоядерный плазмодий, из которого образуется плодовое тело.

плазмодий. В отличие от многоядерного, но одноклеточного плазмодия миксомицетов такое образование называют псевдоплазмодием. Хотя отдельные амебы сохраняют свою индивидуальность, псевдоплазмодий ведет себя как единое целое. На нем образуется вздутие, из которого дифференцируется ось плодового тела – сорофор. Верхние клетки становятся клетками ножки, которая одевается целлюлозным покровом. Нижние клетки перемещаются к верхушке ножки и образуют здесь круглую головку – сорокарп, а затем превращаются в споры. Эти споры есть не что иное, как инцистированные амебы. При прорастании споры в ее целлюлозной стенке образуется отверстие, через которое выходит наружу амеба. После этого может начаться новый цикл развития.

Стадия вегетативного роста резко отделена от морфогенетической стадии. Псевдоплазмодий образуется при нехватке пищи. Можно задержать агрегацию, время от времени «подкармливая» амеб бактериями.

Цикл развития акразиомицетов – превосходный пример построения целостного комплекса из множества независимых клеток. Этот процесс агрегации и образования плодовых тел, начинающийся как будто «по приказу свыше», по-видимому, обусловлен действием какого-то диффундирующего вещества, уже заранее названного «акразином». У *Dictyostelium discoideum* таким веществом оказался циклический аденозинмонофосфат (аденозин-3',5'-фосфат).

5.2 Миксомицеты (истинные слизевики)

На определенной стадии развития миксомицеты образуют плодовые тела, внешне сходные с плодовыми телами миксобактерий и акразиевых, но значительно больших размеров. Цикл развития миксомицетов представлен на рис. 5.3, Б. Эти грибы поселяются во влажных местах в лесу, на отмерших листьях, древесине, коре деревьев, на старых заборах. Их плодовые тела величиной 0,5–1 см, иногда ярко окрашенные, обычно хорошо заметны. Молодые плодовые тела *Lycogala epidendron* величиной с вишню окрашены в красивый ярко-красный цвет. Более мелкие плодовые тела, сидящие на ножке (например, у *Cribraria rufa*), обращают на себя внимание причудливым строением спорангия. На коре дубов, пнях и других подобных предметах издали бросается в глаза желтая пенная масса плазмодия *Fuligo septica*, иногда размером с ладонь человека.

Цикл развития (рис. 5.3, Б). Споры, вышедшие из плодового тела, прорастают на влажном субстрате и высвобождают снабженных жгутиками «бродяжек», или миксофлагеллят, которые питаются жидкими веществами или поглощают путем фагоцитоза бактерий, дрожжи, споры грибов и т. п. Миксофлагелляты через некоторое время утрачивают жгутики и превращаются в амеб. Это одноядерные клетки; в конце концов они сливаются попарно (плазмोगамия и кариогамия), образуя миксозоиготы. Такие диплоидные амебы либо существуют сами по себе, либо сливаются с другими диплоидными амебами в истинный плазмодий, который в таком случае оказывается многоядерным. При благоприятных условиях питания число ядер в плазмодии увеличивается в результате многократных митотических делений. «Вполне созревший плазмодий... можно сравнить с рекой, которая распадается на множество рукавов, образуя дельту. Дельта – это фронт, медленно продвигающийся вперед» (Jahn). Плазмодиям свойствен отрицательный фототаксис (светобоязнь). На подходящий субстрат плазмодии попадают, привлекаемые каким-либо раздражителем (гидро- и хемотаксис). В механизме передвижения плазмодия, видимо, участвует какой-то белок, сходный с миозином В (для *Physarum polycephalum* это уже доказано).

Из плазмодиев образуются спорангии, или плодовые тела. В физиологическом плане переход к фазе плодоношения сопровождается изменением раздражимости. Плазмодии покидают темные влажные места, где они до того обитали, и выходят на свет. В цитологическом плане

можно отметить редукционное деление (мейоз), за которым следует образование более или менее сложно устроенного спорангия, одетого снаружи твердой оболочкой—перидием; внутри спорангия образуется множество мелких одноядерных спор, окруженных мембраной. Остатки цитоплазмы между спорами образуют сеть или остов, который называют капиллицием (колонкой). После созревания спорангия и разрыва перидия споры выдуваются из спорангия потоком воздуха.

5.3 Фикомицеты (низшие грибы)

К низшим грибам мы относим большую группу грибов, вегетативные тела которых (даже при сильном ветвлении гиф) не имеют перегородок и потому многоядерны. Такой таллом называют ценоцитным. У большинства низших грибов споры образуются в спорангиях. Прimitивные формы, приспособившиеся к жизни в воде, образуют подвижные споры и гаметы. При переходе от водных форм к более совершенным земноводным и наземным подвижные стадии встречаются только изредка.

Хитридиомицеты. Это главным образом водные грибы, хотя некоторые представители хитридиомицетов встречаются и в почве. Все они микроскопически малы. Клеточная стенка у них состоит, по-видимому, в основном из хитина. Многие хитридиомицеты паразитируют на планктонных водорослях и высших водных растениях. Как экономически важного паразита культурных растений следует отметить *Synchytrium endobioticum*—возбудителя рака картофеля. *Rhizophidium pollinis*—хитридиомицет, паразитирующий на пыльце сосны,—является излюбленным демонстрационным объектом.

Оомицеты. Эта группа включает водные и наземные формы, размножающиеся бесполом путем—при помощи зооспор, снабженных двумя жгутиками. *Saprolegnia* и *Leptomitus*, известные под общим названием «водяная плесень», живут в воде. *Pezonosporales* перешли к наземному образу жизни. Это облигатные паразиты, весь цикл их развития проходит в организме высших растений; однако они еще образуют зооспоры. К оомицетам принадлежат некоторые из самых вредоносных патогенов, вызывающих опустошительные эпифитотии, в частности *Phytophthora infestans* (возбудитель фитофтороза картофеля) и *Plasmopara viticola* (возбудитель ложной мучнистой росы винограда).

Широко распространена *Saprolegnia*, легко поддающаяся выделению и культивированию. Методом «приманки» нетрудно получить ее накопительную культуру, если в чашку, заполненную прудовой водой, положить мертвую муху таким образом, чтобы она лежала с распростертыми крыльями (ногами вниз) на поверхности воды. Уже через несколько дней все тельце мухи будет покрыто гифами и спорангиями. Под микроскопом хорошо видно, как образуются спорангии и как выскальзывают из них зооспоры (рис. 5.4).

У *Saprolegnia* и родственных видов интересно такое явление, как двухстадийность образования зооспор—**диплания**. Вышедшие из спорангия

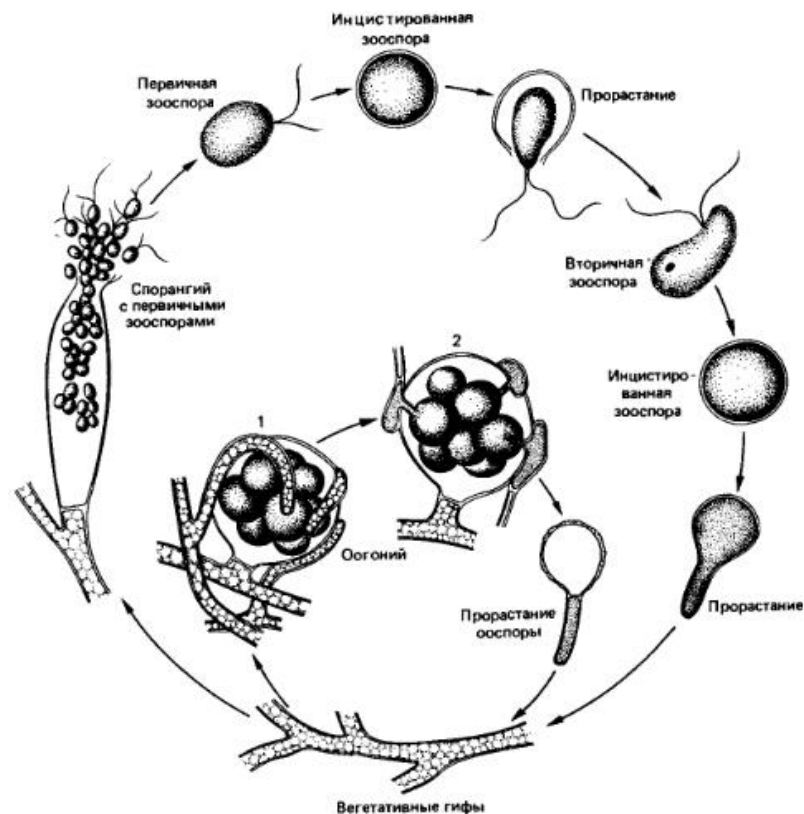


Рис. 5.4. Цикл развития *Saprolegnia* sp. 1—оогоний с шаровидными оосферами и антеридии; 2—то же в поперечном разрезе; видны оплодотворяющие трубки антеридиев, внедрившиеся в оогоний. (Alexopoulos C.J., Einführung in die Mykologie, Stuttgart: Fischer, 1966.)

первичные зооспоры, поплавав некоторое время, останавливаются и превращаются в цисты; из цисты выходит новая зооспора, которая вскоре тоже инцистируется; и только эта циста прорастает, образуя ростовую трубку и гифы.

Половое размножение осуществляется при непосредственном контакте гаметангиев, т.е. антеридии и оогония. Большинство Saprolegniaceae гомоталличны: оогонии и оплодотворяющие их антеридии образуются на одном и том же вегетативном теле. Оогонии имеют шаровидную форму, толстые стенки и содержат несколько яйцеклеток (оосфер). Антеридии меньше по своим размерам и образуются на кончиках гиф. Зрелые антеридии (по одному или по несколько) прикрепляются к оогонию. Их оплодотворяющие трубки проникают к оосферам через стенку

оогония. Когда одно из ядер антеридия достигнет соответствующего ядра яйцеклетки и сольется с ним, образуется диплоидное ядро зиготы. Оплодотворенная оосфера окружается толстой стенкой и превращается в ооспору. После длительного периода покоя ооспоры прорастают; при этом происходит редукционное деление. Цикл завершается образованием нового спорангия.

Зигомицеты. Название «зигомицеты» (от греч. «зигос» – ярмо) связано с особым типом полового размножения, при котором образуются зигоспоры. Ценозигота, или зигоспора, образуется в результате слияния двух гаметангиев (гаметангиогамия), которые в виде мостика («ярма») соединяют две родительские гифы (рис. 5.6). Зигомицеты – наиболее высоко развитая, перешедшая к наземному образу жизни группа фикомицетов. Их подразделяют на три порядка: Mucorales, Entomophthorales и Zoopagales. Мы здесь рассмотрим только первый из них.

Представители порядка Mucorales (муконовые, головчатые плесени) живут на гниющих органических материалах; некоторые из них – копрофилы, т. е. предпочтительным субстратом служит для них навоз. Именно поэтому лошадиный навоз и навозная жижа сыграли в свое время немаловажную роль, послужив субстратом при проведении очень ценных исследований. Такие грибы, как *Mucor tuccedo* (обычная головчатая плесень), *Rhizopus nigricans* (вульгарная хлебная плесень), *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Choanephora cucurbitarum*, *Blakesleea* и ряд других, известны отнюдь не только микологам. В связи с той ролью, которую играют эти грибы в промышленности, ими интересуются также химики и биотехнологи.

В анаэробных условиях грибы растут, как правило, очень плохо и лишь короткое время. В отсутствие молекулярного кислорода они переходят к брожению; многие из них образуют в таких случаях молочную кислоту или этиловый спирт. Изменяется при этом и форма роста: *Mucor racemosus*, например, образует в анаэробных условиях почкующийся мицелий, и его молодые клетки, подобно дрожжам, размножаются почкованием.

Распространение муконовых грибов происходит очень быстро как с помощью многочисленных спорангиоспор, так и благодаря быстрому росту гиф. *Rhizopus stolonifer* (= *R. nigricans*) образует, например, «усы», или столоны, тянущиеся на довольно значительные расстояния (измеряемые сантиметрами).

Для бесполого размножения служат спорангии и спорангиоспоры. Из обильно растущего мицелия поднимаются вертикально боковые ветви – спорангиеносцы. Кончики их отделяются поперечной перегородкой и вздуваются. Происходит расслоение на две зоны – богатую содержимым наружную и бедную содержимым внутреннюю, которые затем разделяются клеточной стенкой. Поперечная перегородка при этом куполообразно изгибается кверху, образуя так называемую колонку (*columella*) – как бы продолжение спорангиеносца внутри спорангия. В периферической зоне спорангия могут находиться сотни или тысячи

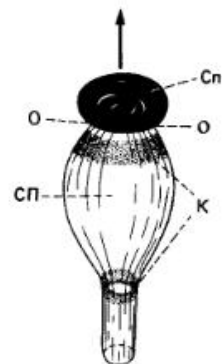
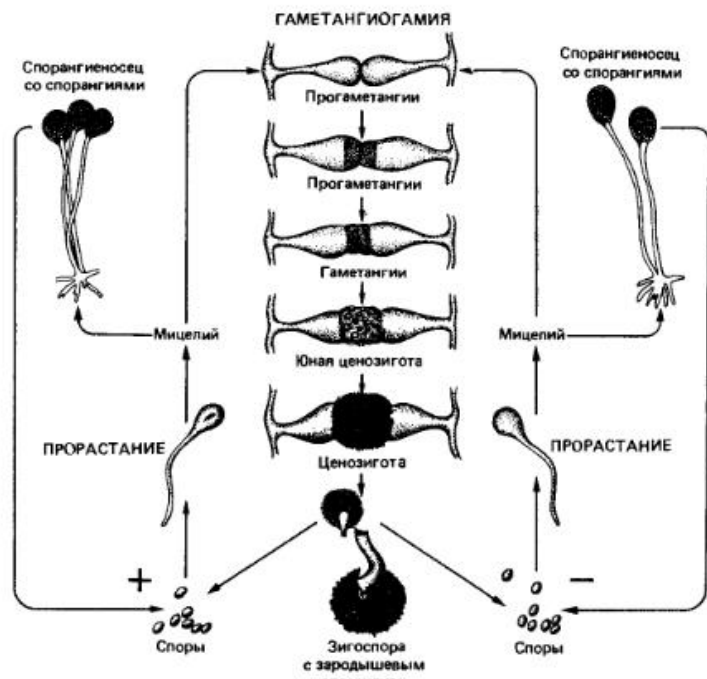


Рис. 5.5. Спорангиеносец фикомицета *Pilobolus*. Стрелкой показано направление, в котором отбрасывается спорангий (Сп) после отрыва от субспорангиального пузыря (СП); О – место отрыва; К – зона цитоплазмы, богатая каротиноидами. (Nultsch W., Allgemeine Botanik, 3 Aufl., Stuttgart: Thieme, 1968.)

ядер, и вокруг каждого из них скапливается некоторое количество цитоплазмы – образуются спорангиоспоры. У некоторых представителей муконовых спорангиеносцы разветвленные, а спорангии мелкие. В таких спорангиях (спорангиолах) содержится по нескольку спор или всего одна спора.

У *Pilobolus* спорангий имеет несколько иную форму (рис. 5.5). У этого гриба несущая гифа под спорангием вздувается, образуя пузырь. На этом вздутии, как круглая крышка, сидит спорангий. За счет впитывания большого количества воды внутреннее давление резко возрастает, так что при созревании спорангиеносец в верхней вздутой части разрывается и спорангий (вместе с колонкой) отбрасывается на высоту до 2 м (отсюда и название *Pilobolus*, что означает «метатель снаряда»). При этом направлении полета спорангия не случайно: спорангиеносец обладает положительным фототропизмом, т. е. растет в сторону источника света, а потому и спорангий летит в том же направлении. *Pilobolus* образует спорангии только на среде, содержащей вытяжку из навоза. Необходимым фактором роста для него является копроген – вещество из группы сидераминов.

Половое размножение и цикл развития муконовых грибов мы рассмотрим на примере *Rhizopus nigricans* (рис. 5.6). Спорангиоспоры у этого вида многоядерные. При благоприятных условиях они прорастают, образуя сильно разветвленный воздушный мицелий. Там, где гифы соприкасаются с субстратом, формируются ризиоиды, которые проникают в субстрат. Непосредственно над этим местом появляются один или несколько спорангиеносцев. У *R. nigricans* половое размножение возможно лишь в тех случаях, когда встречаются два физиологически различных совместимых мицелия, т. е. (+) – штамм и (–) – штамм. При сближении образуются копуляционные ветви, которые, вздуваясь, превращаются в прогаметангии, обогащаются цитоплазмой (число ядер при этом тоже увеличивается) и в конце концов отделяются от несущих гиф поперечными перегородками. В зоне контакта гаметангиев происходит лизис клеточных стенок, и протопласты сливаются (гаметангиогамия). За

Рис. 5.6. Цикл развития *Rhizopus nigricans*.

этим следует попарное соединение (+) и (-) ядер, а потом их слияние. Ценозигота увеличивается в размерах и в конце концов превращается в толстостенную зигоспору. После некоторого периода покоя зигоспора прорастает с образованием зародышевого спорангия; ядра при этом претерпевают редукционное деление. Таким образом, вегетативное тело гриба представляет собой гаплоидную фазу.

Некоторые представители мукоровых гомоталличны и способны к самооплодотворению.

5.4 Аскомицеты (сумчатые грибы)

Аскомицеты вместе с базидиомицетами относятся к высшим грибам (эумицетам). Для последних характерны гифы, разделенные поперечными перегородками, и образование конидиоспор. Клетки со жгутиками у высших грибов не встречаются.

Основной орган спороношения аскомицетов – сумка, или аск (отсюда название этого класса грибов). В аске развиваются **аскоспоры**, и здесь же происходят кариогамия и мейоз. Стадия аска – конечная стадия полового размножения; аск называют также **совершенной** или **главной формой**

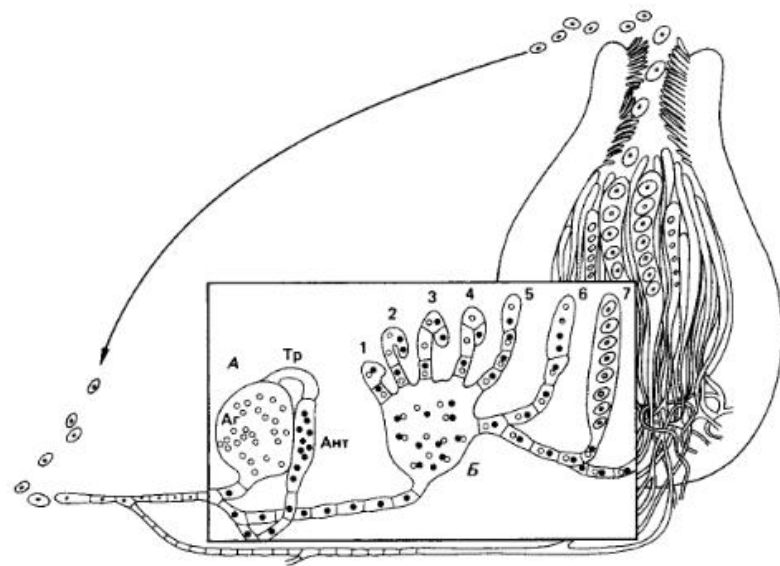


Рис. 5.7. Цикл развития гомоталлического аскомицета. А. Аскогон перед плазмогамией. Б. Аскогон с аскогенными дикариотическими гифами и последовательные стадии образования крючка и асков. 1 – образование крючка; 2 – крючок после деления парных ядер; 3 – образование поперечной перегородки в клетке крючка; 4 – кариогамия в материнской клетке аска и слияние клетки крючка с клеткой ножки; 5, 6 и 7 – деление первичного ядра аска и образование восьми аскоспор. *Ag* – аскогон; *Ant* – антеридий; *Tr* – трихогина.

мой плоношения. Многие аскомицеты размножаются бесполом способом с помощью конидий. Эту форму плоношения называют **несовершенной**. Существует много видов грибов, у которых известна только несовершенная стадия – образование конидий. Их называют несовершенными грибами или дейтеромицетами.

Цикл развития (рис. 5.7). Выходящая из аскоспоры ростовая трубка дает начало мицелию. У многих форм на мицелии появляются конидиеносцы. Многочисленные конидии, прорастая, образуют мицелии, сходные с теми, которые развиваются из аскоспор. На том же самом мицелии, где формируются конидии, позднее появляются аски. **Фаза полового размножения** начинается с образования аскогонов. В типичном случае аскогон несет особую трубочку – трихогину, в которую попадают мужские ядра. Эти ядра через трихогину переходят из антеридиев в аскогон (плазмогамия), где происходит спаривание ядер, но еще не слияние. Затем из аскогона вырастают так называемые аскогенные гифы, клетки которых содержат по одному мужскому и одному женскому ядру (дикариотические гифы). Эти ядра одновременно делятся. Слиянию ядер дикариона предшествует специальное деление клетки с образованием **крючка**: кончик гифы крючкообразно искривляется, происхо-

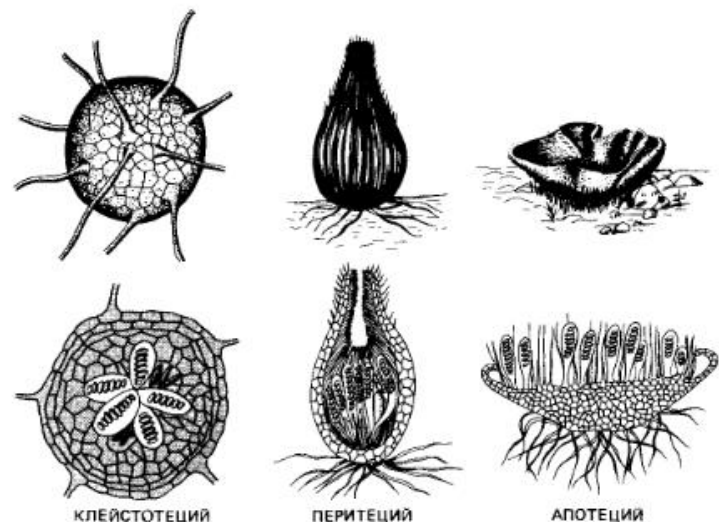


Рис. 5.8. Внешний вид и поперечные разрезы плодовых тел, характерных для плектомицетов (клеистотеции), пиреномицетов (перитеции) и дискомицетов (апотеции).

дит сопряженное деление обоих ядер и верхняя пара дочерних ядер отделяется поперечными перегородками как от клетки, лежащей ниже изгиба, так и от крючка. Крючок сливается с клеткой, находящейся ниже изгиба, и в результате снова образуется клетка с двумя ядрами. Верхняя клетка в дальнейшем становится аском. В ней происходит слияние обоих ядер. Образовавшееся первичное ядро аска (диплоидное) претерпевает три деления, одно из которых – мейотическое; в результате получается восемь дочерних ядер и в конечном счете – восемь аскоспор. Число делений может быть меньшим (в этом случае образуются 4 споры) или большим (число спор иногда превышает 1000). Таким образом, и аскоспоры, и мицелии гаплоидны.

Плодовые тела. Образование асков обычно происходит в плодовых телах, или аскокарпах (впрочем, есть и исключения). Аскокарпы – это вместилища, где созревают половые органы гриба. Сплетение гиф придает плодovому телу характерный вид. Различают три формы плодовых тел (рис. 5.8): 1) совершенно замкнутые плодовые тела, или **клеистотеции**, характерные для плектомицетов; 2) бутылковидные плодовые тела – **перитеции**, типичные для пиреномицетов; и наконец, 3) открытые чашеобразные плодовые тела – **апотеции**, типичные для дискомицетов. Кроме того, существуют грибы с голыми асками (протоаскомицеты). У трюфелей (*Tuberales*) аскокарпы остаются закрытыми.

Дрожжи. К протоаскомицетам относятся дрожжи, или почкующиеся грибы. Для дрожжей в широком смысле слова типичным способом бес-

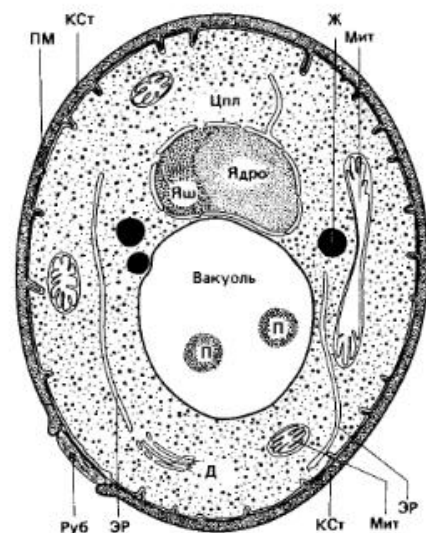


Рис. 5.9. Схематический поперечный разрез дрожжевой клетки. Д – диктиосома; Ж – жировая капля; КСт – клеточная стенка; Мит – митохондрия; П – гранулы полифосфата; ПМ – плазматическая мембрана; Руб – рубец, оставшийся в том месте, где отпочковалась дочерняя клетка; Цпл – цитоплазма, содержащая рибосомы; ЭР – эндоплазматический ретикулум; Яш – ядрышко.

полого размножения является почкование (см. рис. 5.2); бинарное деление наблюдается редко. Клетки, получающиеся в результате почкования, могут оставаться соединенными, образуя псевдомицелий; в других случаях они расходятся. Аскоспоры образуются в голом аске, развившемся из зиготы или из одной вегетативной клетки.

Представители семейства *Endomycetaceae* размножаются почкованием, но образуют также и мицелий. У *Endomycopsis* наряду с гифами встречаются почкующиеся клетки и аски с аскоспорами. У *Endomyces lactis* (= *Geotrichum candidum* = *Oospora lactis*) гифы распадаются на артроспоры, т.е. на отдельные самостоятельные клетки.

У *Saccharomycetaceae*, или собственно дрожжей (рис. 5.9 и 5.10), мицелий отсутствует. Пекарские и пивные дрожжи представляют собой физиологические расы *Saccharomyces cerevisiae*. Гаплоидные почкующиеся клетки дрожжей могут сливаться (копулировать). За кариогамией может сразу же следовать редукционное деление (мейоз) и образование четырех аскоспор. Однако диплоидные клетки тоже способны размножаться почкованием; они крупнее и физиологически активнее гаплоидных. В промышленности используют преимущественно диплоидные и полиплоидные расы. Лишь в неблагоприятных условиях (например, на среде с ацетатом) диплоидная клетка превращается в аск.

Еще более упрощенными формами следует считать аспорогенные

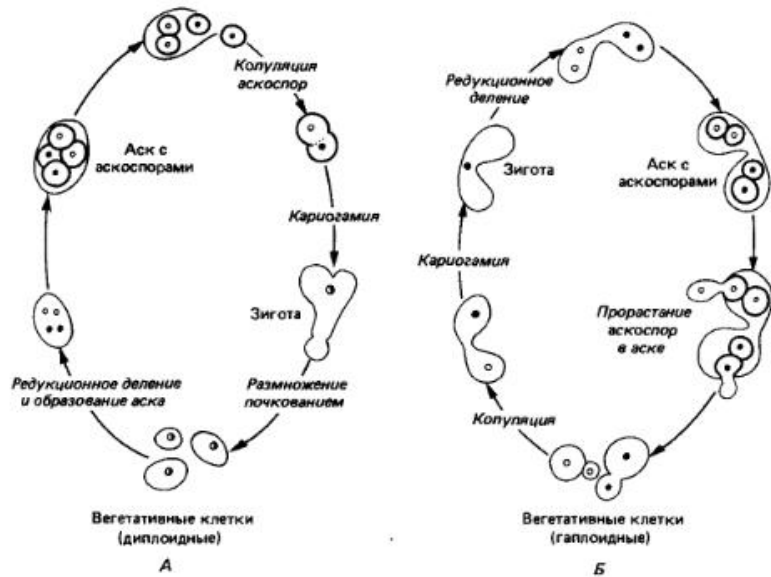


Рис. 5.10. Циклы развития дрожжей. А. *Saccharomyces cerevisiae* (преимущественно диплоидный вид); копуляция происходит непосредственно после образования аскоспор. Б. *Zygosaccharomyces* (гаплоидные дрожжи); копулируют гаплоидные вегетативные клетки, а диплоидная фаза ограничивается зиготой.

дрожжи. Только некоторые из них образуют мицелий; большинство размножается исключительно почкованием. К аспорогенным дрожжам относятся роды *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pullularia* и ряд других (рис. 5.11).

Дрожжи встречаются в природе всюду, где есть поддающиеся сбраживанию сахаристые соки: в нектаре цветков, на фруктах, на листьях.

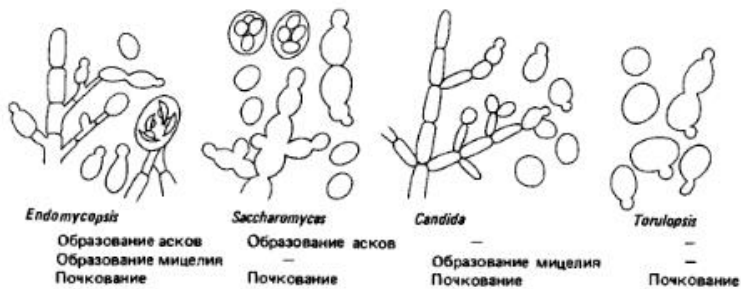
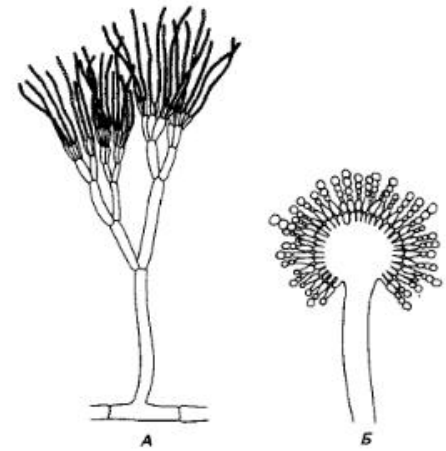


Рис. 5.11. Дрожжи различаются по способности к образованию асков, образованию мицелия и почкованию.

Рис. 5.12. Формы спороношения у плектомицетов — *Penicillium* (А) и *Aspergillus* (Б). (Nultsch W., Allgemeine Botanik, 3 Aufl., Stuttgart: Thieme, 1968.)



Pullularia pullulans принадлежит к группе дрожжей, вызывающих образование черного налета на листьях, покрытых медвяной росой.

Плектомицеты. Плектомицеты — грибы, образующие клейстотеции. К ним относятся такие важные роды, как *Aspergillus* (леечная плесень) и *Penicillium* (кистевидная плесень), отличающиеся друг от друга конидиальной стадией (рис. 5.12). О них мы еще не раз будем говорить в связи с различными физиологическими вопросами. Сильно разветвленный многоядерный мицелий плектомицетов усеян многочисленными конидиеносцами. При развитии конидиеносца одна из клеток мицелия образует вырост, превращающийся в вертикальную гифу. У *Aspergillus* такая гифа заканчивается пузырьком, на поверхности которого вырастают стеригмы. На стеригмах образуются конидии, располагающиеся как бусы на нитке. Конидии окрашены (они могут быть черными, коричневыми, желтыми, зелеными и т. д.) и придают характерную окраску всей колонии гриба.

Многие представители родов *Aspergillus* и *Penicillium* вызывают порчу фруктов (при хранении), брезента, кожи и тому подобных материалов. *Penicillium roqueforti* и *P. camemberti* (теперь их заменяют быстрее растущим *P. caseicolum*) придают сырам «рокфор» и «камамбер» их специфический вкус. *P. notatum* и *P. chrysogenum* широко известны как продуценты пенициллина.

Пиреномицеты. Плодовые тела у этих грибов — перитеции. В типичных случаях перитеций имеет собственную (истинную) стенку. Аски, сидящие на дне этого бутылковидного образования или на стенках его нижней части, чередуются с особыми нитевидными выростами — парафизами. Канал шейки перитеция выстлан перифизами (см. рис. 5.7 и 5.8).

К пиреномицетам принадлежит много вредоносных грибов, в том числе облигатные паразиты — возбудители настоящей мучнистой росы (*Erysiphe*, *Uncinula necator*, *Sphaerotheca mors-uvae* и др.), а также сапро-



Рис. 5.13. Цикл развития возбудителя спорыньи *Claviceps purpurea*.

фитные виды *Chaetomium* и виды *Neurospora*, известные как объекты генетических исследований. *Sordaria fimicola* и некоторые другие виды – копрофилы. На пнях растут виды *Xylaria* и *Hypoxylon* с черными конидиями, *Nectaria galligena* и *N. cinnabarina* вызывают рак древесных пород. *Claviceps purpurea* – возбудитель спорыньи (*secale cornutum*) ржи; другие виды *Claviceps* тоже поражают различные злаки.

Цикл развития пиреномицетов. Этот цикл мы рассмотрим на примере *Claviceps purpurea* – спорыньи ржи (рис. 5.13). Аскоспоры заражают во время цветения завязь ржи. Мицелий разрастается в завязи и превращает ее в мягкую белую массу с желобками на поверхности. В этих желобках на тесно прижатых друг к другу кончиках гиф образуется много мелких гиалиновых (бесцветных) конидий. Конидии, взвешенные в сладком соке (медвяной росе), разносятся насекомыми. Вскоре все это образование высыхает и пронизанная гифами завязь превращается в твердый, как рог, склеротий. Ко времени созревания злака склеротии («маточные рожки») отпадают и перезимовывают в почве. После периода покоя в условиях холода склеротии весной, при достаточной влажности и благоприятной температуре, прорастают, образуя сидящие на ножках головки (головчатые стромы), в периферических слоях которых находятся перитеции. В каждом аске *Claviceps purpurea* содержится восемь нитевидных аскоспор.

Склеротии содержат сильнодействующие алкалоиды (производные лизергиновой кислоты – эргобазины, эрготоксины, эрготамины), применяемые в качестве лечебных средств. Для получения этих веществ рожь искусственно заражают спорыньей. Можно также получать глубинную культуру одного из видов спорыньи (*Claviceps paspali*).

Дискомицеты. Дискомицеты образуют апотеции. К этой группе принадлежат некоторые из более или менее известных лесных грибов, например пецица (*Peziza*), сморчки (*Morchella*, *Helvella*) и трюфели

(*Tuber*), а также и вредные грибы, такие как *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotium*, *Rhytisma acerinum* и *Lophoderma* (мы назвали лишь некоторые). Апотеции – открытые плодовые тела, по форме напоминающие блюдце. У некоторых лесных грибов они ярко-красные, желтые или оранжевые, у других – черные или коричневые. На выжженной почве растет *Pyronema omphalodes* (*P. confluens*) – излюбленный объект, на котором обычно демонстрируют образование асков.

5.5 Базидиомицеты

Базидиомицеты считаются наиболее высокоразвитой группой грибов. Характерный для них орган спороношения – **базидия** – по своему расположению (это клетка на конце гифы) соответствует аску. От базидии отшнуровываются, как правило, четыре одноядерные гаплоидные **базидиоспоры**. Подобно аскоспорам, они образуются в результате плазмогамии, кариогамии и мейоза. Два последних процесса протекают соответственно в аске или в базидии.

Мицелий состоит из гиф с поперечными перегородками. Белые нити, которые заметны невооруженному глазу в лесной подстилке, – это пучки гиф, окруженные «корой»; их называют ризоморфами.

Цикл развития гименомицетов. Из проросшей базидиоспоры образуется первичный мицелий, состоящий из гиф, разделенных перегородками на одноядерные клетки. Вторичный, **дикариотический**, мицелий возникает в тех случаях, когда встречаются гифы двух совместимых штаммов и их одноядерные протопласты сливаются (плазмогамия). При каждом клеточном делении происходит сопряженное деление обоих ядер. У многих базидиомицетов деление клеток и ядер сопровождается образованием так называемой **пряжки** (рис. 5.14). Такой механизм обеспечивает получение новой клеткой по одному дочернему ядру каждого типа. У клетки, готовой к делению, между ядрами *a* и *b* образуется нечто вроде крючка, который загибается назад; переднее ядро *b* переходит в этот «крючок» (пряжку), после чего оба ядра делятся. Затем передняя часть клетки, содержащая дочерние ядра *a* и *b*, отделяется от задней части поперечной перегородкой. Одновременно пряжка сливается с исходной клеткой, в которую при этом возвращается ядро *b*. Передняя клетка отделена перегородкой также и от пряжки. В результате обе клетки получают по одному ядру типа *a* и одному ядру типа *b*.

На дикариотическом мицелии вырастают в типичных случаях сложные плодовые тела. Это хорошо известные шляпочные грибы, трутовики и т.п. Образование базидий происходит в специальном слое такого плодового тела – так называемом **гимении**, который состоит из базидий и стерильных гиф (парафиз и цистид). Базидия образуется в результате увеличения концевой клетки; два ядра этой клетки сливаются (кариогамия). Затем ядро зиготы претерпевает редукционное деление с образованием четырех гаплоидных ядер. Одновременно формируются четыре стеригмы с зачатками базидиоспор, в которые проникают ядра.

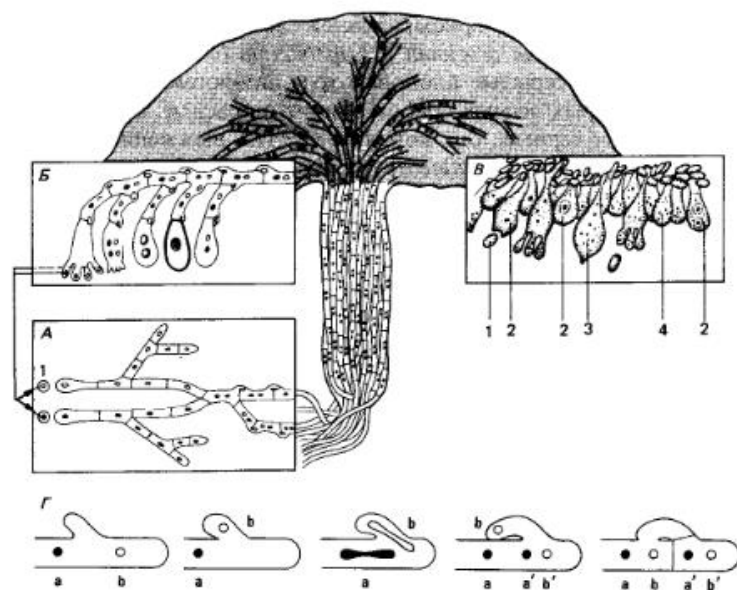


Рис. 5.14. Цикл развития шляпочного гриба. В рамках—гифы и базидии при большем увеличении. А. Развитие септированных гиф из базидиоспор (1) и плазмогамия с последующим образованием прядки. Б. Образование базидий и последовательные стадии образования базидиоспор. В. Продольный срез через гимений с базидиоспорами (1), базидиями (2), цистидиями (3) и парафизами (4). Г. Процесс образования прядки (объяснение в тексте).

Базидиоспоры активно выбрасываются плодовым телом. При массовом скоплении базидиоспор можно заметить, что они пигментированы. Их окраска—коричневая, фиолетовая, черная, цвета охры и т.д.—служит важным диагностическим признаком.

Описанный выше цикл развития (с некоторыми модификациями) типичен для гомобазидиомицетов. Для них характерно наличие именно таких базидий. По расположению гимения различают гименомицеты и гастеромицеты. К гименомицетам относятся шляпочные грибы (пластинчатые, трубчатые, игольчатые и т.д.), трутовики и кораллоподобные формы. У гастеромицетов (дождевики, *Geaster*, *Phyllaceae* и др.) плодовое тело не открывается и гимений не обнажается. Базидиоспоры освобождаются только после распада гимения.

К гетеробазидиомицетам относятся дрожалковые (Tremellales), ржавчинные (Uredinales) и головневые (Ustilaginales) грибы. По своему строению их базидии отличаются от базидий гомобазидиомицетов. У некоторых групп пробазидия окружена твердой стенкой и ведет себя как покоящаяся спора. К сожалению, мы не можем здесь углубиться в такие интересные подробности, как различные модификации базидий, приспособ-

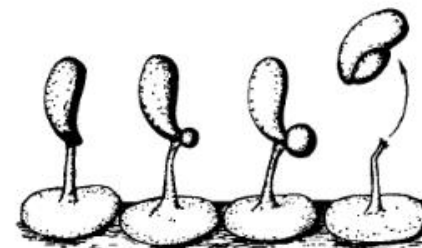


Рис. 5.15. Образование спор у гриба *Sporobolomyces*. Спора отстреливается в результате выделения и перемещения капельки воды.

ленные к условиям среды, к вегетативному циклу растений-хозяев и т.п. Упомянем, однако, еще об одном небольшом семействе грибов, сходном с дрожжами,—о *Sporobolomycetaceae*. Эти грибы образуют активно отбрасываемые конидии, сидящие на стеригмах; такие конидии называют баллистоспорами. *Sporobolomyces salmonicolor*, подобно дрожжам, размножается почкованием. Каждая его клетка может образовать стеригму, на которой появляется спора, по форме напоминающая почку. При созревании у нижнего конца споры, в месте ее прикрепления, выделяется капелька воды, и спора подбрасывается на высоту около 0,1 мм (рис. 5.15). Видимо, при помощи такого механизма происходит выбрасывание базидиоспор у большинства форм со свободно сидящими базидиями (гименомицетов).

5.6 Несовершенные грибы (дейтеромицеты)

К этому классу причисляют грибы, у которых половой (совершенной) стадии нет или она еще не обнаружена. Конидиальная же стадия у этих грибов очень сходна с той, которая характерна для хорошо изученных аскомицетов. Это позволяет думать, что несовершенные грибы есть не что иное, как конидиальная стадия тех аскомицетов, у которых стадия асков еще не обнаружена или же утрачена в процессе эволюции.

Нельзя, однако, говорить о полном отсутствии полового процесса у несовершенных грибов. У них, так же как у базидиомицетов или у других аскомицетов, доказано наличие парасексуального процесса. Плазмогамия, кариогамия и мейоз имеют место и у них, но не в определенных участках вегетативного тела и не на определенных стадиях развития. В норме первичный мицелий несовершенных грибов бывает гомокариотическим, т.е. содержит ядра только одного типа. В результате объединения протопластов, содержащих ядра разного типа, возникают гетерокарионы. Введенное в мицелий чужое ядро размножается, и образовавшиеся дочерние ядра распространяются по мицелию. Время от времени происходят кариогамия и мейоз. Таким образом, парасексуальный цикл обеспечивает примерно столь же эффективную рекомбинацию ядерного материала, как и истинный половой процесс.

Классификация несовершенных грибов основана на формах споронения и других внешних признаках и служит только практическим целям (для номенклатуры и определения).

6.1 Питание микроорганизмов

Для роста микроорганизмов необходима вода. Питательные вещества—это растворенные в воде соединения, из которых микроорганизмы строят свои клетки и получают энергию. Требования, предъявляемые различными микроорганизмами в отношении состава питательной среды и прочих условий, весьма разнообразны. В связи с этим было предложено очень много рекомендаций по составлению питательных сред для различных микроорганизмов. В принципе питательные среды должны отвечать следующим минимальным требованиям: в них должны присутствовать все элементы, из которых строится клетка, в такой форме, в которой микроорганизмы способны их усваивать.

Потребность в химических элементах. По количественному вкладу в построение клетки различают макро- и микроэлементы. К первым относятся десять элементов, содержащихся во всех организмах: углерод, кислород, водород, азот, сера, фосфор, калий, кальций, магний и железо (С, О, Н, N, S, P, K, Ca, Mg, Fe). Микроэлементы, или следовые элементы,—это марганец, молибден, цинк, медь, кобальт, никель, ванадий, бор, хлор, натрий, селен, кремний, вольфрам и другие, в которых нуждаются не все организмы. Большинство из этих микроэлементов, необходимых лишь в следовых количествах, содержатся в качестве примесей в солях макроэлементов, а также попадают в питательную среду из стекла лабораторной посуды и с пылью. Поэтому для выявления потребности в некоторых микроэлементах нужны особые методы.

Большинство элементов вносят в питательную среду в виде солей. Состав простой синтетической среды приведен в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Пример простой синтетической среды

K_2HPO_4	0,5 г
NH_4Cl	1,0 г
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 г
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01 г
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 г
Глюкоза	10,0 г
Вода	1000 мл
Раствор с микроэлементами	1 мл

Источники углерода и энергии. Организмы, получающие энергию с помощью фотосинтеза или путем окисления неорганических соединений, способны в большинстве своем использовать CO_2 в качестве главного источника углерода. Эти С-автотрофные организмы восстанавливают CO_2 . Все остальные организмы получают клеточный углерод главным образом из органических веществ. Последние, как правило, служат источниками как энергии, так и углерода; частично они ассимилируются для построения клеток, частично окисляются для получения энергии. Из природных органических соединений на Земле количественно преобладают полисахариды—целлюлоза и крахмал. Структурные элементы этих полимерных соединений—молекулы глюкозы—могут использоваться очень многими микроорганизмами. Микроорганизмы, однако, способны использовать и все другие органические соединения, образующиеся естественным путем.

Добавочные вещества. Помимо элементов минерального питания и источников углерода и энергии многие организмы нуждаются еще в некоторых дополнительных веществах, называемых факторами роста. Эти вещества входят в основной состав клетки, но некоторые организмы не способны их синтезировать сами. Такие факторы роста относятся к трем группам соединений—к аминокислотам, пуринам и пиримидинам, а также к витаминам. Аминокислоты, пурины и пиримидины—составные части белков и нуклеиновых кислот, поэтому клетка нуждается в достаточных количествах этих соединений. Витамины же входят в состав коферментов или простетических групп и, таким образом, участвуют в каталитических функциях; поэтому они необходимы только в очень малых количествах (табл. 6.2). Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют ауксотрофными и противопоставляют прототрофным организмам, которым такие факторы не нужны.

Сера и азот. Оба элемента содержатся в клетке главным образом в восстановленной форме—в виде сульфгидрильных групп или соответственно аминогрупп. Большинство микроорганизмов способно поглощать эти элементы в их окисленной форме, в виде сульфата и нитрата,

Таблица 6.2. Раствор витаминов, пригодный для почвенных и водных бактерий

Биотин	0,2 мг
Никотиновая кислота	2,0 мг
Тиамин	1,0 мг
4-Аминобензоат	1,0 мг
Пантотенат	0,5 мг
Пиридоксамин	5,0 мг
Цианкобаламин	2,0 мг
Дистиллированная вода	100 мл
2–3 мл раствора витаминов добавляют к 1000 мл питательной среды	

которые они могут восстанавливать. Наиболее обычный источник азота для микроорганизмов—соли аммония. Некоторые прокариоты способны восстанавливать молекулярный азот (N_2); другие в качестве источника азота нуждаются в аминокислотах, в которых азот содержится уже в связанном виде. Не все микроорганизмы могут также восстанавливать сульфат; некоторым в качестве источника серы нужен сероводород или цистеин.

Кислород. Кислород входит в состав воды и вместе с ней поступает в распоряжение клеток. Кроме того, он содержится в CO_2 и многих органических соединениях. Многим организмам помимо этого необходим молекулярный кислород (O_2). Главная функция O_2 состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании; O_2 при этом восстанавливается до воды. В веществе клетки атомы кислорода, происходящие из O_2 , включаются только в том случае, если источниками углерода служат метан, углеводороды с длинной цепью или ароматические углеводороды.

По отношению к молекулярному кислороду можно выделить по меньшей мере три группы организмов. **Облигатные аэробы** способны получать энергию только путем дыхания и поэтому нуждаются в O_2 . **Облигатные анаэробы** могут расти только в среде, лишенной кислорода; O_2 для них токсичен (см. в конце раздела 7.4). **Факультативные анаэробы** растут как в присутствии, так и в отсутствие O_2 . Среди них следует различать два типа: **аэротолерантные** молочнокислые бактерии могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не способны его использовать—они получают энергию исключительно с помощью брожения; другие факультативно-анаэробные бактерии (*Enterobacteriaceae*) и многие дрожжи могут переключаться с дыхания (в присутствии O_2) на брожение (в отсутствие O_2).

Многие аэробные бактерии (если не большинство их)—**микроаэрофилы**, т. е. они хотя и нуждаются в кислороде для получения энергии, однако не переносят того парциального давления O_2 , которое существует в воздухе (0,20 бар),—им нужно от 0,01 до 0,03 бар.

6.2 Питательные среды и условия роста

Очень многие нетребовательные микроорганизмы, например большинство псевдомонад, живущих в почве и воде, а также *Escherichia coli*, хорошо растут на среде, примерный состав которой приведен в табл. 6.1. Многим микроорганизмам, однако, сверх того нужны еще какие-то из перечисленных выше микроэлементов, витаминов или других добавок. Если питательный раствор составлен из определенных химических соединений, то говорят о **синтетической** среде. Исследователи стремятся определить для каждого микроорганизма минимальные потребности в питательных веществах и составить минимальную среду, содержащую лишь те ингредиенты, которые необходимы для роста. Более требова-

тельные виды нуждаются в большом числе добавочных веществ. Для *Leuconostoc mesenteroides* была составлена синтетическая среда, содержащая более 40 компонентов.

Сложные среды. У многих особенно требовательных микроорганизмов потребности в питательных веществах изучены пока недостаточно. Их культивируют на средах, содержащих дрожжевой экстракт, дрожжевой автолизат, пептон или мясной экстракт. Для выращивания ряда групп организмов используют также пивное сусло, сенной отвар, сливовый или морковный сок, кокосовое молоко, а для копрофильных грибов—даже выжимку из конского навоза. Для уменьшения стоимости к питательным растворам часто добавляют вместо чистых соединений весьма сложные смеси, такие как молочная сыворотка, патока, кукурузный настой или экстракт из соевых бобов—дешевые отходы различных производств. Такого рода питательные среды называют сложными.

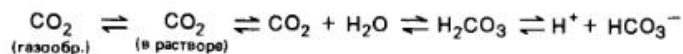
Твердые среды. Для приготовления твердых сред к жидким питательным растворам добавляют особые вещества, которые придают им желеобразную консистенцию. Желатину применяют для этой цели лишь в отдельных случаях, так как она имеет слишком низкую точку плавления (26–30°C) и, кроме того, разжижается многими микроорганизмами. Почти идеальным средством для получения твердых сред служит агар, который Гессе, сотрудник Р. Коха, ввел в бактериологическую практику в 1883 г. Агар—полисахарид сложного состава из морских водорослей, в сильной степени поперечносшитый. Его добавляют к водным растворам в концентрации 15–20 г/л. Плавится агар только при 100°C, но при охлаждении остается жидким вплоть до 45°C. Разлагать его способны лишь немногие бактерии. В тех случаях, когда требуются твердые среды, не содержащие органических компонентов, применяют силикагель.

Концентрация ионов водорода. Ионы H^+ и OH^- —наиболее подвижные из всех ионов, поэтому уже малейшие изменения их концентрации оказывают на микроорганизмы сильное влияние. В связи с этим установление и поддержание заданной оптимальной величины pH имеет существенное значение для роста.

Большинство организмов лучше всего растет, когда концентрации ионов H^+ и OH^- примерно одинаковы (pH 7). Многие бактерии, например нитрифицирующие и клубеньковые бактерии, актиномицеты, бактерии, разлагающие мочевины, предпочитают более высокие значения pH, т. е. слегка щелочные среды. Лишь немногие толерантны к кислой среде (лактобациллы, *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi*) или даже ацидофильны (например, некоторые виды *Thiobacillus*). Грибы предпочитают низкие значения pH. Если сложные питательные среды с различным pH инокулировать почвой, то при pH 5,0 развиваются главным образом грибы, а при pH 8,0—бактерии.

Поддержание определенного pH во время роста важно прежде всего для тех микроорганизмов, которые хотя и продуцируют кислоты, но не

обладают к ним толерантностью (лактобациллы, Enterobacteriaceae, многие псевдомонады). Для того чтобы предотвратить гибель бактерий от ими же выделяемых кислот, используют либо несбраживаемые вещества (при длительном культивировании), либо забуференные среды. Определенное буферное действие (хотя и слабое при pH больше 7,2) оказывают неорганические фосфаты. При более сильном выделении кислот рекомендуется добавлять карбонат кальция или, если присутствие нерастворимых компонентов в среде нежелательно, бикарбонат натрия. В последнем случае нужно помнить о том, что ионы бикарбоната находятся в равновесии с двуокисью углерода, растворенной в воде, а следовательно, и с CO_2 в газовой фазе (например, в воздухе):



Соотношение между pH, концентрацией бикарбоната и парциальным давлением CO_2 в газовой фазе выражается уравнением Хендерсона–Хассельбальха; концентрация угольной кислоты равна произведению парциального давления CO_2 на коэффициент растворимости α :

$$\text{pH} = \text{pK}' + \lg \frac{c(\text{HCO}_3^-)}{p(\text{CO}_2)\alpha}$$

Впрочем, многие бактерии сравнительно мало чувствительны к колебаниям pH в пределах от 6 до 9. Правда, при быстрых изменениях возможен кратковременный небольшой сдвиг внутриклеточного pH, однако уже через 30 мин прежнее значение pH восстанавливается.

Происходящие при неблагоприятных значениях pH нарушения не связаны с прямым действием ионов H^+ и OH^- . Последние лишь снижают степень диссоциации слабых кислот и оснований, которые в незаряженном состоянии значительно легче проникают в клетки, чем продукты их диссоциации. Физиологически активны всегда именно недиссоциированные кислоты. Двухосновная янтарная кислота или трехосновная лимонная тем скорее проникает в клетку, чем ниже pH среды.

Двуокись углерода. К питательному раствору, предназначенному для выращивания автотрофных фиксирующих CO_2 микроорганизмов, обычно добавляют бикарбонат натрия и инкубируют культуры в закрытых сосудах в атмосфере, содержащей CO_2 . Можно также продувать обычный или обогащенный CO_2 воздух. Во всех случаях нужно учитывать указанную выше зависимость между pH, концентрацией бикарбоната в среде и парциальным давлением CO_2 в газовой фазе.

Однако и гетеротрофные (т.е. требующие органических источников углерода) микроорганизмы обычно нуждаются в CO_2 . Многие паразитические бактерии, живущие в крови, тканях или кишечнике, приспособлены к более высокому, чем в воздухе, содержанию CO_2 . Эти бактерии культивируют поэтому в смеси газов или в воздухе, обогащенном CO_2

до 10 об. %. Кроме того, следует учитывать, что удаление двуокиси углерода, например поглощение ее гидроксидом калия, тормозит рост почти всех бактерий (см. разд. 11.5).

Содержание воды и осмотическое давление. Микроорганизмы существенно различаются по своей потребности в воде. Чтобы иметь возможность сравнивать водные растворы и твердые материалы по содержанию в них доступной воды, пользуются такими параметрами, как активность воды (a_w) или относительная влажность. Эти параметры относятся к фазе пара, находящегося в равновесии с твердым материалом или с раствором. Это отношение концентрации воды в фазе пара в воздушном пространстве над данным материалом к концентрации воды в воздухе над чистой водой при определенной температуре.

Микроорганизмы способны расти при активности воды от 0,998 до 0,6. В этом отношении наименьшие потребности у осмолотерантных дрожжей *Saccharomyces rouxii*, которые растут при $a_w = 0,6\%$. Для *Aspergillus glaucus* и других грибов нужны величины a_w не ниже 0,8, а для большинства бактерий – выше 0,98. Исключение составляют только галофильные бактерии, которым достаточна активность воды 0,75.

Температура. К температуре различные микроорганизмы относятся по-разному. Большинство почвенных и водных бактерий мезофильны; температурный оптимум для их роста лежит в пределах от 20 до 42°C. Термотолерантными являются организмы, продолжающие расти и при 50°C (как, например, *Methylococcus capsulatus*). Термофильные бактерии быстрее всего растут при температурах выше 40°C, а верхний предел для них 70°C (*Thermoactinomyces vulgaris*, *Bacillus stearothermophilus*). Крайне термофильными организмами называют те, у которых оптимум для роста выше 65°C (*Thermus aquaticus*, *Sulfolobus*). Некоторые из них способны расти даже при температурах более 70°C (отдельные виды *Bacillus* и *Clostridium*), более 80°C (*Sulfolobus acidocaldarius*) или даже при 105°C (*Pyrodictium occultum* – строгий анаэроб, восстанавливающий серу). На другом конце температурной шкалы находятся психрофильные (или криофильные) организмы; это прежде всего некоторые морские светящиеся бактерии и железобактерии (*Gallionella*); максимальной скорости их рост достигает при температурах ниже 20°C.

Аэрация. Всем облигатным аэробам в качестве акцептора электронов необходим молекулярный кислород. Для бактерий, растущих на агаре или в тонких слоях жидкости в присутствии воздуха, кислорода обычно вполне достаточно. В жидких средах при большом объеме жидкости аэробные бактерии могут расти только на поверхности, так как в более глубоких слоях по мере удаления от поверхности условия приближаются к анаэробным. Для нормального роста аэробных микроорганизмов в глубоких слоях жидкой культуры требуется аэрация. Микроорганизмы способны использовать только растворенный кислород. В то время как минеральные соли и органические вещества можно добавлять к среде в концентрациях, обеспечивающих рост бактерий на протяжении нескольких часов и даже дней, с молекулярным кислородом этого де-

лать нельзя, так как растворимость его очень мала. Литр воды, находящийся при 20°C в равновесии с атмосферным воздухом, содержит всего лишь 6,2 мл, или 0,28 ммоль, O_2 . Такого количества достаточно для окисления не более 0,046 ммоль, или 8,3 мг, глюкозы (т.е. примерно одной тысячной общего количества глюкозы, содержащегося в обычных питательных средах). Поэтому в среде невозможно создать значительный запас O_2 – кислород приходится добавлять непрерывно. К счастью, микроорганизмы приспособились к очень низким концентрациям растворенного кислорода; однако все же нельзя без ущерба для дыхания клеток доводить эти концентрации до уровня ниже критического.

Скорость перехода молекулярного кислорода в раствор возрастает с увеличением поверхности раздела между газовой и жидкой фазами и с повышением парциального давления O_2 в газовой фазе. Для аэрации жидких культур пользуются либо обычным воздухом, либо смесью O_2 , N_2 и CO_2 . Для увеличения поверхности раздела прибегают к различным способам, таким как 1) культивирование в тонком слое; 2) перемешивание жидкости путем встряхивания (прямого или кругового); 3) вращение лежащих сосудов вокруг продольной оси; 4) пропускание воздуха через жидкость под давлением с помощью газораспределителя (стеклянные фильтры, колбы Клейвера); 5) перколяция (рис. 6.1); 6) механическое перемешивание. Для глубинной культуры аэробных микроорганизмов принудительную аэрацию с помощью газораспределителя

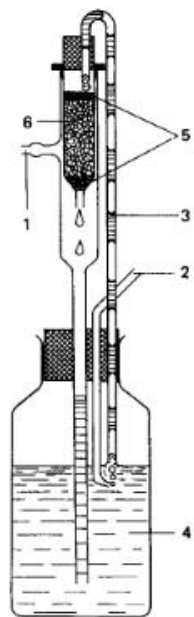


Рис. 6.1. Перколятор для пропускания питательного раствора и воздуха через материал-носитель (землю, стеклянные бусы и др.). Если через отвод (1) медленно и непрерывно отсасывать воздух, то воздух извне будет поступать в сосуд через трубку (2) и по восходящей трубке (3) проталкивать вверх питательный раствор (4). Этот раствор вместе с воздухом проходит через стеклянную вату (5) и перколируемый материал (6).

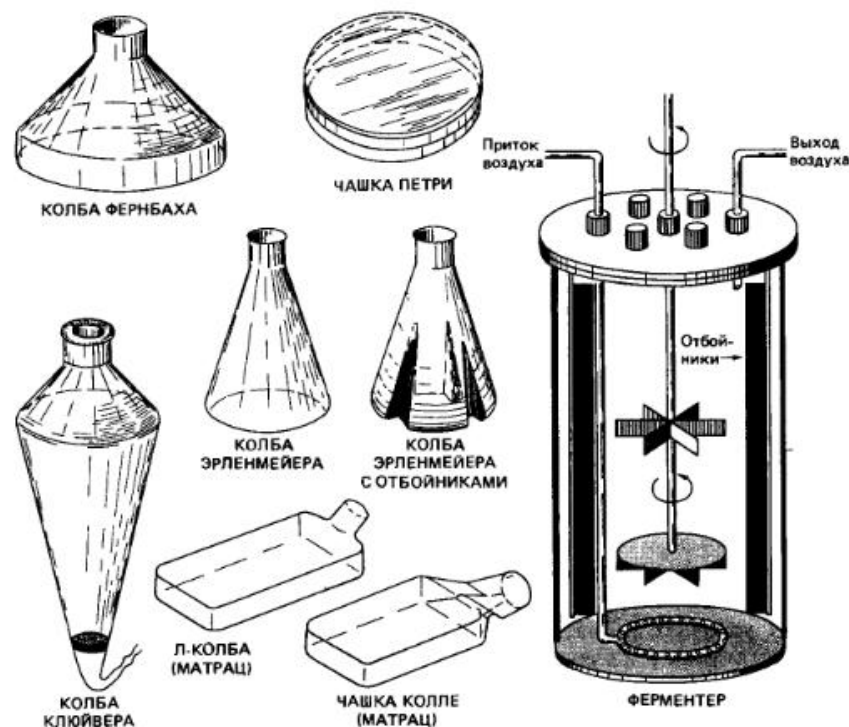


Рис. 6.2. Лабораторная посуда для поверхностных и глубинных культур аэробных микроорганизмов.

лей (стеклянных фильтров, дюз) часто комбинируют с механическим перемешиванием. Весьма удобны такие аппараты, как «ферментер без распределителя» и «система Вальдхофа», где при сильном перемешивании образуется водоворот. На рис. 6.2 представлены различные сосуды, форма которых рассчитана на максимальный контакт жидкости с воздухом, а также некоторые лабораторные сосуды для глубинной культуры.

Следует учитывать, что даже в хорошо аэрируемых ферментерах или в естественных водоемах кислород не всегда бывает распределен равномерно. Если образуются скопления бактерий, то возникают локальные станции с пониженным парциальным давлением O_2 . Затравками для возникновения таких полуаэробных микростадий служат содержащиеся в природных водоемах взвешенные частицы. В эксперименте такие условия можно воспроизводить, добавляя к бактериальным взвесям мелкодисперсные твердые частицы (глину, целлюлозу, хитин). В этих случаях бактерии растут как «флора обрастания» – очень плотно друг к другу на поверхности частиц – и так же страдают от недостатка O_2 . Удобным

объектом для демонстрации этого явления могут служить факультативно-анаэробные бактерии, переходящие при недостатке O_2 к брожению (*Escherichia coli*) или нитратному дыханию (*Pseudomonas denitrificans*).

Анаэробные культуры. При выращивании строго анаэробных бактерий необходимо исключить доступ кислорода. **Техника анаэробных культур** предусматривает применение прокипяченных питательных сред и сосудов, закрытых без пузырьков воздуха; создание бескислородной атмосферы в вакуумных эксикаторах или горшках Витта; применение адсорбентов кислорода (щелочного пирогаллала, дитионита, хлорида одновалентной меди) и других вспомогательных средств. Нередко удается ослабить или полностью нейтрализовать вредное для бактерий действие кислорода, добавляя к среде восстановители (аскорбиновую кислоту, тиогликолат, цистеин или даже сульфид, если бактерии его переносят).

Даже крайне чувствительные к кислороду бактерии можно пересевать на воздухе, если путем непрерывной продувки азота через культуральные сосуды исключить возможность соприкосновения питательной среды с воздухом (техника Хангейта). Можно также использовать перевивочные боксы, наполненные азотом, аргоном или водородом без примеси O_2 . В качестве цветного индикатора анаэробных условий в среду добавляют краситель резазурин (в присутствии O_2 он синий, в анаэробных условиях бесцветен) или ставят в анаэробные инкубационные склянки сосудик с щелочным раствором глюкозы и метиленового синего (в анаэробных условиях он бесцветен).

6.3 Типы питания

Термины «гетеротрофный» и «автотрофный», введенные для определения типов питания животных и растений, недостаточны для того, чтобы охарактеризовать все многообразие способов питания микроорганизмов. Поэтому для микроорганизмов были предложены новые термины, указывающие на **источник энергии, донор водорода (электронов) и источник углерода.**

Источники энергии. В зависимости от механизма преобразования энергии в доступную для клетки биохимическую форму (АТФ) различают два главных типа метаболизма – фототрофный и хемотрофный. Организмы, способные использовать в качестве источника энергии для роста электромагнитное излучение (свет), называют **фототрофными** (фотосинтезирующими). К фототрофным организмам относятся представители двух больших групп: анаэробные фототрофные бактерии, не выделяющие молекулярного кислорода, и аэробные фототрофные цианобактерии, водоросли и зеленые растения, которые на свету выделяют кислород. В отличие от этого **хемотрофными** (хемосинтезирующими) называют организмы, получающие энергию в результате окислительно-восстановительных реакций с участием субстратов, которые служат для них источником питания, – безразлично, связано ли превращение энергии

в биохимическую форму с процессами окисления (дыхания) или с брожением.

Доноры водорода и источники углерода. Все организмы, использующие в качестве доноров водорода органические соединения, называют **органотрофными**. Их противопоставляют **литотрофным** организмам, способным использовать неорганические доноры электронов (H_2 , NH_3 , H_2S , S , CO , Fe^{2+} и др.). Понятия же «автотрофные» и «гетеротрофные» употребляют в микробиологии в более узком смысле – они касаются только происхождения клеточного углерода: «автотрофными» называют те микроорганизмы, которые могут получать весь или почти весь углерод путем фиксации CO_2 , а «гетеротрофными» – те, которые получают его в основном из органических соединений.

Обычно ограничиваются тем, что указывают лишь основной способ получения энергии и природу донора водорода. Зеленые растения, цианобактерии и пурпурные серобактерии относят, таким образом, к фотолитотрофам, нитрифицирующие бактерии – к хемолитотрофам, животных и основную массу микроорганизмов – к хемоорганотрофам. В особых случаях при выборе термина можно учитывать и происхождение клеточного углерода.

6.4 Элегантные методы культивирования

Познанием многообразия микроорганизмов мы обязаны двум обстоятельствам. Некоторые микроорганизмы уже давно привлекли к себе внимание тем, что они образуют колонии, крупные скопления или же вызывают заметные изменения в окружающей среде. Многие из таких легко обнаруживаемых микроорганизмов поддаются прямому выделению. Для них легко подобрать условия, которые обеспечивали бы их рост. Однако есть много других микроорганизмов, относящихся к различным физиологическим группам, которые стали доступными для исследования лишь после того, как Виноградский и Бейеринк разработали технику накопительных культур.

Накопительные культуры. Метод накопительных культур и в принципе, и на практике очень прост. Для накопления нужны такие условия, при которых данный организм преодолевает конкуренцию остальных. Подбирая ряд факторов (источники энергии, углерода, азота, акцепторы электронов, газовую атмосферу, освещенность, температуру, pH и т. д.), создают определенные условия и инокулируют среду смешанной популяцией, какая имеется, например, в почве или в иле. Наиболее приспособленный к такой среде микроорганизм растет и вытесняет все остальные, сопутствующие организмы. Путем многократных пересевов в такую же жидкую среду и посева на твердую среду того же состава можно без труда выделить преобладающий (накопленный) штамм. Частый пересев с жидкой среды на жидкую предотвращает рост сопутствующих организмов, которые могли бы использовать продукты выделения или даже автолиза клеток первичной культуры. Лучшим материа-

лом для инокуляции служат пробы из тех мест, где уже имеется «естественное обогащение». Можно, например, выделять микроорганизмы, использующие окись углерода, из сточных вод газовых заводов; использующие гемоглобин – из сточных вод боен, а те, которые окисляют углеводороды, – из почвы на нефтепромыслах или из нефтяных отстойников.

Метод накопительных культур позволяет выделять микроорганизмы с любой комбинацией потребностей в питательных веществах – если, разумеется, искомым тип вообще существует в природе. Особенно легко создать селективные условия для крайне специализированных микроорганизмов. Например, минеральная среда, не содержащая соединений азота, на свету строго избирательна для цианобактерий, фиксирующих N_2 . Если ту же среду дополнить органическим источником энергии и углерода, на ней в темноте в аэробных условиях будет развиваться *Azotobacter*, а без воздуха – *Clostridium*. Для успешного получения накопительных культур следует ограничиться удовлетворением минимальных потребностей только того микроорганизма, который хотят выделить. Если, например, нужно выделить бактерии, способные окислять метанол или H_2 с нитратом или сульфатом в качестве акцептора электронов, то следует исключить доступ O_2 , иначе будут доминировать аэробные формы, окисляющие метанол или водород. Для отбора можно также использовать устойчивость или толерантность микроорганизмов к кислотам и щелочам, высоким температурам или излучению. Наконец, часто наряду с «положительной» селекцией может проводиться и «отрицательная» – при помощи избирательно действующих ингибиторов. На среде, содержащей азид, в присутствии O_2 растут, например, молочнокислые бактерии, а рост аэробных микроорганизмов подавляется. Азид, цианид и H_2S оказывают избирательное угнетающее действие на те аэробные организмы, в дыхании которых участвуют цитохромы. В медицинской диагностике избирательным торможением роста пользуются для выявления *Corynebacterium diphtheriae* (применение среды с теллуридом) и патогенных *Enterobacteriaceae* (агаризованные среды с висмутом). О применении пенициллина для отбора аукоотрофных мутантов *Escherichia coli* мы еще будем говорить в разделе 15.2.3. Для подавления роста грам-положительных бактерий к питательной среде добавляют пенициллин. Рост мицелиальных грибов, дрожжей, простейших и других эукариот ингибируют добавлением циклогексимида.

В посевном материале, используемом в эксперименте, могут присутствовать разные штаммы с одинаковым типом метаболизма, отличающиеся друг от друга лишь незначительно, например только по оптимуму pH и по скорости роста. Если для получения накопительной культуры использовать такой материал, то доминировать будет наиболее приспособленный к данным условиям или наиболее быстро растущий штамм; все же остальные будут подавлены и выделить их не удастся. Поэтому в тех случаях, когда хотят выделить как можно больше штам-

Таблица 6.3. Элективные условия для некоторых бактерий

Фототрофные микроорганизмы (главный источник углерода – CO_2)

На свету	Анаэробные условия	H_2 , органические кислоты	Фото-ассимиляция	$\lambda > 800$ нм	Rhodospirillaceae
		H_2S как донор электронов		$\lambda > 800$ нм	Chromatiaceae
		H_2S как донор электронов		$\lambda > 715$ нм	Chlorobiaceae
	Аэробные условия	NH_4Cl или N_2 как источник азота	KNO_3 как источник азота		Зеленые водоросли Цианобактерии

Хемолитотрофные (автотрофные) бактерии (главный источник углерода – CO_2)

Без органических соединений в темноте	Аэробные условия	Донор электронов	Акцептор электронов	
		NH_4^+	O_2	<i>Nitrosomonas</i>
		NO_2^-	O_2	<i>Nitrobacter</i>
		H_2	O_2	H_2 -окисляющие (водородные) бактерии
		$H_2S, S_2O_3^{2-}$	O_2	<i>Thiobacillus</i>
		Fe^{2+}	O_2	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
	Анаэробные условия	$S, S_2O_3^{2-}$	NO_3^-	<i>Thiobacillus denitrificans</i>
		H_2	NO_3^-	<i>Paracoccus denitrificans</i>
		H_2	CO_2	Метанобразующие бактерии

Хемоорганотрофные (гетеротрофные) бактерии

Анаэробные условия	Экзогенный акцептор электронов необходим	KNO_3 (2%) + органические кислоты KNO_3 (10%) + ДЭ	Денитрификаторы: псевдомонады Денитрификаторы: спорообразующие бактерии
		Сульфат + органические кислоты	<i>Desulfovibrio</i>

Продолжение табл. 6.3

Экзогенный акцентор электронов не нужен	Глутамат, гистидин	<i>Clostridium tetanomorphum</i>
	Лактат + ДЭ	<i>Veillonella</i>
Аэробные условия	Крахмал + NH_4^+ (ИП)	<i>Clostridium</i>
	Крахмал + N_2 (ИП)	<i>Clostridium pasteurianum</i>
	Глюкоза + NH_4^+	<i>Enterobacter</i> и организмы, осуществляющие брожение
	Глюкоза + 1% ДЭ; рН 5	Молочнокислые бактерии
	Лактат + 1% ДЭ	Пропионовокислые бактерии
	Лактат + NH_4^+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	Бензоат + NH_4^+	<i>P. fluorescens</i>
	Маннитол, бензоат + N_2	<i>Azotobacter</i>
	Крахмал + NH_4^+ (ИП)	<i>Bacillus polymyxa</i> и др.
	4% этанола + 1% ДЭ; рН 6,0	<i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i>
	5% мочевины + 1% ДЭ	<i>Sporosarcina ureae</i>
	Нефть + NH_4^+	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>
	Целлюлоза + NH_4^+	<i>Sporocytophaga</i>

ИП – инокулят пастеризован; ДЭ – дрожжевой экстракт

мов, растущих при определенных селективных условиях, посев следует производить непосредственно в чашки. На твердых селективных средах штаммы, для которых условия благоприятны, образуют отдельные колонии. При достаточно большом расстоянии между колониями конкуренция за питательные вещества не может иметь места: штаммы, растущие более медленно, не подавляются растущими быстрее, так что те и другие могут быть выделены раздельно.

В обзорной таблице 6.3. указаны важнейшие селективные условия для роста типичных представителей групп микроорганизмов с определенными типами обмена веществ.

Чистая культура. Под чистой культурой понимают потомство одной единственной клетки (клон). Получить чистую культуру, с несомненностью доказать ее чистоту и уберечь от загрязняющих организмов — главная задача микробиолога. Чистые культуры микроорганизмов, за редкими исключениями, выделяют на поверхности или внутри твердой питательной среды. Процедура начинается с отделения от клеточной популяции одной-единственной клетки, причем вырастающая из клетки колония тоже должна оставаться изолированной от других клеток и колоний. Аэробные бактерии выделяют по методу Коха — рассеивают суспензию по поверхности среды в чашках Петри или применяют менее

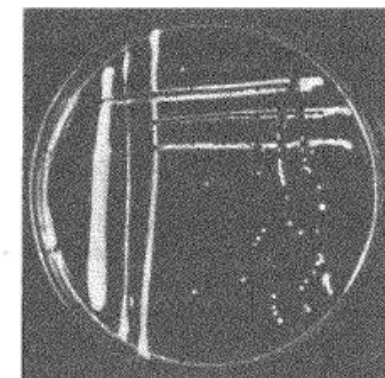


Рис. 6.3. Посев истощающим мазком для выделения чистой культуры аэробных бактерий. На агаризованную среду с помощью платиновой петли наносят каплю бактериальной взвеси. Последовательное размазывание капли уменьшает плотность культуры. Последние, единичные колонии выросли с высокой степенью вероятности из отдельных клеток. Колония в верхней части снимка — результат загрязнения из воздуха. (Фото В. Lehmann.)

трудоемкий метод — размазывают каплю платиновой петлей по агаризованной среде (рис. 6.3). Анаэробные бактерии суспендируют в расплавленном агаре (45°C) и проводят инкубацию без доступа воздуха (рис. 6.4). Тщательное отделение одной колонии, повторное суспендирование в жидкой среде и повторное нанесение штриха или разведение в агаре позволяют получать чистые культуры большинства микроорганизмов.

Можно выделять чистую культуру и в жидких средах, если искомые организмы численно преобладают в исходном материале. Путем последовательного разбавления суспензии питательной средой можно в конце концов добиться того, чтобы на последней ступени разведения была выделена лишь одна клетка. В этом случае будет получен клон, т. е. чистая культура.

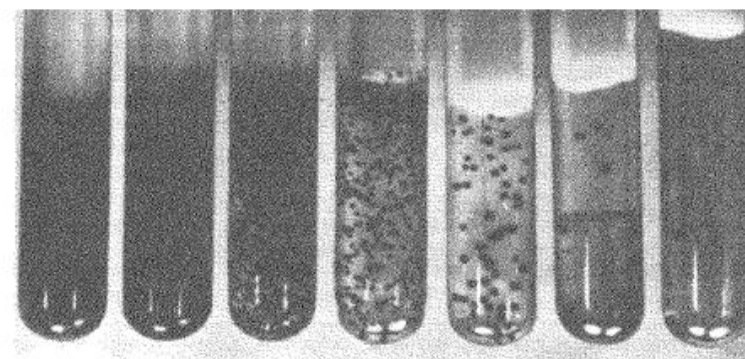


Рис. 6.4. Ряд разведений культуры пурпурной серобактерии в полужидкой агаризованной среде (0,8% агара) после недельной инкубации на свету. Снимок иллюстрирует способ выделения чистой культуры аэробных бактерий (метод разведения и размешивания). Столбик агара покрыт смесью парафина и парафинового масла для устранения доступа воздуха. (Фото В. Lehmann.)

Смешанные культуры. Естественные популяции, как правило, представляют собой смесь различных микроорганизмов. Между ними существуют самые различные формы взаимодействия; это может быть конкуренция за общий субстрат, комменсализм или мутуализм (см. разд. 17.2). Для изучения этих и других форм взаимодействия все чаще используют смешанные культуры. Если создать определенные заданные условия, то как в периодических, так и в непрерывных проточных культурах можно наблюдать последовательную смену (сукцессию) отдельных организмов и накапливаемых продуктов обмена. Это в свою очередь позволяет делать выводы о синергистических или антагонистических взаимоотношениях между различными организмами. Смешанные культуры могут быть приготовлены путем объединения чистых культур. Исследования, проводимые на смешанных культурах заданного состава, дают возможность понять, какими могут быть сложные формы взаимодействия микроорганизмов в местах их естественного обитания.

В домашнем обиходе и в промышленности применяют отнюдь не только чистые, но и смешанные культуры. Некоторые из них назвали «естественными чистыми расами». Примерами могут служить кислое тесто, кефир, чайный гриб и «чистые расы» дрожжей. Большую роль смешанные культуры играют также при очистке сточных вод.

6.5 Физиология роста

Под ростом понимают необратимое увеличение количества живого вещества, обычно связанное с увеличением и делением клеток. У многоклеточных организмов увеличиваются размеры тела, у одноклеточных растет число клеток. Однако и у одноклеточных следует отличать увеличение числа клеток от увеличения клеточной массы (табл. 6.4).

При определении числа или массы бактерий пользуются обычно **гомогенной суспензией клеток** в какой-либо жидкой среде и определяют **концентрацию бактерий** (число клеток на 1 мл) или **плотность бактерий** (в

Таблица 6.4. Разграничение понятий «число бактерий» и «бактериальная масса»

	Число бактерий	Бактериальная масса
На единицу объема	Концентрация бактерий (число клеток на 1 мл)	Плотность бактерий (сухая масса на 1 мл)
Число удвоений в единицу времени	Константа скорости деления, ν , ч^{-1}	Константа скорости роста μ , ч^{-1}
Время, в течение которого происходит удвоение	Время генерации g , ч	Время удвоения t_d , ч

мг/мл). На основе данных об увеличении этих показателей в растущей бактериальной культуре можно вычислить **константу скорости деления** клеток (ее выражают числом удвоений концентрации бактерий за 1 ч) и обратную ей величину — **время генерации** (интервал времени, за который число клеток удваивается).

6.5.1 Методы определения числа бактерий и бактериальной массы

Во время роста периодической (статической)¹ бактериальной культуры может не быть строгой пропорциональности между увеличением числа клеток и увеличением бактериальной массы. Поэтому показатели эти необходимо различать.

Определение числа бактерий. В популяции бактерий не все клетки жизнеспособны. Живыми считаются те клетки, которые могут образовывать колонии на (или в) агаризованной среде либо суспензию в питательном растворе. Эти жизнеспособные клетки выявляют специальными методами, предназначенными для определения числа живых клеток. В общем же число клеток включают все видимые или иным способом выявленные клетки; сюда, следовательно, входят также мертвые или поврежденные клетки.

Общее число клеток. 1. Самым распространенным методом определения общего числа клеток служит их подсчет под микроскопом в тонком слое с помощью «счетной камеры» (например, по Нейбауэру, Томá или Петрову–Хаузеру). Если толщина слоя 0,02 мм, а сторона квадрата 0,05 мм (объем $5 \cdot 10^{-8}$ см³), то для того, чтобы определить число клеток в 1 мл, следует найденное их число умножить на $2 \cdot 10^7$. 2. Один из самых старых методов состоит в сравнении с известным числом каких-либо других малых частиц, например эритроцитов (около $5 \cdot 10^6$ эритроцитов на 1 мл). 3. Значительно облегчает работу применение электронного счетчика («счетчика Каултера»). Действие его основано на снижении проводимости раствора электролитов при прохождении одной бактерии через узкое отверстие. 4. Если на 1 мл приходится менее 10^6 клеток, для определения их числа пригоден метод мембранных фильтров. Морскую, прудовую или питьевую воду пропускают через мембранный фильтр, а затем этот фильтр сушат, окрашивают, просветляют и производят подсчет клеток под микроскопом.

Число живых клеток. Обычно подсчитывают число колоний, образуемых жизнеспособными клетками в благоприятных для роста условиях. Если пользуются чашечным методом Коха, то равные доли соответственно разбавленной гомогенной суспензии клеток смешивают с расплавленной агаризованной средой (40–45°C) и выливают на чашки Петри. Можно также размазать суспензию по поверхности агара в чашке Петри с помощью (треугольного) шпателя Дригальского или же осадить клетки после фильтрования на агаризованную среду или на картонные диски с питательной средой. Во всех случаях после надлежащей инкубации подсчитывают число колоний. Применение чашечного метода Коха, а также различных его модификаций предусматривает подсчет клеток

¹ Так называют культуры микроорганизмов, выращиваемых в какой-либо среде без ее смены.—Прим. ред.

одного вида из гомогенных суспензий; эти методы непригодны для подсчета клеток разных видов из смешанных популяций.

Определение бактериальной массы. Выбор метода для определения бактериальной массы зависит от того, с какой целью это определение производится. Для оценки урожая обычно взвешивают сырые или сухие отцентрифугированные клетки. При определении интенсивности обмена или ферментативной активности исходят из содержания в клетках белка или азота. Часто выбор метода диктуется такими соображениями, как простота или быстрота работы. В повседневной практике предпочтение отдается не прямым, а косвенным методам (после соответствующей калибровки).

Прямые методы. 1. Сырую биомассу определяют после осаждения клеток центрифугированием. После центрифугирования отмытых клеток можно определить сухую массу. Оба метода не свободны от довольно больших систематических ошибок. 2. Гораздо большую точность обеспечивает определение общего азота (метод микро-Кельдаля и микродиффузионный метод определения аммиака), а также определение общего содержания углерода (по ван Слайку-Фолчу). 3. В повседневной практике часто определяют содержание бактериального белка. Хорошие результаты дают модификации биуретового метода и другие колориметрические методы. Микрометоды основаны на измерении количества характерных компонентов белка: тирозина, триптофана (по Лоури или Фолину).

Косвенные методы. 1. Для определения клеточной массы весьма полезны методы, основанные на измерении мутности клеточных суспензий. На практике обычно определяют оптическую плотность суспензии (измерение экстинкции, турбидиметрия). Для некоторых целей более точные результаты дает определение светорассеяния (нефелометрия). Однако прямая (линейная) зависимость между обоими этими показателями и бактериальной массой наблюдается лишь при очень низких плотностях клеточных суспензий. Поскольку рассеяние света зависит от диаметра, формы и показателя преломления рассеивающих частиц, в том числе клеточных включений, приходится от случая к случаю проверять соотношение между оптическими величинами и более прямыми показателями, такими как сухая биомасса, содержание в ней азота или содержание углерода. 2. Показатели интенсивности метаболизма, непосредственно связанные с ростом (поглощение O_2 , образование CO_2 или кислот), могут служить адекватной мерой бактериальной массы. К такого рода определениям прибегают в тех случаях, когда другие методы оказываются непригодными, например при очень малой плотности клеточных суспензий. Для измерения можно применять титрометрические, манометрические, электрохимические и другие методы.

6.5.2 Экспоненциальный рост и время генерации

Бактерии размножаются чаще всего делением надвое, и поэтому число их растет в геометрической прогрессии: $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$. Если на единицу объема растущей периодической культуры приходится N_0 клеток, то после n делений число клеток будет $N_0 \cdot 2^n$. Логарифми-

руя, получаем $\lg N = \lg N_0 + n \lg 2$, откуда число клеточных делений

$$n = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2}$$

Число клеточных делений за 1 ч, или константа скорости деления v , определяется по формуле

$$v = \frac{n}{t} = \frac{\lg N - \lg N_0}{\lg 2(t - t_0)}$$

Время, необходимое для одного цикла деления, или время генерации

$$g = \frac{t}{n} = \frac{1}{v}$$

Если за 10 ч число клеток в суспензии возрастает с 10^3 до 10^9 , то для константы скорости деления находим:

$$v = \frac{\lg 10^9 - \lg 10^3}{0,3010 \cdot 10} \approx \frac{6}{3} = 2$$

а время генерации равно получасу.

Отложив по оси ординат число клеток в экспоненциально растущей популяции, а по оси абсцисс—время (обе величины в арифметическом масштабе), мы получим экспоненциальную кривую роста (рис. 6.5). Такой способ графического представления для большого числа клеточных делений, однако, непригоден, так как в зависимости от выбранного масштаба он позволяет учесть либо только первые, либо только последние деления. Поэтому предпочитают пользоваться полулогарифмической шкалой (рис. 6.5); в этом случае по оси ординат откладывают

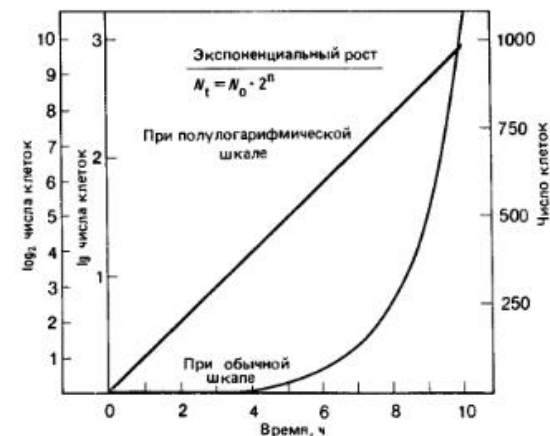


Рис. 6.5. Экспоненциальный рост одноклеточных организмов: зависимость числа клеток от времени.

логарифм числа клеток. При таком построении графика **экспоненциальный рост** бактерий описывается прямой. Наклон прямой характеризует скорость деления: она тем больше, чем больше наклон. Поскольку при экспоненциальном росте существует линейная зависимость между временем и логарифмом числа клеток, такой рост называют также логарифмическим.

Если по числу клеток определить указанным выше способом время генерации g , то получим среднее его значение. Следует, однако, учитывать, что в популяции бактерий всегда содержится некоторое число дефектных клеток, не способных к делению; поэтому у активно делящихся клеток время генерации должно быть в действительности несколько меньше. Во многих случаях при изучении кинетики роста отдельные клетки не принимают в расчет и рассматривают растущую популяцию бактерий как **автокаталитически размножающуюся систему**. При этом в вычислениях исходят из плотности бактериальной суспензии. Скорость изменения плотности такой суспензии в каждый момент времени пропорциональна самой плотности, т.е. изменение следует кинетике **реакций первого порядка**. В экспоненциальной фазе константа скорости роста определяется как

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

Интегрируя, получаем $x = x_0 \cdot e^{\mu t}$, а для удвоения клеточной массы $2x_0 = x_0 \cdot e^{\mu t_d}$, откуда время удвоения

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}; \quad (\ln 2 = 0,693)$$

При сравнении константы скорости роста (μ) с константой скорости деления (v) следует учитывать, что число и масса клеток – понятия не идентичные и что во время роста периодической культуры соотношение между этими двумя показателями изменяется. Если, однако, определить и сравнение сухой массы или числа клеток проводить в условиях, когда рост клеточной массы строго пропорционален увеличению числа клеток («стандартные клетки»), то $\mu = \ln 2 \cdot v$ и $t_d = g$.

6.5.3 Рост бактерий в периодической культуре

При внесении бактерий в питательную среду они обычно растут до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов обмена, то получим так называемую **периодическую культуру** (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве). Рост в такой «закрытой системе» подчиняется закономерностям, действительным не только для одноклеточных, но и для



Рис. 6.6. Кривая роста бактериальной культуры.

многоклеточных организмов. Периодическая культура ведет себя как многоклеточный организм с генетически ограниченным ростом.

Кривая, описывающая зависимость логарифма числа живых клеток от времени, называется **кривой роста**. Типичная кривая роста (рис. 6.6) имеет S-образную форму и позволяет различить несколько **фаз роста**, сменяющих друг друга в определенной последовательности и в большей или меньшей степени выраженных: начальную (или лаг-) фазу, экспоненциальную (или логарифмическую) фазу, стационарную фазу и фазу отмирания.

Рост микроорганизмов на твердых питательных средах протекает в основном так же, хотя при этом достигаются значительно более высокие плотности клеток.

Начальная фаза. Эта фаза охватывает промежуток времени между инокуляцией и достижением максимальной скорости деления. Продолжительность этой фазы зависит главным образом от предшествовавших условий культивирования и возраста инокулята, а также от того, насколько пригодна для роста данная среда. Если инокулят взят из старой культуры (в стационарной фазе роста), то клеткам приходится сначала адаптироваться к новым условиям путем синтеза РНК, образования рибосом и синтеза ферментов. Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, какие были в предшествующей культуре, то приспособление (адаптация) к новым условиям может быть связано с синтезом новых ферментов, которые ранее не были нужны и поэтому не синтезировались. Образование новых ферментов индуцируется новым субстратом.

Хорошим примером влияния субстрата на синтез ферментов служит так называемая **диауксия** (рис. 6.7). Это явление двухфазного роста или двойного цикла роста наблюдается на средах, содержащих смесь питательных веществ. Из смеси глюкозы и сорбитола *Escherichia coli*, например, поглощает в первую очередь глюкозу. Глюкоза индуцирует сначала в клетках синтез ферментов, которые нужны для ее использования,

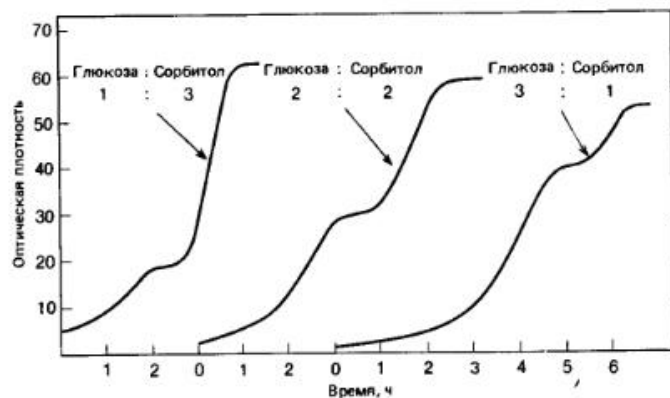


Рис. 6.7. Двухфазный рост (диауксия) *Escherichia coli* в питательных средах, содержащих глюкозу и сорбитол в разных соотношениях. (Monod J., Recherches sur la croissance des cultures bactériennes, Paris: Hermann, 1958.)

и одновременно подавляет (репрессирует) синтез ферментов, необходимых для использования сорбитола. Эти последние ферменты образуются лишь после того, как вся глюкоза будет израсходована. Такие регуляторные процессы достаточно хорошо объясняют наличие двух начальных фаз.

Количественное изменение состава бактериальной клетки во время начальной фазы роста сильнее всего затрагивает рибонуклеиновую кислоту: содержание РНК повышается в 8–12 раз. Это указывает на участие РНК и рибосом в синтезе ферментных белков.

Экспоненциальная фаза. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость во время экспоненциальной фазы зависит от вида бактерий, а также от среды. Энтеробактерии делятся через каждые 15–30 мин, *Escherichia coli* при 37°C — примерно каждые 20 мин. У других бактерий время генерации значительно больше: у многих почвенных видов оно достигает 60–150 мин, а у *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* — даже 5–10 ч.

Величина клеток и содержание в них белка у многих бактерий тоже остаются в экспоненциальной фазе постоянными. В известном смысле можно сказать, что бактериальная культура в этом случае состоит из «стандартных клеток». Если точно установлено, что число клеток, содержание в них белка и их сухая биомасса увеличиваются с одинаковой скоростью, то за ростом культуры можно следить, пользуясь каким-нибудь одним из этих показателей.

Нередко, однако, и в экспоненциальной фазе роста клетки периодической культуры претерпевают изменения, так как постепенно изменяется среда: уменьшается концентрация субстрата, увеличивается плотность клеточной суспензии и накапливаются продукты обмена. В связи

с тем что в экспоненциальной фазе скорость деления клеток относительно постоянна, эта фаза наиболее удобна для определения скорости деления (и скорости роста). Изучая влияние факторов среды (рН, окислительно-восстановительного потенциала, температуры, аэрации и т. д.), а также пригодность различных субстратов, следят за увеличением числа клеток или за мутностью (экстинкцией) клеточной суспензии во время экспоненциального роста.

Стационарная фаза. Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Скорость роста зависит от концентрации субстрата — при уменьшении этой концентрации, еще до полного использования субстрата, она начинает снижаться. Поэтому переход от экспоненциальной фазы к стационарной происходит постепенно. Скорость роста может снижаться не только из-за нехватки субстрата, но также из-за большой плотности бактериальной популяции, из-за низкого парциального давления O_2 или накопления токсичных продуктов обмена; все эти факторы вызывают переход к стационарной фазе. И в стационарной фазе могут еще происходить такие процессы, как использование запасных веществ, распад части рибосом и синтез ферментов. Наблюдаемая картина зависит от того, какой именно фактор лимитирует рост. Быстро гибнут лишь очень чувствительные клетки; другие еще долго сохраняют жизнеспособность — до тех пор, пока есть возможность получать необходимую для этого энергию в процессе окисления каких-либо запасных веществ или клеточных белков.

Количество биомассы, достигнутое в стационарной фазе, называют **выходом** или **урожаем**. Урожай зависит от природы и количества используемых питательных веществ, а также от условий культивирования.

Фаза отмирания. Фаза отмирания и причины гибели бактериальных клеток в нормальных питательных средах изучены недостаточно. Сравнительно легко понять случаи, когда в среде накапливаются кислоты (при росте *Escherichia*, *Lactobacillus*). Число живых клеток может снижаться экспоненциально. Иногда клетки лизируются под действием собственных ферментов (автолиз).

6.5.4 Параметры кривой роста

Когда рост периодической культуры прослеживают по увеличению сухой бактериальной массы, интерес представляют в первую очередь три показателя, или параметра, роста: урожай клеток, скорость роста и длительность лаг-фазы (рис. 6.8).

Урожай. Под урожаем понимают разность между максимальной и исходной массой бактерий: $X = X_{\text{макс}} - X_0$. Эту величину выражают в граммах сухого вещества. Особенно важное значение имеет отношение урожая клеток к количеству потребленного субстрата (X/S). Если обе эти величины выражены в весовых единицах, то отношение X/S называют экономическим коэффициентом и обозначают Y . Если же урожай в граммах отнесен к числу молей потребленного субстрата, то по-

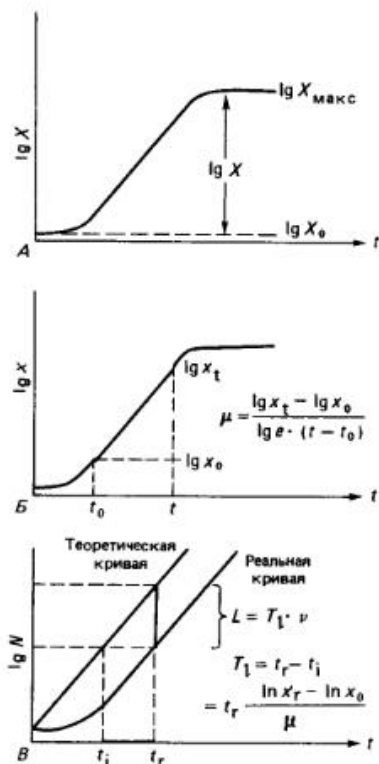


Рис. 6.8. Параметры роста: урожай клеток (А), скорость роста (Б) и длительность лаг-фазы (В).

лученную величину называют в этом случае молярным экономическим коэффициентом и обозначают Y . Этот коэффициент позволяет связать урожай с количеством АТР, синтезируемым за счет какого-либо источника энергии (субстрата). Таким образом получают энергетический коэффициент выхода $Y_{\text{АТР}}$ (в граммах клеточной массы на 1 моль АТР); его можно вычислить, если известны путь катаболизма данного субстрата и выход энергии в результате этого процесса.

Для анаэробных культур *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, скорость роста которых лимитировалась количеством добавляемой глюкозы, были найдены величины $Y_{\text{АТР}}$ соответственно 12,4 и 14 г биомассы на 1 моль эквивалентов АТР. У анаэробных бактерий, получающих энергию в результате брожения, $Y_{\text{АТР}}$ — в большой степени постоянная величина. Если для какого-то нового штамма бактерий получают существенно больший коэффициент, можно заключить, что имеется «побочный доход», т.е. дополнительный метаболический путь, дающий энергию. Величины $Y_{\text{АТР}}$ были рассчитаны и определены также для клеток, растущих в аэробных условиях; они зависят от условий роста и от необходимой интенсивности процессов синтеза в клетках, т.е.,

например, от того, служат ли источником азота ионы аммония, нитрата или молекулярный азот.

Скорость экспоненциального роста. Это мера скорости роста клеток в экспоненциальной фазе. Ее вычисляют из начальной и конечной плотности бактерий x_0 и x_t , в моменты t_0 и t по формуле

$$\mu = \frac{\lg x_t - \lg x_0}{\lg e (t - t_0)} = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{(t - t_0)}$$

где $\lg e = 0,43429$. Время удвоения $t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$. Для «стандартных клеток»

$$\mu = \ln 2 \cdot \nu \text{ и } t_d = g \text{ (разд. 6.5.2).}$$

Длительность лаг-фазы (T_l). Это параметр, очень важный для суждения о свойствах бактерий или о пригодности среды. Его определяют как промежуток времени между моментом t_r , в который культура достигла определенной плотности x_r , и моментом t_i , в который она могла бы достичь такой же плотности, если бы сразу же после инокуляции начинался экспоненциальный рост (индекс l означает лаг-фазу, индекс r — реальный рост, а индекс i — идеальный рост):

$$T_l = t_r - t_i = t_r - \frac{\ln x_r - \ln x_0}{\mu}$$

Поскольку параметр T_l пригоден лишь для сравнения двух культур с одинаковыми скоростями экспоненциального роста, рекомендуется измерять длительность лаг-фазы не в абсолютных, а в физиологических единицах (время генерации g). Разность между наблюдаемым ростом и вычисленным идеальным, выраженная числом, кратным времени генерации, равна $L = T_l \nu$. Таким образом, величина L показывает, на сколько удвоений (генераций) реальная культура отстает от идеальной, которая с самого начала росла бы экспоненциально. Эту величину обычно используют при сравнении данных, характеризующих влияние различных питательных веществ, ингибиторов роста и условий культивирования.

6.5.5 Рост в непрерывной культуре

В периодической культуре условия все время меняются; плотность популяции бактерий возрастает, а концентрация субстрата уменьшается. Во многих физиологических исследованиях представляется, однако, желательным, чтобы клетки могли долгое время находиться в фазе экспоненциального роста при постоянной концентрации субстрата в неизменных прочих условиях. В какой-то мере приблизиться к такому положению можно, многократно и достаточно часто перенося клетки в новую питательную среду. Той же цели было бы, очевидно, проще достичь, если в сосуд, содержащий популяцию растущих бактерий, непрерывно вводить новый питательный раствор и одновременно удалять из него соответствующее количество бактериальной суспензии. Именно

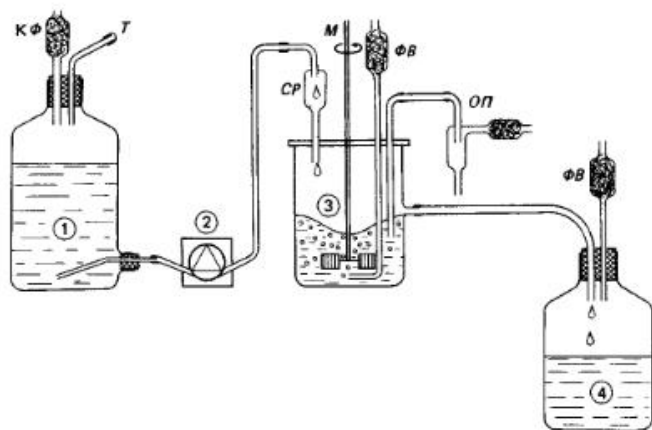


Рис. 6.9. Принцип непрерывной культуры в хемостате. 1 - сосуд с питательной средой, снабженный компенсационным фильтром (КФ) и трубкой для дозирования (Т); 2 - перистальтический насос; 3 - хемостат с притоком питательной среды (СР), мешалкой (М), фильтром для воздуха (ФВ) и приспособлением для отбора проб (ОП); 4 - приемный сосуд с фильтром для выходящего воздуха (ФВ).

такой метод положен в основу непрерывного культивирования в хемостатах и турбидостатах.

Рост в хемостате. Хемостат (рис. 6.9) состоит из сосуда-культиватора, в который из особого резервуара поступает с постоянной скоростью питательный раствор. Благодаря аэрации и механическому перемешиванию в культиваторе создаются оптимальные условия для снабжения клеток кислородом и для более быстрого и равномерного распределения питательных веществ, поступающих с новыми порциями раствора. По мере поступления в культиватор питательного раствора из него вытекает бактериальная суспензия.

Обозначим объем сосуда через V (литров), а скорость поступления питательного раствора - **скорость притока** - через f (литров в час); тогда **скорость разведения** D будет равна f/V . Величина D , таким образом, отражает объем жидкости, сменяемый за 1 ч. Если бы при запуске хемостата бактерии, находящиеся в культиваторе (x [г/л]), не росли, то они вымывались бы из сосуда и **скорость вымывания** была бы равна $D \cdot x =$

$= -\frac{dx}{dt}$. Плотность бактериальной суспензии в сосуде снижалась бы в этом случае экспоненциально: $x = x_0 \cdot e^{-Dt}$.

Бактерии в культиваторе тоже растут экспоненциально. **Скорость прироста** определяется выражением $\mu_x = \frac{dx}{dt}$, т.е. экспоненциально увеличивается и плотность бактериальной суспензии:

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

Следовательно, скорость изменения плотности суспензии в сосуде dx/dt равна алгебраической сумме величин μx и $-Dx$:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx$$

Если скорость роста μ и скорость разбавления D равны, то потеря в результате вымывания клеток и прирост биомассы уравниваются друг друга, т.е. изменение равно нулю и плотность бактериальной суспензии x остается постоянной. Культура оказывается при этом в состоянии **динамического равновесия**. Экспоненциальное размножение клеток компенсируется другим экспоненциальным процессом, ведущим к уменьшению их числа.

Рост культуры в хемостате контролируется концентрацией субстратов. На таком ограничении скорости роста концентрацией одного из необходимых субстратов (донора электронов, источника азота, серы или фосфора) основана стабильность системы. Если вследствие этого ограничения истинная скорость роста μ оказывается меньше $\mu_{\text{макс}}$ (максимальной скорости, достижимой при насыщении субстратом), то скорость разбавления D можно менять в широких пределах без того, чтобы это привело к снижению плотности суспензии. Однако скорость разбавления не должна превышать $\mu_{\text{макс}}$.

Зависимость константы роста μ от концентрации субстрата c_s описывается кривой насыщения (рис. 6.10). Вообще говоря, бактерии способны расти с максимальной скоростью уже при очень незначительных концентрациях субстрата (например, 10 мг глюкозы на 1 л). Только при еще меньших количествах субстрата величина μ зависит от его концентрации. Ту концентрацию субстрата, при которой скорость роста μ достигает половины максимального значения ($\mu = \mu_{\text{макс}}/2$), обозначают K_s . Величина K_s наряду с величинами Y и $\mu_{\text{макс}}$ - это один из важнейших параметров, характеризующих рост бактерий в хемостатах.

На рис. 6.11 показано влияние скорости разбавления D на четыре показателя - плотность бактериальной суспензии, концентрацию субстрата, время удвоения и урожай клеток. При изменении скорости разбавления D от нуля почти до точки вымывания D_c плотность бактериальной суспензии меняется незначительно. В этой области бактерии

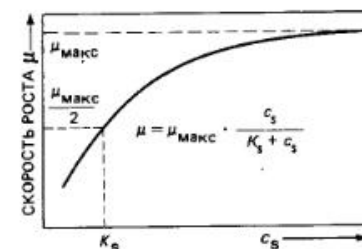


Рис. 6.10. Зависимость скорости роста μ от концентрации субстрата (c_s).

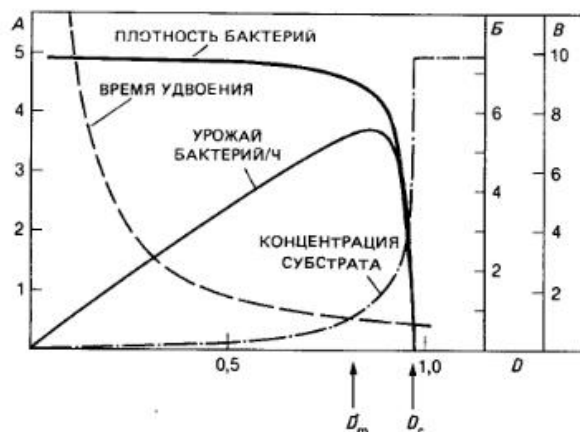


Рис. 6.11. Соотношения между плотностью бактериальной суспензии, концентрацией субстрата, временем удвоения и урожаем бактерий в условиях динамического равновесия при различных скоростях разведения (D) в хемостате. Данные для бактериальной культуры со следующими параметрами: $\mu_{\max} = 1,0 \text{ ч}^{-1}$; $Y = 0,5$; $K_s = 0,2 \text{ г/л}$; концентрация субстрата в поступающем питательном растворе $S_R = 10 \text{ г/л}$. На оси ординат: А — урожай бактерий, г/(л·ч); Б — время удвоения t_d , ч; В — концентрация субстрата в культуральном сосуде S , г/л. На оси абсцисс: коэффициент разбавления D , ч^{-1} ; D_m — коэффициент разбавления при максимальном урожае бактерий; D_c — точка вымывания. (Herbert et al., J. Gen. Microbiol., 14 [1956] 601.)

реагируют на повышение D уменьшением времени удвоения. Однако с повышением скорости разбавления (когда увеличивается также скорость притока и уменьшается время удвоения) возрастает урожай клеток. Он достигает максимума при D_m , а при дальнейшем увеличении D резко снижается.

Концентрация субстрата в культиваторе, а следовательно, и в вытекающей из него суспензии при низких скоростях разбавления в довольно широкой области близка к нулю. Лишь тогда, когда скорость разбавления приближается к величине, обеспечивающей максимальный рост, заметная часть субстрата начинает вымываться вместе с клетками; в конце концов концентрация субстрата на выходе становится равной его концентрации в поступающем питательном растворе.

Стабильность динамического равновесия культуры в хемостате обусловлена тем, что ее рост лимитирует концентрация какого-то субстрата. Величина μ поддерживается на низком уровне. Хемостат представляет собой саморегулирующуюся систему, простую в работе; если скорость притока достаточно долго остается постоянной, то работа хемостата регулируется автоматически.

Рост в турбидостате. От описанной выше непрерывной культуры в хемостате существенно отличается непрерывная культура в турбидостате. Как указывает само название, работа турбидостата основана на

поддержании постоянной плотности бактериальной суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляющую систему поступление питательного раствора. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста бактерий приближается к максимальной. Работа с турбидостатами технически сложнее, чем с хемостатами.

Принципиальные различия. Между классической периодической культурой и непрерывной культурой в хемостате имеются принципиальные различия, которые в заключение следует еще раз подчеркнуть.

Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему (в какой-то мере подобную многоклеточному организму), которая в своем развитии проходит четыре фазы — начальную, экспоненциальную, стационарную и фазу отмирания (юность, расцвет, старение и смерть). Условия существования культуры во всех этих фазах различны. Автоматическое регулирование в периодической культуре вряд ли возможно.

Непрерывная культура представляет собой открытую систему, стремящуюся к установлению динамического равновесия. Фактор времени в ней в известной мере исключается. Для организмов создаются неизменные условия среды. Установка легко поддается автоматическому регулированию.

6.5.6 Синхронизация клеточного деления

Для изучения метаболических процессов на протяжении цикла клеточного деления нужны такие суспензии, в которых клетки делились бы одновременно (синхронно). Чтобы достичь такого совпадения фаз цикла у разных клеток, прибегают к синхронизации культуры. Синхронизировать деление в какой-либо популяции клеток можно с помощью различных искусственных приемов, таких как изменение температуры, воздействие света, ограничение количества питательных веществ или пропускание микроорганизмов через специальный фильтр с целью получить клетки одного размера. Клеточная суспензия, синхронизированная той или иной обработкой, после нескольких одновременных делений постепенно переходит снова к асинхронному делению, так что число клеток увеличивается в дальнейшем уже не ступенчато, а непрерывно.

6.6 Подавление роста и гибель микроорганизмов под действием различных агентов

Ряд химических агентов замедляет или полностью тормозит рост микроорганизмов. Если то или иное вещество подавляет рост бактерий, а после его удаления рост вновь возобновляется, то говорят о **бактериостатическом** действии. **Бактерицидные** вещества вызывают гибель кле-

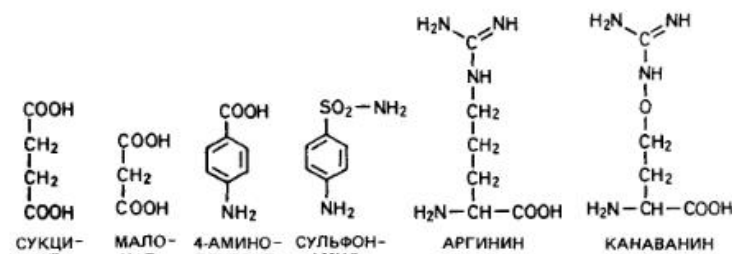
ток. Тот или другой эффект, однако, зависит от концентрации действующего вещества. Кроме того, среди бактерий существуют формы, устойчивые к общим клеточным и метаболическим ядам (таким, как сероводород, фенол или окись углерода) и даже способные использовать их как источники энергии. Для многих антимикробных агентов удалось в той или иной мере выяснить субклеточную мишень и механизм действия.

Повреждение поверхностных структур или слоев клетки. Этанол в достаточной высокой концентрации (70%) вызывает коагуляцию белков и оказывает бактерицидное действие. Фенолы, крезолы, нейтральные мыла и поверхностно-активные вещества (детергенты) действуют на наружные слои клеток и нарушают избирательную проницаемость плазматической мембраны. Клеточные мембраны состоят главным образом из липидов и белков. Детергенты имеют полярную структуру, причем их молекулы содержат как липофильные группы (длинные углеводородные цепи или ароматические кольца), так и гидрофильные ионизированные группы. Накапливаясь в липопротеиновых мембранах (тоже имеющих полярную структуру), детергенты нарушают их функции. Поскольку эти вещества обладают широким спектром антимикробного действия, их обычно применяют для дезинфекции различных поверхностей и одежды. С детергентами сходны по своему действию некоторые полипептидные антибиотики (полимиксин, колистин, бацитрацин, субтилин) и антимикробные вещества растительного происхождения.

Повреждение ферментов и нарушение метаболизма. Некоторые тяжелые металлы (медь, серебро, ртуть и др.) действуют как сильные ферментные яды даже в малых концентрациях (так называемое «олигодинамическое действие»). Как в виде солей ($HgCl_2$, $CuCl$, $AgNO_3$), так и в форме органических соединений (таких, как *n*-гидроксимеркурибензоат) они связывают SH-группы и тем самым глубоко изменяют третичную и четвертичную структуру ферментных белков. Блокируется также функциональная сульфгидрильная группа кофермента А. Цианид действует как дыхательный яд — связывая железо, он блокирует функцию терминального дыхательного фермента цитохромоксидазы. Окись углерода подавляет дыхание, конкурируя со свободным кислородом за цитохромоксидазу, т.е. действует путем «конкурентного торможения». Антимидин А нарушает перенос электронов по дыхательной цепи, ингибируя цитохром-*c*-редуктазу. 2,4-Динитрофенол разобщает процессы окисления и фосфорилирования в митохондриях. Арсенат ингибирует фосфорилирование на уровне субстрата. Фторацетат блокирует цикл трикарбоновых кислот. Сначала он, подобно ацетату, активируется и используется как предшественник цитрата (так называемый летальный синтез), а образовавшийся фторцитрат ингибирует аконитазу и тем самым тормозит дальнейшие превращения цитрата.

Конкурентное ингибирование. Примером конкурентного торможения может служить действие малоната, который подавляет превращение сукцината в фумарат. Это действие чрезвычайно специфично и про-

является уже при низких концентрациях малоновой кислоты. В то время как подавление, вызванное цианидом (в известной концентрации) нельзя устранить повышением концентрации субстрата, т.е. парциального давления O_2 , подавление, вызванное малонатом, можно частично или полностью снять, повысив концентрацию сукцината. Как полагают, нормальный метаболит — сукцинат — конкурирует со своим **структурным аналогом**, или **антиметаболитом**, — малонатом — за каталитический центр фермента сукцинатдегидрогеназы. В основе конкурентного ингибирования лежит структурное сходство ингибиторов с нормальными клеточными метаболитами. Проникший в клетку антиметаболит может различными путями воздействовать на процессы биосинтеза. В приведенной ниже схеме три метаболита представлены черным цветом, а три антиметаболита — красным.



Нарушение синтеза клеточных компонентов. Самым известным примером торможения роста в результате включения структурного аналога в один из клеточных компонентов служит действие производных сульфаниловой кислоты. Антибактериальное действие сульфонамидов было обнаружено чисто эмпирически (Домач); лишь позднее ключ к пониманию механизма этого действия был найден в структурном сходстве между сульфонидами и *n*-аминобензойной кислотой (см. приведенные выше структурные формулы). *n*-Аминобензойная кислота входит в состав одного из коферментов, а именно тетрагидрофолиевой кислоты. У большинства бактерий тетрагидрофолиевая кислота синтезируется из более простых компонентов. Однако при добавлении к питательной среде *n*-аминобензойной кислоты или сульфонидами эти вещества беспретятственно проникают в клетку и включаются в фолиевую кислоту. Когда включается сульфонидамид, это приводит к синтезу нефункционирующего кофермента и в конечном счете к остановке роста клеток. Действие сульфонидами можно снять повышением концентрации *n*-аминобензойной кислоты: в основе подавления лежит **конкурентный механизм**. В организме животного фолиевая кислота не образуется *de novo* и не синтезируется из более простых компонентов: животные должны получать ее в готовом виде с пищей. Поэтому в их организме сульфонидамид не может включаться в этот кофермент и не может, таким образом, оказывать вредное воздействие. Возможность использовать сульфона-

миды в качестве лечебного средства связана с тем, что синтетические способности животного организма ограничены.

Ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом и торможение роста бактерий производными сульфаниловой кислоты – примеры антагонистических отношений между нормальными клеточными метаболитами и их структурными аналогами. Антагонизм между метаболитами и антиметаболитами (структурными аналогами) может проявляться на разных уровнях. Структурные аналоги могут препятствовать включению нормальных метаболитов и тем самым синтезу отдельных клеточных компонентов. Они могут также включаться в полимеры, а это может приводить к снижению активности и даже к полной инактивации какого-либо фермента или нарушать функцию нуклеиновой кислоты.

Подавление синтеза белков антибиотиками. Белковый синтез у прокариот специфически подавляется рядом антибиотиков. Действие их направлено на функцию 70S-рибосом. Стрептомицин и неомицин тормозят процесс связывания аминокислот между собой. Эритромицин нарушает функцию субъединиц 50S. Тетрациклины препятствуют присоединению аминоацил-тРНК к рибосомам. Хлорамфеникол подавляет включение аминокислот в белки, так как, по-видимому, создает препятствие для связывания аминокислот при участии пептидилтрансферазы. Хлорамфеникол (левомицетин) применяется в медицине как весьма действенный бактериостатик, а в биохимических исследованиях – как селективный ингибитор синтеза белка, не влияющий на другие метаболические процессы. Упомянутые антибиотики, конечно, действуют на рибосомы митохондрий и хлоропластов также и в клетках эукариот. Но, так как, например, наружная мембрана митохондрий очень мало проницаема для стрептомицина, этот антибиотик в тех низких концентрациях, в которых его применяют в терапии, почти не действует на эукариотические клетки. Деление названных органелл у эукариот прекращается лишь при использовании в 1000 раз более высоких его концентраций. Если воздействовать высокими концентрациями стрептомицина на эукариот (дрожжи, эвглену, точки роста высших растений), то в процессе их роста число митохондрий и хлоропластов будет уменьшаться, и можно получить клетки и ткани с сильно пониженным числом этих органелл.

Подавление синтеза нуклеиновых кислот антибиотиками. Некоторые антибиотики подавляют синтез нуклеиновых кислот. Митомидин С избирательно препятствует синтезу ДНК, не оказывая на первых порах влияния на синтез РНК и белков. Полагают, что действие его основано на образовании поперечных сшивок в двойной спирали ДНК и на разрыве ее цепей. Актиномицин D образует с двухцепочечной ДНК комплекс, присоединяясь к остаткам гуанина; он нарушает синтез РНК всех трех типов, но не влияет на репликацию ДНК. Рифампицин воздействует на ДНК-зависимую РНК-полимеразу и подавляет тем самым синтез мРНК у бактерий.

Торможение синтеза клеточных стенок. О подавлении синтеза пептидогликана у прокариот пенициллином, цефалоспорином и другими ве-

ществами, действующими на клеточные стенки, уже говорилось в разделе 2.2.3.

Гибель и уничтожение микроорганизмов. Под гибелью микроорганизмов имеют в виду необратимую утрату способности к росту и размножению; в лабораторных условиях это обычно означает потерю способности к образованию колоний. Многие повреждения, как правило приводящие к гибели клетки, в определенных условиях могут быть обратимы. Хорошо известно явление реактивации после облучения ультрафиолетом или воздействия высоких температур (разд. 15.2.2). Количественные данные относительно гибели микроорганизмов (естественной или вызванной каким-либо агентом) можно получить только для популяции, но не для отдельных клеток. В некоторых случаях скорость уменьшения числа живых клеток в популяции в любой момент времени пропорциональна числу имеющихся жизнеспособных клеток; процесс отмирания клеток подчиняется тогда кинетике реакций первого порядка $N = N_0 \cdot e^{-kt}$ (где k – коэффициент, характеризующий скорость отмирания). Это относится, например, к стерилизации облучением.

6.6.1 Методы стерилизации

Уничтожение микроорганизмов – один из необходимых элементов микробиологической работы и основа консервирования пищевых продуктов; поэтому стоит остановиться на нем подробнее. Освобождение какого-либо материала от живых микроорганизмов или их покоящихся форм называют **обеспложиванием** или **стерилизацией**. От стерилизации следует отличать **частичное обеспложивание (пастеризацию)**, а также консервирование. Если стерильная среда или микробная культура загрязняется случайно попавшими в нее микроорганизмами, то говорят о **контаминации**, или **загрязнении**. Такие понятия, как **дезинфекция** (уничтожение всех патогенных микроорганизмов), **асептика** и **антисептика**, а также **инфекция**, употребляются главным образом в гигиене, а не в микробиологии.

Микроорганизмы проявляют разную чувствительность к средствам, применяемым для их уничтожения. Существуют видовые различия в чувствительности, а также различия, зависящие от влажности и pH среды, от возраста вегетативных клеток или спор и т. д. Эффективность различных агентов, применяемых для уничтожения микроорганизмов, характеризуют величиной D_{10} (время, необходимое для того, чтобы в определенной популяции при определенных условиях среды вызвать гибель 90% клеток (см. табл. 6.5).

Полная или частичная стерилизация осуществляется с помощью влажного жара, сухого жара, фильтрации, облучения или различных химических средств.

Влажный жар. Вегетативные клетки большинства бактерий и грибов гибнут через 5–10 мин уже при температуре около 60°C, споры дрожжей и мицелиальных грибов – лишь при температурах выше 80°C,

Таблица 6.5. Величины D_{10} (в секундах) для суспензий спор трех аэробных видов бактерий (по I. Miller, O. Kandler, Milchwiss., 22 [1967], 686, с изменениями)

Вид	D_{10} при разных температурах					
	100°C	120°C	130°C	140°C	150°C	160°C
<i>Bacillus cereus</i>	12,1	4,2	2,6	1,3	1,0	0,7
<i>B. subtilis</i>	27,8	4,5	3,1	2,1	1,1	0,5
<i>B. stearothermophilus</i>	2857,0	38,6	8,8	3,9	2,4	1,4

а споры бактерий—выше 120°C (15 мин). Время воздействия влажным жаром, необходимое для уничтожения спор некоторых видов бактерий, отличающихся чрезвычайной термостойкостью, можно вывести из данных, приведенных в табл. 6.5. При этом следует учитывать, что окончательный результат стерилизации зависит также от степени загрязнения обрабатываемого материала, т. е., например, от числа терморезистентных спор: чем их больше, тем длительнее должен быть нагрев.

Для достижения температур выше точки кипения воды пользуются **автоклавом**. Температура насыщенного пара зависит от давления (рис. 6.12). При доступе воздуха определенному давлению соответствует значительно более низкая температура. Поскольку гибель микроорганизмов под действием влажного жара зависит от температуры, а не от давления, необходимо закрывать автоклав лишь после того, как воздух будет из него вытеснен водяным паром. Воздух удаляется вместе с выходящим паром или в результате отсасывания. При автоклавировании следует измерять температуру, а не давление, хотя по соображениям простоты и безопасности обычно все еще измеряют давление. Продолжительность стерилизации, естественно, зависит от объема (теплоемкости) сосудов, в которых ее проводят (табл. 6.6).

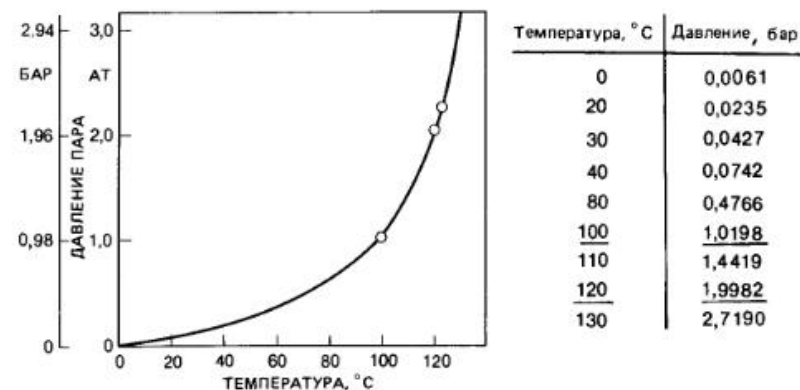


Рис. 6.12. Давление водяных паров при насыщении.

Таблица 6.6. Длительность стерилизации жидкостей в разных сосудах в автоклаве (121–123°C)

Сосуды	Объем, мл	Длительность стерилизации, мин
Пробирки	20	12–14
Колбы Эрленмейера	50	12–14
Колбы Эрленмейера	200	12–15
Колбы Эрленмейера	1000	20–25
Колбы Эрленмейера	2000	30–35
Бутыли	9000	50–55

Нередко удается достичь того же эффекта **дробной стерилизацией** в текучем паре при 100°C (тиндализация). Жидкость стерилизуется в этом случае при 100°C три дня подряд по 30 мин ежедневно; в промежутках между нагреваниями ее хранят в термостате, для того чтобы споры проросли, а затем вегетативные клетки были уничтожены при следующем нагревании.

Для многих целей довольствуются **частичной стерилизацией**, т. е. уничтожением вегетативных форм микроорганизмов. Такого эффекта обычно достигают путем **пастеризации**—выдерживания в течение 5–10 мин при 75 или 80°C. Пастеризацией частично стерилизуют, в частности, молоко; однако, чтобы не испортить его вкуса, время воздействия в этом случае сокращают. Применяют два метода пастеризации молока: кратковременное нагревание (20 с при 71,5–74°C) и сильное нагревание (2–5 с при 85–87°C). **Стерилизации** молока добиваются в результате сверхсильного нагревания. При этом в молоко вводят перегретый водяной пар, доводя температуру смеси до 135–150°C. Молоко подвергается действию этой температуры в течение 1–2 с. Затем, пропускаемая молоко через форсунку, понижают давление и одновременно охлаждают молоко; при этом из него удаляется вода, введенная в виде пара.

Способы **консервирования** ягод и косточковых плодов тоже следует рассматривать как частичную стерилизацию. При обычном нагревании консервных банок в течение 20 мин при 80°C гибнут только вегетативные клетки и споры многих грибов, в то время как споры бактерий остаются жизнеспособными. Прорастанию бактериальных спор препятствуют низкие значения pH, обусловленные присутствием кислот во фруктовом соке. На пастеризованной клубнике часто появляется так называемый «клубничный грибок» *Byssochlamys nivea*. Его аскоспоры выдерживают 86°C; при этой температуре D_{10} составляет 14 мин.

Сухой жар. При стерилизации сухим жаром бактериальные споры переносят более высокие температуры и притом дольше, чем при стерилизации влажным жаром. Поэтому жаростойкую стеклянную посуду, порошки, масла и т. п. стерилизуют в течение 2 ч при 160°C в сухом стерилизаторе. В случае стерилизации материалов с высокой теплоемкостью или термонизоляционными свойствами следует учитывать время

прогрева. В любом случае рекомендуется контролировать температуру с помощью индикаторов или проверять полноту стерилизации (для этого в аппарат помещают также пробу почвы, содержащей споры, которую потом высевают). В тех случаях, когда это позволяет стерилизуемый материал, в настоящее время применяют 30-минутный нагрев при 180°C. Как показывает опыт, при этом погибают все споры. Стерилизация жаром основана на коагуляции клеточных белков.

Фильтрация. Растворы, содержащие термолabile вещества, удобнее всего стерилизовать фильтрованием. Неглазурованные фарфоровые цилиндры (свечи Шамберлана) применялись уже в лаборатории Пастера. В лабораториях и для стерилизации питьевой воды используют фильтры Беркефельда (из прессованного кизельгура). Часто употребляют также асбестовые пластинки (в фильтрах Зейца), стеклянные фильтры и мембранные фильтры. Некоторые из них выпускаются с различной величиной пор, что позволяет даже разделять организмы разной величины и формы.

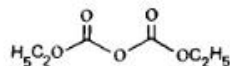
Облучение. Для полной или частичной стерилизации применяют ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи. В лабораторных условиях наибольшее значение имеют ультрафиолетовые лучи. В спектре УФ-лампы преобладает излучение в области 260 нм, поглощаемое главным образом нуклеиновыми кислотами и при достаточно длительном воздействии вызывающее гибель всех бактерий (см. разд. 15.2.2 и рис. 15.5). УФ-облучение используется для частичной стерилизации помещений; при этом бактерии погибают очень быстро, а споры грибов, гораздо менее чувствительные к ультрафиолету, — значительно медленнее. Ионизирующее излучение применяют для стерилизации пищевых продуктов и других компактных материалов.

Химические средства. При стерилизации пищевых продуктов, лекарственных препаратов и разного рода приборов, а также в лабораторной практике оправдало себя применение окиси этилена, которая убивает и вегетативные клетки, и споры, но действует только в том случае, если подвергаемые стерилизации материалы содержат некоторое количество (5–15%) воды. Окись этилена применяют в виде газовой смеси (с N₂ или CO₂), в которой ее доля составляет от 2 до 50%.

Для сохранения термолabile веществ, содержащихся в питательных средах, в практику была введена стерилизация β-пропиолактоном. Он значительно активнее окиси этилена, но обладает, видимо, довольно сильным канцерогенным действием и вызывает ряд других побочных физиологических эффектов. Его добавляют в количестве 0,2% в готовые питательные среды, которые затем инкубируют 2 ч при 37°C. Если оставить среду на ночь, пропиолактон полностью разложится.



β-ПРОПИОЛАКТОН



ДИЭТИЛПИРОКАРБОНАТ



ОКИСЬ ЭТИЛЕНА

Углеводы при этом не затрагиваются. Напитки стерилизуют также диэтилпирокарбонатом (0,003–0,02%).

Для стерилизации семян, используемых при выращивании стерильных растений, пригодны такие обычные антимикробные средства, как бромная вода (1%), сулема (HgCl₂; 1%-ный раствор в спирте), AgNO₃ (0,05%), гипохлорит кальция [1% Ca(ClO)₂], уфулуи и др., которыми воздействуют в течение 5–30 мин. Перед этим семена следует обработать мылом или другим поверхностно-активным веществом, чтобы обеспечить полное смачивание поверхности.

6.6.2 Методы консервирования

Органические материалы разлагаются микроорганизмами, если только против этого не приняты специальные меры. Для сохранения органических веществ (для их консервирования) можно использовать ряд средств. Наибольшее значение имеют методы, обеспечивающие сохранность пищевых продуктов. Этими вопросами занимается пищевая микробиология.

Пищевые продукты становятся негодными к употреблению не только в результате их разложения микроорганизмами (аэробного окисления или анаэробного гниения), но и вследствие того, что на них поселяются бактерии и грибы, образующие токсины. Важнейшими продуцентами токсинов, попадающими в пищевые продукты, являются *Clostridium botulinum* и различные виды стафилококков. *C. botulinum* выделяет экзотоксин, чрезвычайно сильно действующий даже в малых количествах и поражающий нервную систему. Стафилококки образуют энтеротоксин, вызывающий так называемые пищевые отравления. Некоторые грибы образуют микотоксины, из которых наиболее известен афлатоксин (продукт жизнедеятельности гриба *Aspergillus flavus*).

Методы консервирования, применяемые для защиты пищевых продуктов от микроорганизмов, весьма разнообразны. Используются как физические, так и химические методы.

Физические методы. Мы уже говорили о стерилизации с помощью высокой температуры. Металлические консервные банки в большинстве случаев прогревают в автоклаве. Для консервирования кислых плодовых соков достаточно пастеризации, при которой гибнут лишь вегетативные клетки, а споры сохраняют жизнеспособность; эндоспоры бактерий в кислых средах не прорастают.

Плодовые соки, минеральные воды и лекарственные препараты стерилизуют, пропуская через мелкопористые асбестовые или целлюлозные фильтры. При производстве вина прибегают к центрифугированию и фильтрации, чтобы прервать брожение на нужной стадии (для сохранения «остаточного сахара»).

Старый и широко распространенный способ консервирования пищевых продуктов путем сушки основан на том, что для роста микроорганизмов необходима определенная влажность (обычно более 10% воды). Овсяные хлопья, сушеные фрукты, сено, зерно в элеваторах сохраняются именно благодаря своему сухому состоянию; во влажном воздухе, отсырев, они быстро портятся под воздействием грибов и бактерий.

Возможности консервирования облучением пока еще ограничены. Ультрафиолетовые лучи используют главным образом для стерилизации воздуха на

молочных заводах, промышленных холодильниках, хлебозаводах и в других аналогичных местах. Консервирование пищевых продуктов с помощью ионизирующих излучений в принципе возможно, так как эти излучения обладают высокой проникающей способностью; однако такой метод не получил еще широкого распространения. Надежным способом, начинающим даже в домашнем хозяйстве конкурировать с квашением и другими способами домашнего консервирования, является хранение продуктов при низкой температуре. В камерах для глубокого замораживания продукты хранят при температуре ниже -20°C . При такой температуре жизнеспособность микроорганизмов заметно не снижается и разрушения их токсинов не происходит, однако рост полностью прекращается. Даже психрофильные бактерии не могут расти при температуре ниже -12°C .

Химические методы. Консервирование путем подкисления основано на том, что при низких рН без доступа воздуха растут лишь немногие микроорганизмы. Для их уничтожения достаточно простой пастеризации. Термоустойчивые споры при рН ниже 5,0 не прорастают. Естественное подкисление, происходящее в результате молочнокислого брожения, используют для приготовления кислой капусты, силоса, соленых огурцов и сырокопченых колбас (салами, сервелата). Нередко для консервирования к продукту добавляют уксусную, молочную, винную или лимонную кислоту. При доступе воздуха непастеризованные кислые продукты разлагаются под действием дрожжей и других грибов.

Мясные и рыбные продукты консервируют копчением. Копчение связано с воздействием содержащихся в копильном дыму продуктов возгонки— фенолов, крезолов, альдегидов, уксусной и муравьиной кислот. Все эти вещества обладают антисептическими свойствами. Действие их усиливается благодаря удалению из обрабатываемого продукта части влаги.

Для соления продукты помещают в 14–25%-ный раствор поваренной соли. В результате снижается содержание воды в продукте и подавляется рост микроорганизмов, вызывающих порчу. Способность к размножению сохраняют в таких условиях лишь немногие галофильные бактерии.

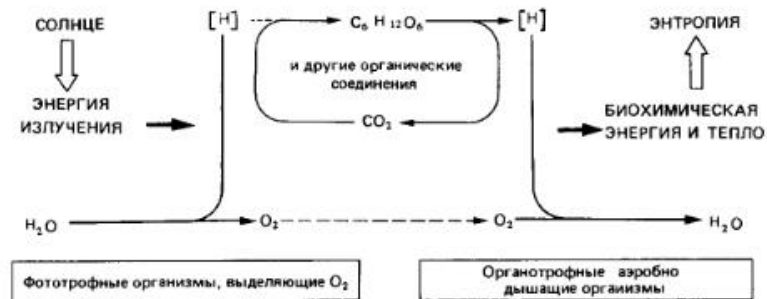
Сахар в высокой концентрации (примерно 50% сахарозы) также подавляет рост микроорганизмов. Мармелад и различные сиропы сохраняются в первую очередь благодаря высокому содержанию кислот и сахара.

Для сохранения ряда пищевых продуктов приходится применять химические консерванты. К вину с этой целью ранее добавляли сернистую кислоту; вино и фруктовые соки можно (если это вообще необходимо) консервировать добавлением диэтилпирикарбоната.

Для консервирования пищевых продуктов используют также сорбиновую, бензойную или муравьиную кислоту. Плоды цитрусовых обрабатывают дифенилом или о-фенилфенолатом. Делаются попытки применять для консервирования антибиотики.

7. Основные механизмы обмена веществ и преобразования энергии

Рассматривая круговорот углерода, мы уже противопоставляли друг другу два процесса: фотосинтез, при котором фиксируется CO_2 и выделяется O_2 , и минерализацию органических веществ, связанную с потреблением O_2 и освобождением CO_2 . Процессы эти противоположны. С точки зрения массообмена важнее всего переход углерода из газообразного неорганического вещества в полутвердые и твердые органические соединения и обращение этого процесса. Если же рассматривать оба этих процесса с позиций энергообмена, т. е. преобразования энергии, то углерод имеет меньшее значение, чем водород. Еще Ю. Р. Майер (1848) сформулировал положение: «Растения поглощают одну силу— свет— и создают другую— химическое различие» («сила» здесь в смысле «энергия»). В процессе фотосинтеза лучистая энергия Солнца преобразуется в химическую энергию; вода при этом разлагается на кислород и водород, а последний в результате связывания с углеродом (из CO_2) переводится в метастабильное состояние (см. схему). Большая часть та-



кого стабилизированного водорода временно сохраняется в виде углеводов. Создаваемая растениями разность потенциалов между водородом и кислородом служит источником энергии для всех дышащих кислородом живых существ. В их организмах водород снова высвобождается из соединения с углеродом и соединяется с кислородом в «биохимической реакции гремучего газа» с выделением энергии. Это окисление водорода—многоступенчатый процесс, в ходе которого освобождаясь энергия может отдельными порциями превращаться

в биохимическую энергию. В глобальном масштабе система «фототрофные растения–органотрофные живые существа» включается в процесс преобразования энергии излучения в тепло и приводит к замедлению роста энтропии.

7.1 Важнейшие общие представления

Метаболизм и метаболические пути. Как во время роста, так и в состоянии покоя вегетативные клетки нуждаются в постоянном притоке энергии. Живая клетка представляет собой высокоорганизованную материю. Энергия необходима не только для создания такой организации, но и для ее поддержания. Эту энергию организм получает в процессе обмена веществ, или метаболизма, т.е. путем регулируемых превращений, которым различные вещества подвергаются внутри клеток. Источниками энергии служат питательные вещества, поступающие из внешней среды. В клетках эти вещества претерпевают ряд изменений в результате последовательных ферментативных реакций, образующих этапы определенных метаболических путей. Такие пути выполняют две главные функции: они, во-первых, поставляют **материалы-предшественники** для построения клеточных компонентов и, во-вторых, обеспечивают **энергию** для клеточных синтезов и других процессов, требующих затраты энергии.

Превращения веществ в клетке (**обмен веществ**, или **метаболизм**), в результате которых из сравнительно простых предшественников, например глюкозы, жирных кислот с длинной цепью или ароматических соединений, образуется новое клеточное вещество, можно ради простоты подразделить на три основные группы. Сначала питательные вещества расщепляются на небольшие фрагменты (**распад**, или **катаболизм**), а затем в ходе реакций **промежуточного обмена**, или **амфиболизма**, они превращаются в ряд органических кислот и фосфорных эфиров. Эти два пути переходят незаметно один в другой. Многообразные низкомолекулярные соединения—это тот субстрат, из которого синтезируются основные строительные блоки клетки. «Строительными блоками» мы называем аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, фосфорилированные сахара, органические кислоты и другие метаболиты—конечные продукты цепей биосинтеза, иногда длинных. Из них строятся полимерные **макромолекулы** (нуклеиновые кислоты, белки, резервные вещества, компоненты клеточной стенки и т.п.), из которых состоит клетка. Эти два этапа биосинтеза клеточных веществ—синтез строительных блоков и синтез полимеров—составляют **синтетическую** ветвь метаболизма, или **анаболизм** (рис. 7.1).

Биохимическое единство. Принцип «биохимического единства»—одна из немногих догм, признаваемых в нашем веке. Согласно этому принципу, все живые существа, обитающие на Земле, в биохимическом отношении в основе своей сходны. Этот принцип выражается, например, в единообразии строительных блоков (в том числе в однотипности их

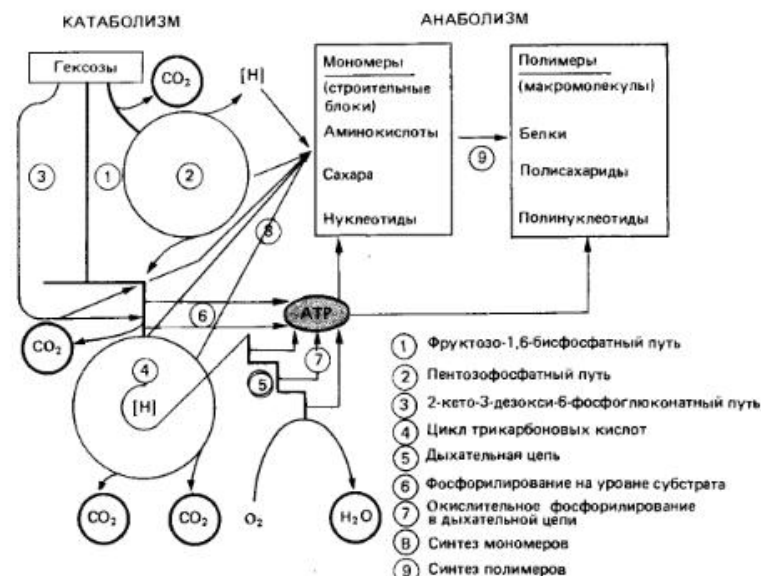


Рис. 7.1. Схема обмена веществ у аэробно дышащих клеток, расщепляющих гексозы.

оптического вращения), во всеобщей роли аденозинтрифосфата (АТФ) как элементарного кванта биологической энергии, в универсальности генетического кода, а также в единстве путей превращения сахаров и природы дыхательной цепи. Почти идентичны у всех живых существ и главные метаболические пути. Существует лишь несколько групп бактерий, у которых основные схемы метаболизма так или иначе модифицированы—преобладают какие-то определенные пути, а другие укорочены или иным образом изменены. Все варианты обмена веществ микроорганизмов без труда можно свести к общей схеме. Метаболические пути складывались, очевидно, в ходе эволюции, и можно думать, что типичный для аэробных организмов биохимический аппарат возник сравнительно поздно, когда в воздухе появился кислород. В настоящее время трудно решить, что представляет собой укороченные метаболические пути—примитивные особенности или результат деградации.

Катаболизм углеводов. Как уже отмечалось при описании круговорота углерода, углеводы—главный продукт фотосинтеза у растений. В то же время для большинства микроорганизмов они служат основными питательными веществами. Поэтому в дальнейшем при рассмотрении питательных веществ—субстратов клеточного метаболизма—мы будем в первую очередь говорить о глюкозе. Что касается других природных веществ, используемых микроорганизмами в качестве субстратов, то о них речь пойдет позже в связи с другими явлениями (гл. 14). Макромолекулы, как правило, сначала расщепляются вне клетки выделяемыми

ми ею ферментами (экзоферментами) на мономерные и димерные блоки и лишь в такой форме поглощаются клеткой.

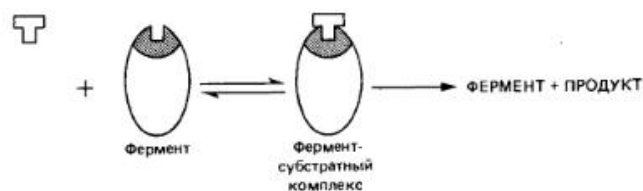
Гексозы после ряда предварительных этапов расщепляются «пополам». Продукты расщепления превращаются в пировиноградную кислоту (пируват), которая занимает ключевое положение в промежуточном метаболизме, так как служит исходным соединением во многих процессах синтеза и распада. В результате декарбоксилирования пирувата образуются C_2 -соединения, которые связываются сначала с подходящей акцепторной молекулой (оксалоацетатом), а затем в **цикле трикарбоновых кислот**, называемом также циклом лимонной кислоты, постепенно окисляются до CO_2 . Оксалоацетат (щавелевоуксусная кислота) в этом циклическом процессе регенерируется. Атомы водорода (или восстановительные эквиваленты), отщепившиеся на разных этапах окисления органических веществ, поступают в АТФ-регенерирующую систему дыхательной цепи (окислительное фосфорилирование). При каждом обороте цикла трикарбоновых кислот из одного C_2 -соединения (ацетилкофермента А) образуются две молекулы CO_2 и четыре раза по $2[H]$. Эти реакции выравнивают баланс цикла трикарбоновых кислот.

К промежуточным соединениям цикла трикарбоновых кислот относятся органические кислоты, поставляющие исходный материал для процессов биосинтеза (2-оксоглутарат, сукцинат, оксалоацетат). Таким образом, цикл трикарбоновых кислот не только участвует в конечном окислении питательных веществ, но служит также важным «распределителем», поставляющим исходные соединения для синтеза основных структурных единиц («строительных блоков») клетки. Если бы указанные кислоты постоянно выводились из цикла, то регенерации молекулы-акцептора не происходило бы и цикл был бы нарушен. Так называемые **анаэробные последовательности реакций** обеспечивают поступление в цикл трикарбоновых кислот все новых количеств промежуточных соединений взамен израсходованных для биосинтеза. Эти анаэробные последовательности имеют особо важное значение для тех организмов, которые растут за счет простых одно- или двухуглеродных соединений или других субстратов, разлагающихся на такие же простые соединения.

Роль ферментов. Химические превращения осуществляются в клетке с помощью ферментов. За каждое превращение одного метаболита в другой ответствен особый фермент. Ферменты представляют собой белки, обладающие каталитической функцией. Основные свойства ферментного белка заключаются в его способности распознавать определенные метаболиты, катализировать их превращения и обеспечивать регуляцию каталитической активности.

Катализируемая ферментом реакция начинается со связывания определенного метаболита (субстрата) с ферментным белком. Каждый фермент взаимодействует, как правило, лишь с одним метаболитом – своим субстратом – и катализирует его превращение в другой метаболит до установления равновесия. Таким образом, каждый фермент характери-

зуется определенной **субстратной специфичностью** (взаимодействует только с одним метаболитом и продуктом его превращения) и определенной **специфичностью действия** (катализирует лишь одно из многочисленных превращений, которым может подвергаться данный метаболит). **Узнавание субстрата** ферментом происходит в процессе связывания. Субстрат присоединяется в совершенно определенном участке молекулы ферментного белка – так называемом **каталитическом центре**. Стерические свойства субстрата и распределение зарядов в его молекуле служат теми признаками, по которым субстрат распознается ферментом. Субстрат и фермент подходят друг к другу, как ключ к замку.

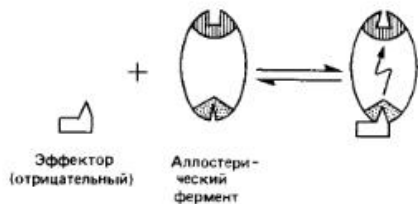


Ферментные белки действуют как **биокатализаторы**, снижая энергию активации. Химические превращения метаболита на ферменте протекают при обычной температуре. Ферменты, таким образом, обеспечивают протекание таких реакций, которые без них могли бы происходить только при высокой температуре или при других нефизиологических условиях, которые клетка не могла бы выдержать.

Скорость реакции, катализируемой ферментом, примерно на 10 порядков выше, чем скорость неферментативной реакции; увеличение скорости в 10^{10} раз сокращает полупериод какой-либо реакции с 300 лет до одной секунды.

Очень важное свойство ферментов, окончательно установленное лишь сравнительно недавно, состоит в том, что их каталитическая активность подвержена регуляции. Эта регулируемость ферментной активности – одно из возможных объяснений гармоничного протекания всех метаболических процессов в клетке. По крайней мере некоторые ферменты (хотя бы по одному в каждом специфическом пути биосинтеза) подвергаются регуляторным воздействиям. Такие ферменты с помощью своего каталитического центра распознают субстрат, а с помощью другого центра – конечный продукт данной цепи реакций или иные низкомолекулярные вещества, определенным образом влияющие на их активность. У этих ферментов имеется второй связывающий участок – регуляторный центр. Связывание конечных продуктов или других метаболитов, называемых также **эффекторами**, влияет на каталитический центр, изменяя его активность. Конечные продукты действуют как отрицательные эффекторы. Положительные эффекторы повышают активность фермента. Таким образом, концентрации метаболитов, играющих роль эффекторов, определяют активность фермента, а тем самым

и скорость соответствующих превращений. Эффекторы по своей структуре не имеют ничего общего с субстратами ферментов. Они стерически отличны от субстратов. Поэтому говорят об *аллостерических эффекторах*, а центры, ответственные за регуляцию, называют *аллостерическими центрами* ферментов.



Коферменты и простетические группы. В связывании и последующем переносе отдельных фрагментов субстрата, например водорода, метильных групп, аминогрупп и т.п., наряду с ферментными белками участвуют низкомолекулярные соединения — так называемые *коферменты* и *простетические группы* (табл. 7.1, рис. 7.2). Коферменты и простетические группы более или менее прочно связаны с ферментами. Веще-

Таблица 7.1. Коферменты и простетические группы, функционирующие как переносчики водорода, различных групп или электронов, и отношение их к витаминам

Кофермент или простетическая группа ¹	Функция (что подвергается переносу)	Витамин
NAD (P)	(221) Водород, e ⁻	Никотиновая кислота
FMN	(237) Водород, e ⁻	Рибофлавин
FAD	(219) Водород, e ⁻	Рибофлавин
Убихинон	(237) Водород, e ⁻	
Цитохромы	(237) e ⁻	Производные гема
Биотин	Карбоксильные группы	Биотин
Пиридоксаль-фосфат	(432) Аминогруппы	Пиридоксин
Тетрагидрофолиевая кислота	(301) Формильные группы	Фолиевая кислота, 4-аминобензойная кислота
Кофермент А	(219) Ацильные группы	Пантотеновая кислота
Липоевая кислота	(219) Ацильные группы и водород	Липоевая кислота
Тиаминпирофосфат	(219) Альдегидные группы	Тиамин
Кофермент В ₁₂	Карбоксильные группы (перемещение внутри молекулы); метильные группы	Кобаламин

¹ Цифры в скобках указывают, на какой странице приводится химическая формула.

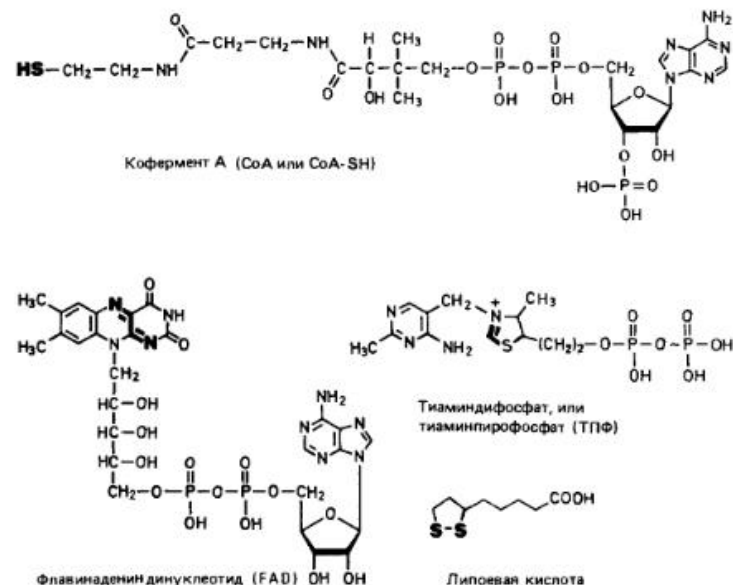


Рис. 7.2. Структурные формулы некоторых коферментов и простетических групп. Активные группы выделены жирным шрифтом.

ства, которые на ферментном белке присоединяют к себе фрагмент субстрата, а затем отделяются от него, чтобы передать этот фрагмент на другом ферментном белке второму соединению, называют *коферментами* (более точным было бы название *косубстраты* или *переносчики*). Низкомолекулярные соединения, прочно связанные с белковой частью фермента и не отделяющиеся от нее во время присоединения и переноса фрагментов субстрата, называются *простетическими группами* этих ферментов.

Коферменты имеют особое значение, так как многие организмы не способны их синтезировать и должны получать с пищей в виде витаминов. Многим молочнокислым бактериям, почвенным и водным бактериям, а также другим одноклеточным организмам для роста необходимы те или иные из витаминов, приведенных в табл. 6.2, или их предшественники, которые добавляют в питательную среду.

Преобразование энергии. Кратко обрисованные выше пути метаболизма (превращения глюкозы, цикл трикарбоновых кислот, дыхательная цепь) приводят к окислению сахара до CO₂ и воды. При этом освобождается столько же энергии, сколько при сжигании сахара; но благодаря тому, что окисление глюкозы разбито на ряд отдельных ферментативных реакций, теоретически полностью обратимых, выделяющаяся при окислении энергия может переводиться в биохимически доступную форму без значительного повышения температуры.

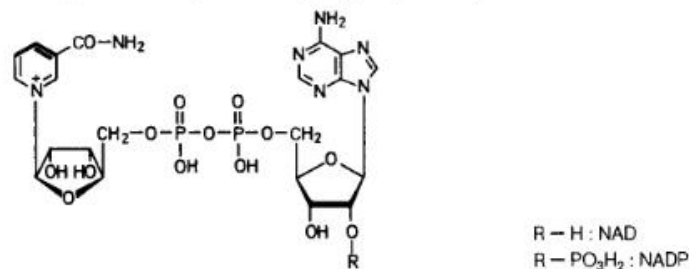
Во многих реакциях освобождаются лишь незначительные количества энергии. Такие минимальные выходы энергии полезны для клетки лишь в тех случаях, когда равновесие реакции сдвинуто в сторону образования продуктов. При некоторых превращениях, связанных с выделением большого количества свободной энергии ($-\Delta G = -40-60$ кДж/моль, или $10-15$ ккал/моль), эта энергия запасается в процессе **фосфорилирования на уровне субстрата** в форме АТФ и может затем использоваться в реакциях, требующих затраты энергии. В такой регенерации АТФ участвуют как субстраты (промежуточные соединения), так и ферменты. Однако большая часть энергии, выделяющейся в результате окисления питательных веществ, переводится в доступную для клетки форму (в высокоэнергетические связи АТФ) в процессе окислительного фосфорилирования в электрон-транспортной (дыхательной) цепи.

Метаболиты. Уже при поверхностном знакомстве с веществами, участвующими в клеточном метаболизме, легко заметить, что многие из них находятся в фосфорилированном состоянии, т.е. в форме эфиров фосфорной кислоты. Нефосфорилированные промежуточные продукты содержат карбоксильные группы или ионизирующиеся основные группы. Создается впечатление, что ферменты могут воздействовать только на те метаболиты, в которых имеется ионизированная, т.е. заряженная, группа. Незаряженные молекулы или группы всегда связаны с коферментами или простетическими группами ферментов; некоторые образуют шиффовы основания с диаминокислотой лизиним, содержащейся в активном центре ферментного белка. Неионизированными бывают лишь соединения, стоящие в начале и в конце тех или иных метаболических путей; таковы многие субстраты и некоторые выделяемые клеткой продукты обмена (глюкоза, фруктоза, этанол, ацетон, 2-пропанол, бутанол, глицерол и т.д.). Остается пока открытым вопрос о том, связано ли наличие ионизированных промежуточных соединений с функциями ферментов или с особой способностью клетки удерживать такие метаболиты.

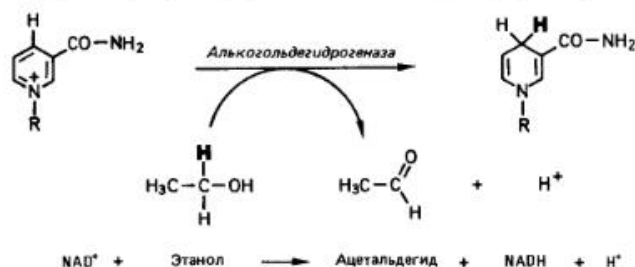
Дегидрирование и пиридиннуклеотиды. Окисление органических соединений происходит путем переноса электронов от донора к акцептору. При биологическом окислении субстрата чаще всего происходит одновременный перенос двух электронов; при этом от субстрата отщепляются также два протона (H^+). Такое окисление субстрата, формально происходящее с отщеплением двух атомов водорода, называется дегидрированием. Нередко термины **донор водорода** и **донор электронов** употребляются как синонимы; равнозначны и такие термины, как **акцептор водорода** и **акцептор электронов**; **окисление и дегидрирование**; **восстановление и гидрирование**.

Ферментные белки, отщепляющие от субстратов атомы водорода, называются *дегидрогеназами*, причем в названиях некоторых из них содержится указание на донор водорода (лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа и т.д.). Многие дегидрогеназы переносят водород на один из

двух коферментов — никотинамидадениндинуклеотид (NAD) или никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP).



Группой, определяющей функцию обоих коферментов, является амид никотиновой кислоты. Один водород переносится с субстрата вместе с парой электронов (в виде гидрид-иона) на пиридиновое кольцо, второй переходит в раствор. Этот перенос стереоспецифичен: одни ферменты (алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа) переносят водород на одну сторону пиридинового кольца, а другие (глицеральдегидфос-



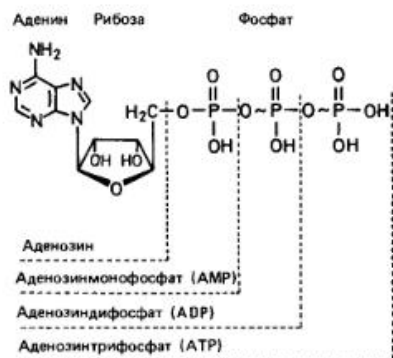
фат-дегидрогеназа) — на другую сторону. Для краткости такое обратимое дегидрирование изображают следующим образом:



У восстановленных форм обоих коферментов в отличие от окисленных форм максимум поглощения лежит при 340 нм. Поэтому восстановление и окисление коферментов можно проследить по изменению поглощения в соответствующей области спектра. На этом основаны многие оптические методы определения активности ферментов.

Оба кофермента свободно диссоциируют, т.е. отделяются от одного белка-дегидрогеназы и переносят водород после связывания с другой дегидрогеназой на другой акцептор. Поэтому их называют также переносчиками водорода. NADH₂ переносит водород в основном на предшественники конечных продуктов брожения или же передает его в дыхательную цепь, в то время как NADPH₂ участвует главным образом в восстановительных этапах процессов биосинтеза.

АТФ и другие высокоэнергетические соединения. Процессы, требующие затраты энергии, могут осуществляться в клетке благодаря аденозинтрифосфату (АТФ). В форме АТФ энергия, полученная в результате фотосинтеза, дыхания или брожения, становится доступной для клетки и может быть ею использована. АТФ – универсальный переносчик химической энергии между реакциями, доставляющими энергию, и реакциями, потребляющими ее (это вещество называют «энергетической валютой»



клетки). АТФ служит непосредственным источником энергии для таких разнообразных процессов, как синтез структурных компонентов макромолекул, механическое движение и осморегуляция. Пирофосфатные связи между фосфатными группами «богаты энергией». Это означает, что у них **высокий потенциал переноса групп**. Для образования этих связей требуется больше энергии, чем для образования обычной эфирной свя-

Таблица 7.2. «Богатые» и «бедные» энергией соединения, имеющие биохимическое значение. Указана свободная энергия $-\Delta G'_0$ гидролиза при рН 7,0 в стандартных условиях

Субстрат	$-\Delta G'_0$	
	кДж	ккал
Ацетилфосфат	44,0	10,5
Ацетоацетил-СоА	44,0	10,5
Ацил-АМР	55,7	13,3
Креатинфосфат	37,7	9,0
Фосфоенолпируват	54,4	13,0
Простые фосфорные эфиры	12,6	3,0
Гликозиды	12,6	3,0
Сахароза	27,6	6,6
UDP-глюкоза	31,8	7,6
Альдозо-1-фосфат	20,9	5,0
АТФ (\rightarrow ADP + P _i)	31,0	7,4
АТФ (\rightarrow AMP + PP _i)	31,8	7,6

зи; соответственно и при их разрыве тоже выделяется много энергии (при гидролизе изменение свободной энергии $\Delta G'_0 \approx -30$ кДж) или же она запасается в продуктах реакции (табл. 7.2).

АТФ как кофермент для активации метаболитов. Многие промежуточные соединения нуждаются в активации путем переноса групп. При этом возможны три способа расщепления АТФ:

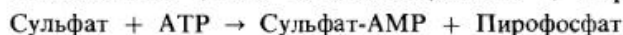
1. Сахара активируются путем превращения в соответствующие фосфорилированные производные:



2. Рибозо-5-фосфат активируется в результате переноса дифосфатного остатка (пирофосфата):



3. Некоторые из неорганических кислот, все аминокислоты и неорганический сульфат активируются путем присоединения АМР-группы с освобождением пирофосфата:



Доведение реакции до конца (т.е. завершение такого превращения) обеспечивается тем, что образующийся пирофосфат расщепляется пирофосфатазой и тем самым выводится из сферы реакции. Таким образом, активация этих метаболитов обходится клетке в две высокоэнергетические связи.

Приведенных сведений, вероятно, достаточно для того, чтобы ясно показать универсальное значение АТФ, а также подвести читателя к пониманию различных типов метаболизма у бактерий. Знакомясь с этими типами, следует иметь в виду, что клетка, используя в данных условиях доступные ей питательные вещества, всегда стремится получить возможно большее количество АТФ.

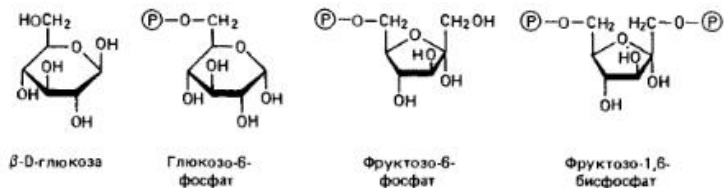
Синтез (регенерация) АТФ осуществляется в основном с помощью трех процессов: фотосинтетического фосфорилирования (разд. 12.2), окислительного фосфорилирования (фосфорилирование в дыхательной цепи, разд. 7.4) и фосфорилирования на уровне субстрата (разд. 7.2.1). Два первых процесса сходны между собой в том, что АТФ образуется в них при участии *АТФ-синтазы*. Субстратное фосфорилирование может происходить при различных реакциях промежуточного метаболизма. В обмене углеводов важнейшие реакции, приводящие к регенерации АТФ, катализируются *фосфоглицераткиназой*, *пируваткиназой* и *ацетаткиназой*. Бактерии и дрожжи, сбраживающие сахара, располагают лишь тем АТФ, который образуется с помощью этих ферментов. Во всех таких процессах фосфорилирования (за редкими исключениями) акцептором фосфата служит аденозиндифосфат (ADP). Аденозинмонофос-

фат (АМР), прежде чем он будет фосфорилирован в АТФ, должен превратиться в АДФ в реакции, катализируемой *аденилаткиназой* ($AMP + ATP \rightarrow 2ADP$).

Ниже будут кратко описаны четыре важнейших этапа катаболизма глюкозы – начальное расщепление ее до C_3 -соединений, цикл трикарбоновых кислот, окисление пирувата и дыхательная цепь, а также функции этих процессов. При этом мы остановимся на некоторых подробностях, важных для понимания ряда специализированных метаболических процессов. Для более глубокого ознакомления с физиологией обмена веществ и биохимией микроорганизмов необходимо обратиться к учебникам по биохимии.

7.2 Пути натаболизма гексоз

Несколько путей ведут от глюкозы к C_3 -соединениям и среди них к пирувату – одному из важнейших промежуточных продуктов метаболизма. Чаще других используется путь распада через образование фруктозо-1,6-бисфосфата; его называют *фруктозобисфосфатным путем*, гликолитическим расщеплением, гликолизом или (по имени изучивших его исследователей) путем Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (рис. 7.3). Другой ряд реакций, к осуществлению которых способно большинство организмов, образует цикл, известный под названием окислительного пентозофосфатного пути, гексозомонофосфатного пути или схемы Варбурга – Диккенса – Хореккера (рис. 7.4). Обратная последовательность, реакций этого пути включает важные этапы, ведущие к регенерации акцептора CO_2 при автотрофной фиксации углекислоты. Только у бактерий встречается, видимо, путь Энтнера – Дудорова, или, как его еще называют, КДФГ-путь (по характерному промежуточному продукту – 2-кетогексозо-3-дезоксиглюкононату, КДФГ; рис. 7.5). Другие сходные механизмы распада гексоз имеют более специальное значение.



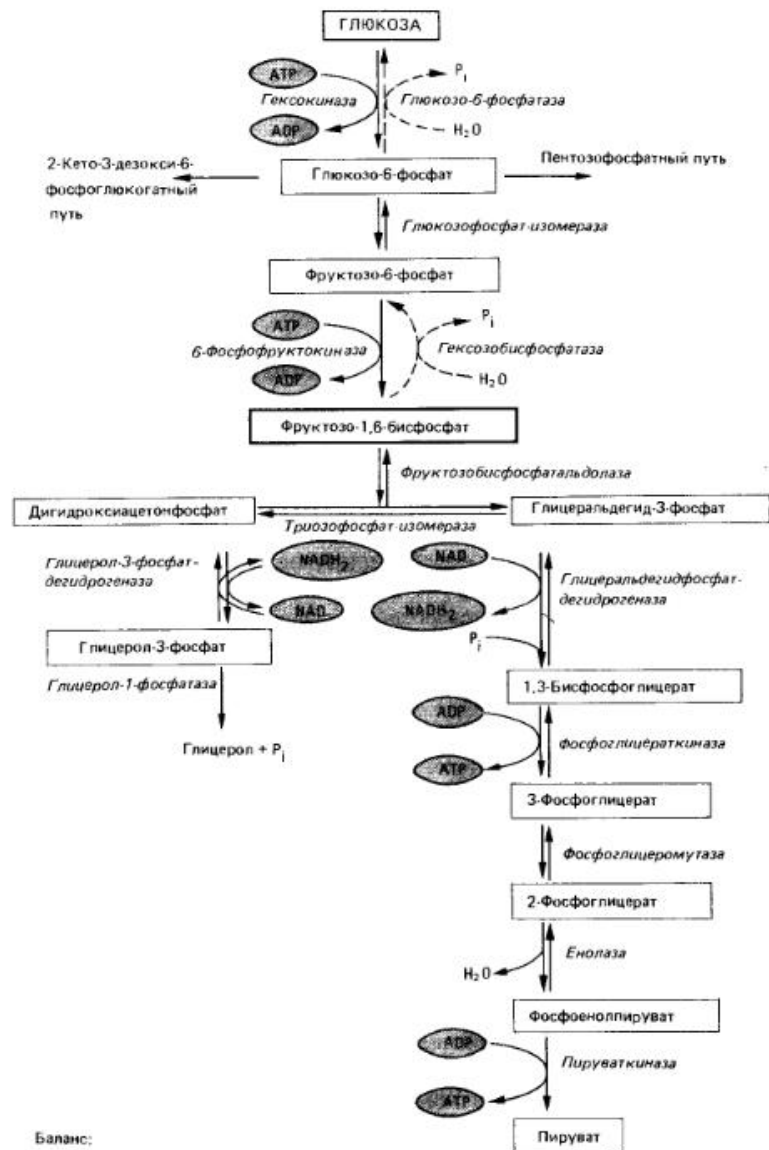
Глюкоза в клетке сначала фосфорилируется обычно в положении 6 при участии *гексокиназы* как катализатора и АТФ как донора фосфата. Глюкозо-6-фосфат представляет собой метаболически активную форму глюкозы в клетке и служит исходным пунктом для любого из трех упомянутых путей распада.



7.2.1 Фруктозо-1,6-бисфосфатный путь (гликолиз)

На фруктозобисфосфатном пути (рис. 7.3) глюкозо-6-фосфат при подготовке к расщеплению изомеризуется *глюкозофосфат-изомеразой* в фруктозо-6-фосфат; затем происходит фосфорилирование в положении 1 под действием *фосфофруктокиназы* за счет АТФ. Образовавшийся фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется *фруктозобисфосфат-альдозазой* до дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата. Оба триозофосфата находятся в равновесии между собой; установление этого равновесия катализируется *триозофосфат-изомеразой*. Дигидроксиацетонфосфат может восстанавливаться глицеролфосфат-дегидрогеназой до глицеролфосфата, который гидролизует глицерол-1-фосфатазой с образованием глицерола и ортофосфата. Обычно же сначала происходит превращение образовавшегося под действием альдозазы дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат, который затем окисляется.

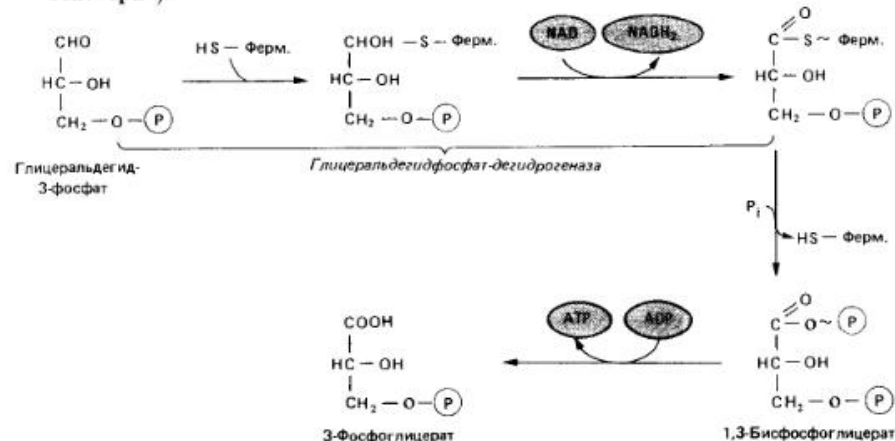
Последующее дегидрирование представляет собой с энергетической стороны важнейший этап данного пути, а также других путей, приводящих к образованию глицеральдегид-3-фосфата. Часть энергии, освобождающейся при окислении глицеральдегид-3-фосфата в 3-фосфоглицерат ($\Delta G'_0 = -67$ кДж), сохраняется в форме высокоэнергетического фосфата. Сначала происходит присоединение альдегидной группы к SH-группе глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы, а затем отщепление водорода, который переносится на NAD. Образовавшийся ацил-S-фермент представляет собой тиозфир, богатый энергией. В результате фосфорилиза (при котором ацильная группа отделяется от фермента с присоединившимся к ней ортофосфатом) эта энергия сохраняется в 1,3-бисфосфоглицерате. При участии фосфоглицераткиназы богатая энергией фосфатная группа переносится на АДФ с образованием 3-фосфоглицерата и АТФ. Такого рода процесс называют *фосфорилированием на уровне субстрата*. Для предшествующего окисления глицеральдегид-3-фосфата



Баланс:
Глюкоза + 2 H₂O → 2 Пируват + 2 ATP + 2 NADH₂

Рис. 7.3. Фруктозо-1,6-бисфосфатный путь расщепления глюкозы (гликолиз).

наряду с ферментом необходимы также ортофосфат и ADP. В случае их отсутствия расщепление глюкозы на этом уровне прекращается. Это имеет значение для регуляции процесса распада глюкозы («эффект Пастера»).



Под действием *фосфоглицеромутазы* 3-фосфоглицерат превращается в 2-фосфоглицерат, из которого в результате отнятия воды (катализируемого *енолазой*) образуется *фосфоенолпируват*. Это тоже высокоэнергетический фосфат, с которого богатая энергией фосфатная группа переносится *пируваткиназой* на ADP и таким образом сохраняется. Образующийся при этом пируват служит исходным пунктом дальнейших процессов расщепления, преобразования и синтеза. Все реакции фруктозо-1,6-бисфосфатного пути, за исключением трех (гексокиназной, 6-фосфофруктокиназной и пируваткиназной), полностью обратимы.

Если весь триозофосфат, образовавшийся в результате расщепления фруктозо-1,6-бисфосфатного пути, за исключением трех (гексокиназной, катаболизма глюкозы по фруктозо-1,6-бисфосфатному пути складывается из двух молекул пирувата, двух (4 минус 2) молекул ATP и двух молекул NADH₂.

Обе реакции, протекающие с выделением энергии при превращении триозофосфата в пируват, служат для анаэробных организмов важнейшими этапами, доставляющими энергию. В анаэробных условиях все микроорганизмы, сбраживающие углеводы (за немногими исключениями), используют энергию, получаемую в результате окисления глицеральдегидфосфата в пируват.

7.2.2 Пентозофосфатный путь

В пентозофосфатном пути (рис. 7.4) глюкозо-6-фосфат дегидрируется *глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой*; при этом водород переносится на NADP и образуется 6-фосфоглюконолактон, который спонтанно или при

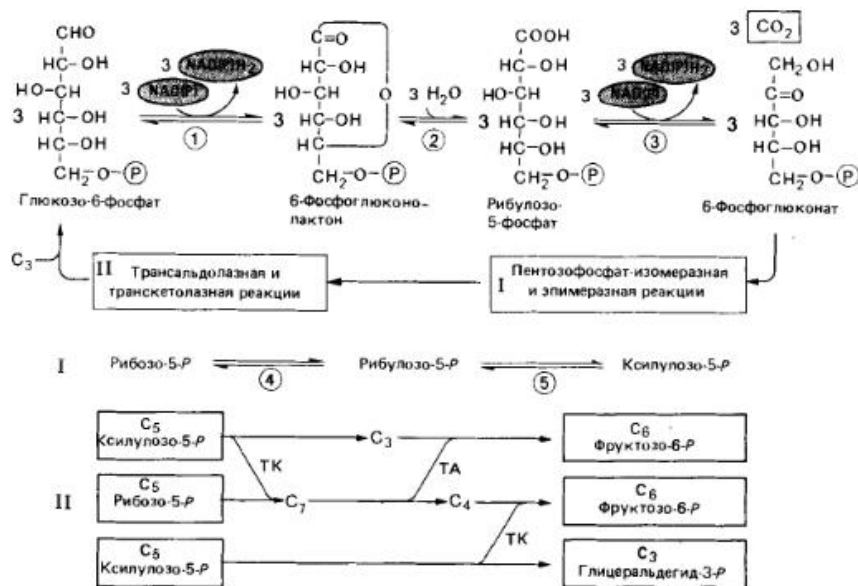


Рис. 7.4. Пентозофосфатный путь окислительного расщепления глюкозо-6-фосфата. Вверху представлен пентозофосфатный цикл. Окислительные этапы заканчиваются образованием рибулозо-5-фосфата. Рибулозо-5-фосфат находится в равновесии с рибозо-5-фосфатом и ксилулозо-5-фосфатом, что обеспечивается ферментативным катализом. Пентозофосфаты при участии транскетолазы и трансальдозы превращаются в два фруктозофосфата и один глицеральдегидфосфат. Эта последовательность реакций полностью обратима и в обратном направлении включается в рибулозобисфосфатный цикл фиксации CO₂, в рибулозомонофосфатный цикл фиксации формальдегида и другие циклы. Участвующие ферменты (цифры в кружках): 1 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 2 – лактоназа; 3 – 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; 4 – фосфорибозоизомеразы; 5 – рибулозо-5-фосфат-3-эпимеразы; 6 – транскетолаза; 7 – трансальдоза.

участии фермента (глюконолактоназы) гидролизуется до 6-фосфоглюконата. Этот последний дегидрируется дегидрогеназой до 3-кето-6-фосфоглюконата, из которого затем путем декарбокислирования образуется **рибулозо-5-фосфат**. Этим завершается собственно процесс окисления.

Последующие реакции надо рассматривать только как процессы превращения пентозофосфатов в гексозофосфаты и обратно. Благодаря включению такой последовательности реакций окислительный пентозофосфатный путь замыкается в цикл. Рибулозо-5-фосфат находится в равновесии с рибозо-5-фосфатом и ксилулозо-5-фосфатом. Рибозофосфат – важный предшественник в процессе синтеза нуклеотидов и нуклеиновых кислот. При участии транскетолазы и трансальдозы пентозофосфаты превращаются в две молекулы фруктозо-6-фосфата и одну молекулу глицеральдегид-3-фосфата. В результате изомеризации фрук-

тозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат и конденсации двух молекул триозофосфата в гексозофосфат все перечисленные реакции замыкаются в один цикл, при одном обороте которого из трех молекул глюкозо-6-фосфата образуются две молекулы фруктозо-6-фосфата, одна молекула глицеральдегид-3-фосфата, три молекулы CO₂ и трижды по две молекулы NADPH₂. Ферменты глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа и фосфоглюконатдегидрогеназа у многих (если не у большинства) бактерий переносят водород с субстратов не только на NADP, но и на NAD.

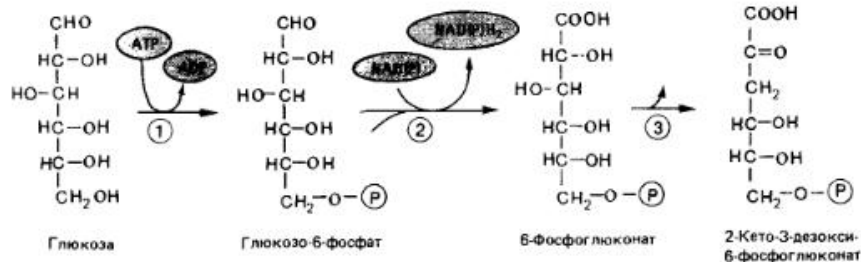
Описанный цикл представляет собой явно побочный путь, значение которого следует видеть в подготовке важных исходных веществ (пентозофосфатов, эритрозофосфата, глицеральдегид-3-фосфата), а также получении восстановительных эквивалентов (NADPH₂) для процессов синтеза. Пентозофосфаты – предшественники нуклеотидов и нуклеиновых кислот – образуются путем дегидрирования и декарбокислирования глюкозо-6-фосфата, а также в транскетолазной и трансальдозной реакциях из фруктозо-6-фосфата.

7.2.3 2-Кето-3-дезоксиглюконол-6-фосфоглюконатный путь

Глюкозо-6-фосфат сначала, как это было описано выше для пентозофосфатного пути, дегидрируется до 6-фосфоглюконата. Под действием *фосфоглюконатдегидратазы* от него отщепляется вода и образуется **2-кето-3-дезоксиглюконол-6-фосфоглюконат** (рис. 7.5). Кетодезоксифосфоглюконол расщепляется специфической альдозазой на пируват и глицеральдегид-3-фосфат. Последний окисляется до пирувата, так же как и в фруктозобисфосфатном пути.

В отношении образования ATP, NADH₂ и NADPH₂ между описанными путями катаболизма сахаров имеются существенные различия. На каждый моль глюкозы, окисляемой до пирувата по фруктозобисфосфатному пути, образуется 2 моля ATP и 2 моля NADH₂, а при 2-кето-3-дезоксиглюконол-6-фосфоглюконатном пути – по одному молю ATP, NADH₂ и NADPH₂. Таким образом, в последнем случае 1 моль ATP и 1 моль NADH₂ заменяются на один моль NADPH₂, что эквивалентно. Эта эквивалентность согласуется с данными о том, что перенос водорода с NADH₂ на NADP с участием трансгидрогеназы во многих случаях требует затраты энергии и протекает с использованием ATP.

Микроорганизмы заметно различаются между собой по степени использования того или иного из рассмотренных путей (табл. 7.3). Ферменты фруктозобисфосфатного пути, как правило, являются обязательными компонентами клетки, хотя у многих бактерий этот путь действует лишь в обратном направлении (необратимые этапы катализируются при этом другими ферментами). Пентозофосфатный путь тоже, по-видимому, имеет универсальное значение. 2-Кето-3-дезоксиглюконол-6-фосфоглюконатный путь у бактерий очень широко распространен; он имеет принципиальное значение для использования глюконата. Например, в то время как глюкоза у *Escherichia coli* и видов *Clostridium* расще-



Баланс:
Глюкоза → 2 Пируват
+ 1 NAD(P)H₂
+ 1 NADH₂
+ 1 АТФ

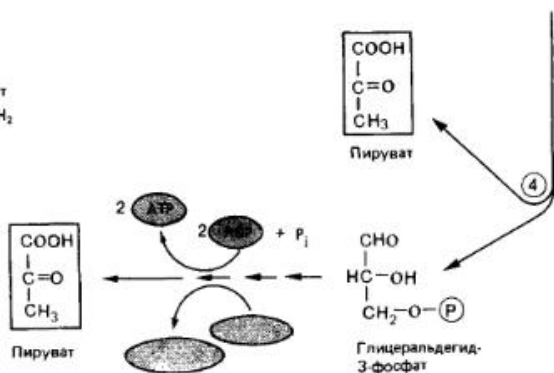


Рис. 7.5. 2-Кето-3-дезоксиглюконовый путь окислительного расщепления глюкозы (путь Энтнера-Дудорова). Участвующие ферменты (цифры в кружках): 1 – гексокиназа; 2 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 3 – фосфоглюконатдегидрогеназа; 4 – фосфо-2-кето-3-дезоксиглюконовый альдозаза. На схеме не показан 6-фосфоглюконолактон, образующийся как промежуточный продукт при дегидрировании глюкозо-6-фосфата.

Таблица 7.3. Участие различных путей в катаболизме гексоз (в процентах)

Вид	Фруктозо-1,6-бисфосфатный путь	Пентозофосфатный путь	2-Кето-3-дезоксиглюконовый путь
<i>Candida utilis</i>	70-80	30-20	
<i>Streptomyces griseus</i>	97	3	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	77	23	
<i>Escherichia coli</i>	72	28	
<i>Bacillus subtilis</i>	74	26	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		29	71
<i>Gluconobacter oxydans</i>		100	
<i>Pseudomonas saccharophila</i>			100
<i>Alcaligenes eutrophus</i>			100

плетается по фруктозобисфосфатному пути, глюконат включается у них в промежуточный обмен через 2-кето-3-дезоксиглюконовый путь.

Клостридии и некоторые аэробные бактерии используют для катаболизма глюконата особый вариант 2-кето-3-дезоксиглюконового пути: сначала глюконат под действием глюконатдегидратазы превращается в 2-кето-3-дезоксиглюконат, и только на этом этапе происходит его фосфорилирование за счет АТФ при участии кетодезоксиглюконокиназы; 2-кето-3-дезоксиглюконон расщепляется под действием фосфо-2-кето-3-дезоксиглюконональдозазы.

7.2.4 Окисление пирувата

Пируват занимает центральное положение в промежуточном метаболизме и может служить предшественником разнообразных продуктов. Многие организмы окисляют большую часть образующегося в ходе катаболизма пирувата до ацетилкофермента А. Важнейшую роль у бактерий играют три реакции:

- (1) Пируват + CoA + NAD → Ацетил-СoА + NADH₂ + CO₂
- (2) Пируват + CoA + 2Fd → Ацетил-СoА + 2FdH + CO₂
- (3) Пируват + CoA → Ацетил-СoА + Формиат (Fd-ферредоксин)

Реакция (1) катализируется мультиферментным комплексом *пируват-дегидрогеназой*. Этот фермент имеется почти у всех аэробных организмов и служит главным образом для образования ацетил-СoА, который поступает затем в цикл трикарбоновых кислот (рис. 7.6); его функция будет подробно описана ниже.

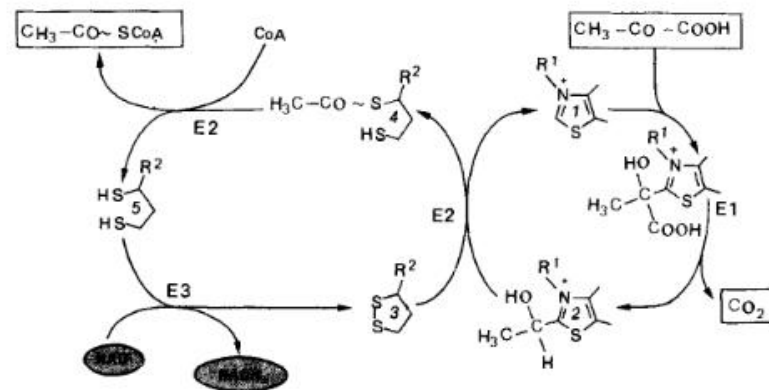
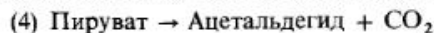


Рис. 7.6. Схема реакций, участвующих в дегидрировании пирувата (пояснения в тексте).

Реакцию (2) катализирует *пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза* — фермент, который у многих анаэробных бактерий (например, у клостридиев) имеет особое значение.

Реакцию (3) катализирует *пируват:формиат-лиаза*. Этот фермент есть у многих анаэробных бактерий, выделяющих муравьиную кислоту («муравьинокислое брожение», разд. 8.4), в частности у *Enterobacteriaceae*, но встречается также у фототрофных бактерий.

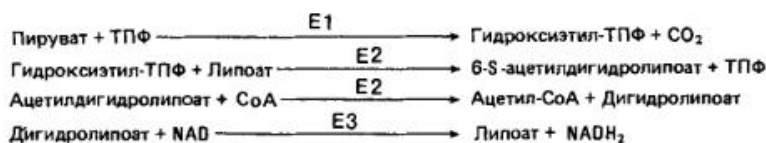
У дрожжей и некоторых бактерий, образующих этанол, имеется четвертый фермент, окисляющий пируват:



Этот фермент — *пируватдекарбоксилаза* — расщепляет пируват на ацетальдегид и CO_2 . Ацетальдегид затем восстанавливается до этанола.

Дегидрирование пирувата пируватдегидрогеназой. Этот мультиферментный комплекс при участии кофакторов превращает пируват в ацетилкофермент А и CO_2 [см. реакцию (1) выше и рис. 7.6].

В состав мультиферментного комплекса входят три белка: пируватдегидрогеназа (E1), дигидролипоамид-трансацилаза (E2) и дигидролипоамид-дегидрогеназа (E3):



На начальном этапе (E1) пируват взаимодействует со 2-м углеродным атомом тиазольного кольца (1) тиаминапирофосфата (ТПФ), в результате чего отщепляется CO_2 . Образующийся гидроксиэтил-ТПФ (2) реагирует с присоединенным к E2 липоатом (3), который при этом восстанавливается, а у вторичной SH-группы удерживает ацетильный остаток (4). Затем E2 катализирует перенос ацетильной группы на кофермент А: при этом остается дигидролипоат (5), который снова окисляется при помощи E3 до липоата при одновременном восстановлении NAD.

У строго анаэробных бактерий пируватдегидрогеназный мультиферментный комплекс отсутствует.

7.3 Цикл трикарбоновых кислот

Цикл трикарбоновых кислот (рис. 7.7) служит для окисления двухуглеродного соединения ацетата до CO_2 с отщеплением водорода. При участии трех дегидрогеназ водород переносится на NAD(P) , а под действием *сукцинатдегидрогеназы* — непосредственно на хинон. Как правило, коферменты передают водород в дыхательную цепь.

Сначала под действием *цитратсинтазы* ацетилкофермент А присоединяется к оксалоацетату; при этом образуется цитрат и освобождается кофермент А. Хотя молекула цитрата обладает зеркальной симметрией,

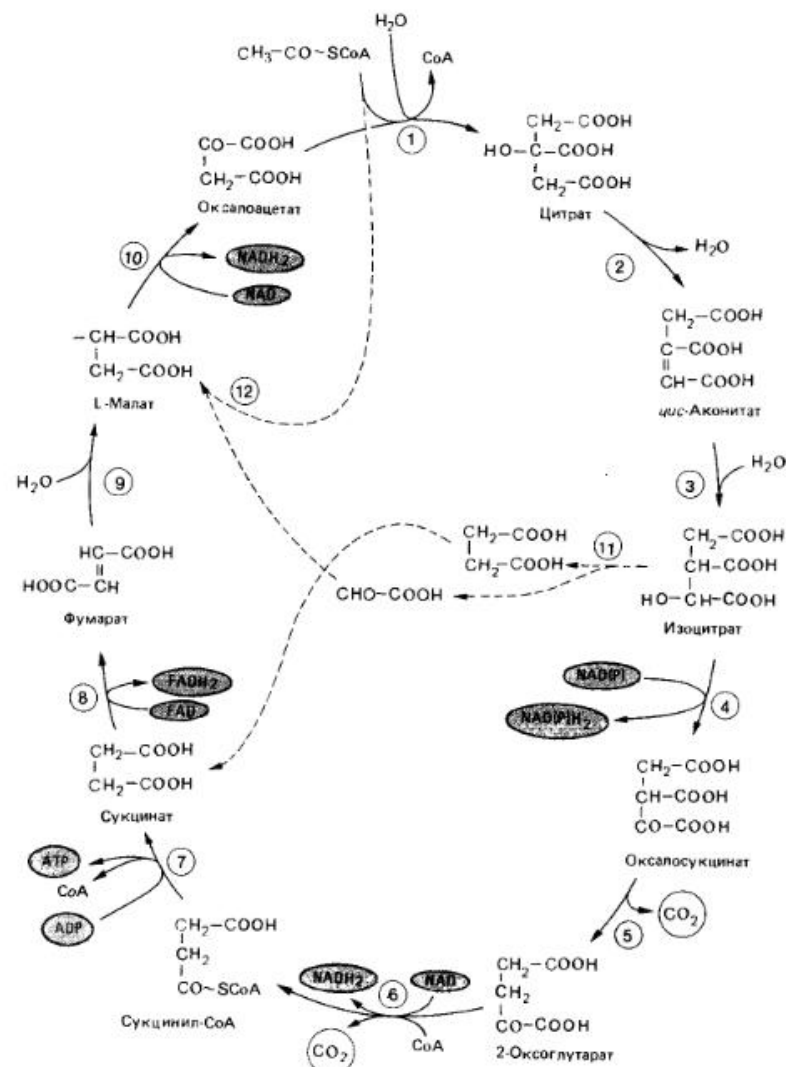


Рис. 7.7. Цикл трикарбоновых кислот. Чтобы подчеркнуть асимметричное расщепление цитрата, углеродные атомы, происходящие из ацетата, вплоть до 8-й реакции выделены красным цветом. Сукцинат — первое соединение с симметричным строением. Глиоксилатный цикл показан прерывистыми линиями. Участвующие ферменты: 1 — цитратсинтаза; 2 и 3 — аконитатгидратаза; 4 и 5 — изоцитратдегидрогеназа; 6 — α -кетоглутаратдегидрогеназа; 7 — сукцинаттиокиназа; 8 — сукцинатдегидрогеназа; 9 — фумараза; 10 — малатдегидрогеназа; 11 — изоцитратлиаза; 12 — малатсинтаза.

она расщепляется асимметрично. *Аконитатгидратаза* катализирует обратимое взаимопревращение трех трикарбоновых кислот:



Изоцитратдегидрогеназа катализирует реакции, ведущие от изоцитрата к 2-оксоглутарату. Существует одна NADP-зависимая система ферментов и одна NAD-зависимая. Оксалосукцинат остается, видимо, связанным с ферментом. *2-Оксоглутаратдегидрогеназа* катализирует превращение, аналогичное пируватдегидрогеназной реакции. Помимо ферментного белка в нем участвуют тиаминпирофосфат, липоат, кофермент А, NAD и Mg^{2+} . Сукцинат может освобождаться прямо из сукцинил-СоА под действием СоА-ацилазы или в реакции, сопряженной с фосфорилированием ADP:



Сукцинатдегидрогеназа окисляет сукцинат в фумарат и передает электроны на убихинон и Fe^{3+} -цитохром *b*. *Фумараза* (*фумаратгидратаза*) присоединяет воду к фумарату; такая гидратация стереоспецифична и приводит к образованию малата. С помощью *малатдегидрогеназы* происходит дегидрирование малата до оксалоацетата, и тем самым регенерируется акцептор ацетата. Все реакции, кроме образования сукцинил-СоА, обратимы.

В конечном счете окисление ацетата в цикле трикарбоновых кислот дает 2 молекулы CO_2 и 8 [H] (из них 6 [H] на уровне пиридиннуклеотидов и 2 [H] на уровне флавопротеинов). Кроме того, образуется молекула высокоэнергетического соединения.

Цикл трикарбоновых кислот не только выполняет функцию **конечного окисления** органических веществ, но и обеспечивает процессы биосинтеза различными предшественниками, такими как 2-оксоглутарат, оксалоацетат и сукцинат. Отсутствие этих кислот привело бы к нехватке оксалоацетата, который служит акцептором для ацетил-СоА, и тем самым к нарушению цикла. Восполнение потерь промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот – функция так называемых анаплотических реакций. Важнейший механизм обеспечения цикла C_4 -дикарбоновыми кислотами состоит в карбоксилировании пирувата и фосфоенолпирувата ($\text{C}_3 + \text{C}_1 \rightarrow \text{C}_4$). Эти реакции будут подробнее рассмотрены позже (разд. 7.5).

7.4 Дыхательная цепь и фосфорилирование, сопряженное с транспортом электронов

В то время как большинство анаэробных организмов способно синтезировать АТФ только путем фосфорилирования на уровне субстрата, аэробы могут осуществлять несравненно более эффективную регенерацию

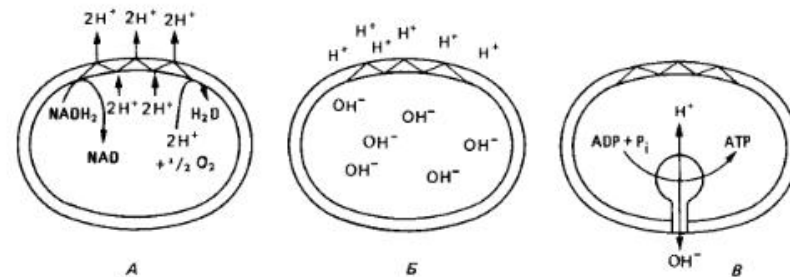


Рис. 7.8. Схема окислительного фосфорилирования в плазматической мембране бактериальной клетки и во внутренней мембране митохондрии. А. Окисление NADH_2 и выведение протонов. Б. Электрохимический градиент между внутренней и наружной сторонами. В. Регенерация АТФ как следствие обратного тока протонов.

АТФ. Они обладают особым аппаратом: *дыхательной (электрон-транспортной) цепью* и ферментом *АТФ-синтазой*; обе системы у прокариот находятся в плазматической мембране, а у эукариот – во внутренней мембране митохондрий. Ведущие свое происхождение от субстратов восстановительные эквиваленты (H или электроны) в этих мембранах поступают в дыхательную цепь, и электроны переносятся на O_2 (или другие терминальные акцепторы электронов). В дыхательной цепи происходят реакции, представляющие собой биохимический аналог сгорания водорода. От химического горения молекулярного водорода они отличаются тем, что значительная часть свободной энергии переводится при этом в биологически доступную форму, т.е. в АТФ, и лишь небольшая доля рассеивается в виде тепла.

Механизм окислительного фосфорилирования. Отданные субстратами восстановительные эквиваленты (протоны и электроны) переносятся на плазматическую мембрану или на внутреннюю мембрану митохондрий. Через мембрану они транспортируются таким образом, что между внутренней и внешней сторонами мембраны создается электрохимический градиент с положительным потенциалом снаружи и отрицательным внутри (рис. 7.8). Этот перепад заряда возникает благодаря определенному расположению компонентов дыхательной цепи в мембране.

Некоторые из этих компонентов переносят электроны, другие переносят водород. Взаиморасположение переносчиков в мембране таково, что при транспорте электронов от субстрата к кислороду протоны (H^+) связываются на внутренней стороне мембраны, а освобождаются на внешней. Можно представить себе, что электроны в мембране проходят зигзагообразный путь и при этом переносят протоны изнутри наружу. Эта система, транспортирующая электроны и протоны, получила название *дыхательной* или *электрон-транспортной* цепи. Иногда ее образно называют «протонным насосом», так как главная функция этой системы – перекачивание протонов.

Неравновесное распределение зарядов, т.е. электрохимический градиент, служит движущей силой для процесса регенерации АТФ (и других процессов, требующих затраты энергии). Мембрана содержит специальный фермент АТФ-синтазу, синтезирующий АТФ из АДФ и P_i . Этот фермент выступает из мембраны с ее внутренней стороны. В процессе синтеза АТФ протоны переходят обратно с наружной стороны мембраны на внутреннюю. Синтез АТФ за счет энергии транспорта электронов через мембрану называют **окислительным фосфорилированием** или фосфорилированием в дыхательной цепи.

Для того чтобы понять механизм дыхания, необходимо знать 1) компоненты дыхательной цепи, 2) их окислительно-восстановительные потенциалы и 3) их взаиморасположение в мембране.

Мембраны как место осуществления дыхания. Компонентами дыхательной цепи являются ферментные белки с относительно прочно связанными низкомолекулярными простетическими группами. Давнюю мысль о том, что «дыхание» — это катализ, осуществляемый железом на поверхностях» (О. Варбург), можно считать справедливой. Действительно, ферменты дыхательной цепи структурно связаны. У эукариот они локализованы во внутренней мембране митохондрий, а у прокариот — в плазматической мембране. Механизм действия и локализация компонентов дыхательной цепи в тех и других мембранах во многом сходны. Дыхательная цепь *Alcaligenes eutrophus* и *Paracoccus denitrificans* почти идентична дыхательной цепи митохондрий.

Компоненты дыхательной цепи погружены в двойной липидный слой. Речь идет о большом числе ферментов, коферментов и простетических групп, различных дегидрогеназ и транспортных систем, участвующих в переносе электронов и водорода. Белковые компоненты могут быть выделены из мембраны. Важнейшие из компонентов, участвующих в окислении водорода, — это флавопротеины, железосерные белки, хиноны и цитохромы.

Флавопротеины представляют собой ферменты, содержащие в качестве простетических групп флавинонуклеотид (FMN) или флавиноадениндинуклеотид (FAD). Эти ферменты переносят водород. Активной группой в них является изоаллоксазиновая система (рис. 7.9, А), которая действует как обратимая окислительно-восстановительная система. Реагирующими центрами служат два атома азота, каждый из которых может связаться с одним $[H]$. Связывание может происходить в два этапа через состояние семихинона. Благодаря способности переносить то по два атома водорода, то по одному флавопротеины могут быть посредниками между двумя типами процессов переноса водорода.

Железосерные белки — это окислительно-восстановительные системы, переносящие электроны. Они содержат атомы железа, связанные, с одной стороны, с серой аминокислоты цистеина, а с другой — с неорганической сульфидной серой (рис. 7.9, Б). Последняя очень легко отщепляется в виде сероводорода при подкислении. Остатки цистеина входят в состав полипептидных цепей; Fe-S-центры можно рассматривать как простетические группы полипептида. Участвующие в дыхательной

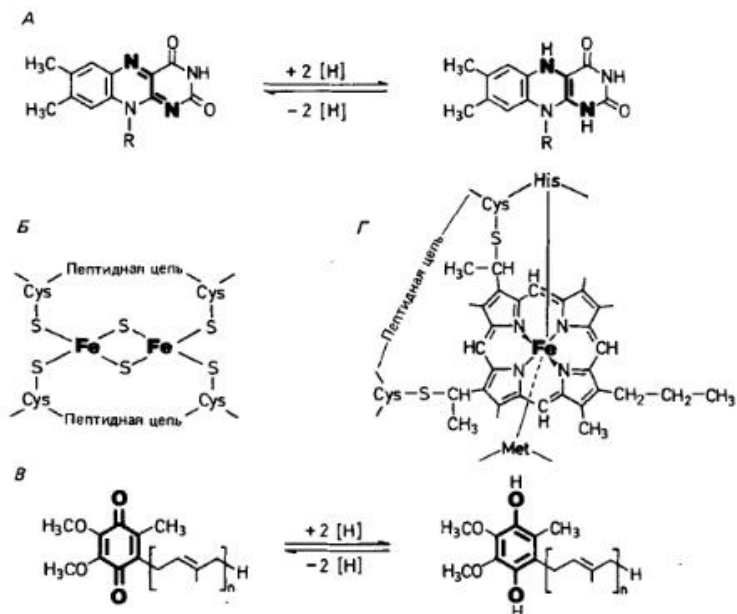
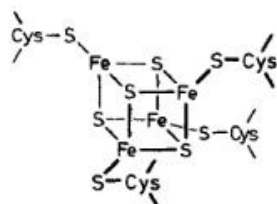


Рис. 7.9. Структурные формулы некоторых важнейших компонентов дыхательной цепи. А. Изоаллоксазиновая кольцевая система FMN или FAD в окисленной и восстановленной форме. Б. $[2Fe + 2S]$ -центр железосерного белка. В. Восстановление убикинона до убигидрохинона. Г. Активный участок цитохрома с.

цепи $[2Fe + 2S]$ -центры способны переносить только один электрон. Железосерные белки типа $[2Fe + 2S]$, имеющие по два атома лабильной серы и железа, содержатся в нескольких ферментных комплексах дыхательной цепи. Из общего количества находящегося в плазматической мембране железа 80% содержится в Fe-S-белках и только 20% — в цитохромах.

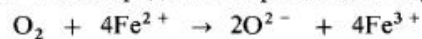
Помимо транспорта электронов в мембранах Fe-S-белки участвуют в фиксации молекулярного азота, в восстановлении сульфита и нитрита, в фотосинтезе, в освобождении и активации молекулярного водорода и в окислении алканов. Fe-S-белки имеют относительно низкую молекулярную массу и сильно отрицательный окислительно-восстановительный потенциал; величины E_0' находятся в пределах от $-0,2$ до $-0,6$ В. Помимо железосерных белков с $[2Fe + 2S]$ -центрами (в хлоропластах, у аэробных бактерий) существуют и другие — с $[4Fe + 4S]$ -центром (у *Clostridium*, *Chromatium*), а также такие, которые содержат по два $[4Fe + 4S]$ -центра (у *Clostridium*, *Azotobacter*). Некоторые железосерные белки получили название по своему происхождению или по функции: ферредоксин, лутидаредоксин, рубредоксин, адренодоксин.



Еще одну группу окислительно-восстановительных систем в дыхательной цепи составляют **хиноны**. Во внутренней мембране митохондрий и у грам-отрицательных бактерий имеется убинон (кофермент Q; рис. 7.9, В), у грам-положительных бактерий – нафтохиноны, а в хлоропластах – пластохиноны. Хиноны, в частности убинон, липофильны и поэтому локализируются в липидной фазе мембраны. Они способны переносить водород или электроны. Перенос может осуществляться в два этапа, при этом в качестве промежуточной формы выступает семихинон. По сравнению с другими компонентами дыхательной цепи хиноны содержатся в 10–15-кратном избытке. Они служат «сборщиками» водорода, поставляемого различными коферментами и протестическими группами в дыхательной цепи, и передают его цитохромам.

Цитохромы – окислительно-восстановительные системы, переносящие только электроны; водород они не транспортируют. К цитохромам электроны поступают от пула хинонов. При переносе электронов эквивалентное им число протонов переходит в раствор. В качестве протестической группы цитохромы содержат гем (рис. 7.9, Г). Центральный атом железа геминового кольца участвует в переносе электронов, изменяя свою валентность. Цитохромы окрашены; они отличаются друг от друга спектрами поглощения и окислительно-восстановительными потенциалами. Различают цитохромы *a*, *a*₃, *b*, *c*, *o* и ряд других. В цитохроме *c* группы гема ковалентно связаны с цистеиновыми остатками апопротеина; благодаря такой прочной связи он растворим в воде и его можно экстрагировать из мембраны солевыми растворами. Цитохром *c* найден почти у всех организмов, обладающих дыхательной цепью. Что касается распространенности других цитохромов, то тут существуют заметные различия.

Цитохромы участвуют также в переносе электронов на кислород. Цитохромоксидаза (цитохром *aa*₃) – терминальная оксидаза, реагирующая с кислородом и передающая ему четыре электрона:



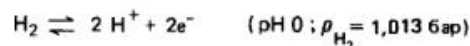
Часто встречающийся у бактерий цитохром *o* также может реагировать с молекулярным кислородом. Эта терминальная оксидаза может быть ингибирована цианидом или окисью углерода.

Наличие цитохромов долгое время рассматривалось как признак принадлежности к аэробным или фототрофным организмам. Открытие цитохрома *c*₂ у *Desulfovibrio* вначале казалось неожиданным, но затем стало понятно, что вос-

становление сульфата этими сульфатредуцирующими бактериями позволяет им осуществлять окислительное фосфорилирование в анаэробных условиях и, таким образом, формально соответствует дыханию. Недавно выявилось, что азотолерантные молочнокислые бактерии *Streptococcus lactis* и *Leuconostoc mesenteroides* и анаэроб *Bifidobacterium* тоже синтезируют цитохромы, если растут на средах, содержащих гемин или кровь. Цитохромы были обнаружены также у строгих анаэробов *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella alcalescens*, *Vibrio succinogenes*, *Clostridium formicoaceticum* и *C. thermoaceticum*. Вполне возможно, что и у некоторых других строго анаэробных бактерий будут найдены цитохромы и способность в какой-то мере осуществлять фосфорилирование, сопряженное с транспортом электронов.

Окислительно-восстановительный потенциал. Транспорт водорода и транспорт электронов – процессы эквивалентные. Дыхательная цепь может рассматриваться как цепь переноса электронов. Компоненты дыхательной цепи переходят попеременно из окисленного состояния в восстановленное и обратно, т.е. ведут себя как типичные окислительно-восстановительные катализаторы. Они обладают окислительно-восстановительным потенциалом, который может быть измерен непосредственно (у цитохромов) или косвенно (у NAD, FAD).

Окислительно-восстановительный потенциал служит количественной мерой способности тех или иных соединений или элементов отдавать электроны. Этот потенциал отсчитывается относительно потенциала молекулярного водорода. Согласно определению, водородный полуэлемент – платинированный или платиновый электрод, погруженный в раствор кислоты и обтекаемый газообразным H₂ при давлении 1,013 бар и pH 0, имеет потенциал, равный нулю:



Подобно химическим элементам, биологические вещества также можно расположить в ряд по величине их окислительно-восстановительного потенциала при степени восстановления 1/2 (равные концентрации окисленной и восстановленной форм); эту величину обозначают E_0 . В биохимии пользуются величиной E'_0 , приведенной к pH 7. При этом pH водородный электрод имеет потенциал E'_0 , равный –0,42 В. На рис. 7.10, А показана зависимость потенциала, отнесенного к потенциалу водородного полуэлемента, от величины pH. Из уравнения Нернста

$$E = E_0 - \frac{RT}{n \cdot F} \ln \frac{c_1}{c_2}$$

следует, что зависимость измеряемого потенциала окислительно-восстановительной системы E' от концентраций окисленной и восстановленной форм выражается формулой

$$E' = E'_0 + \frac{0,06}{n} \lg \frac{c_{\text{ок}}}{c_{\text{ред}}} \quad (\text{при } 30^\circ\text{C})$$

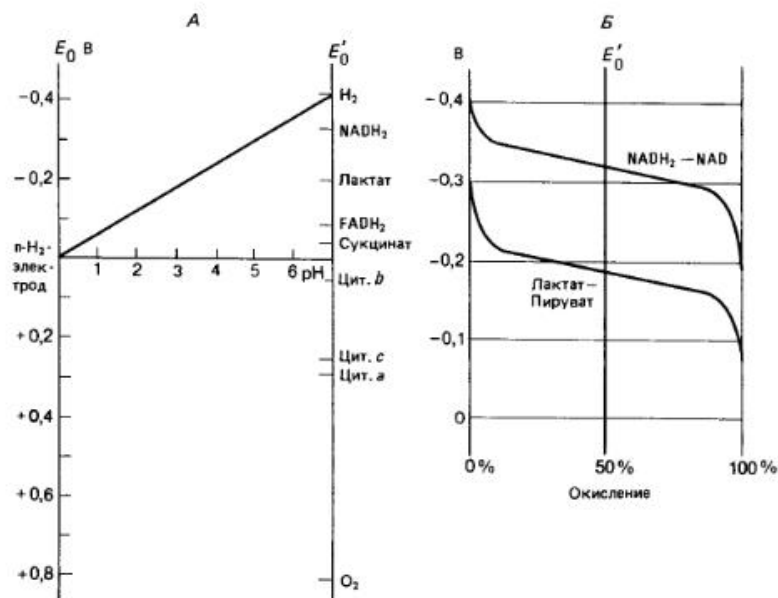


Рис. 7.10. Окислительно-восстановительные потенциалы. А. Зависимость окислительно-восстановительного потенциала (отнесенного к потенциалу водородного полуэлемента ($n\text{-H}_2$ -электрода) от величины pH; для некоторых соединений указаны нормальные потенциалы E'_0 . Б. Зависимость измеряемого потенциала E'_0 от концентраций окисленной и восстановленной форм соединения для двух окислительно-восстановительных систем.

Значение E' тем более отрицательно, чем меньше отношение концентрации окисленной формы к концентрации восстановленной формы (рис. 7.10, Б).

Окислительно-восстановительный потенциал служит мерой максимальной полезной работы, которую может выполнить система, т.е. мерой изменения свободной энергии (ΔG_0) в данной реакции. По разности окислительно-восстановительных потенциалов двух реагирующих друг с другом систем ΔE_0 можно вычислить изменение свободной энергии при данной реакции:

$$\Delta G_0 = -n \cdot F \cdot \Delta E_0 = -n \cdot 96,5 \cdot \Delta E_0 \text{ (кДж/моль)}$$

Значения E'_0 отдельных компонентов дыхательной цепи лежат в пределах от -0,32 В для NADH_2/NAD [-0,08 В для флавопротеина (FADH_2/FAD); -0,04 В для цитохрома b ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$)] до +0,81 В для $\text{O}^{2-}/\frac{1}{2}\text{O}_2$. Можно также привести значения E'_0 для ряда субстратов: лактат/пируват -0,186 В; малат/оксалоацетат -0,166 В; сукцинат/фурамат -0,03 В.

Таблица 7.4. Окислительно-восстановительные потенциалы компонентов дыхательной цепи. Разности потенциалов между отдельными компонентами и эквивалентные изменения свободной энергии

Компоненты дыхательной цепи	E'_0 , В	Разность величин E'_0 , В	$-\Delta G'_0$	
			кДж/моль	ккал/моль
Водород	-0,42			
NAD	-0,32	0,10	19,3	4,61
Флавопротеин	-0,08	0,24	46,4	11,1
Цитохром b	-0,04	0,04	7,7	1,84
Цитохром c	+0,27	0,31	59,8	14,30
Цитохром a	+0,29	0,02	3,8	0,92
Кислород	+0,81	0,52	100,4	24,0

Поскольку разность между величинами E'_0 для H_2 и O_2 составляет $-0,42 - 0,81 = -1,23$ В, изменение свободной энергии в реакции гремучего газа $\Delta G'_0$ должно быть равно $-2 \cdot 96,5 \cdot 1,23 = -237,4$ кДж/моль. В клетке при переносе водорода от NADH_2 разность потенциалов составляет только $[(+0,81 \text{ В}) - (-0,32 \text{ В})] = 1,13$ В, т.е. $\Delta G^0 = -218$ кДж/моль. Аналогичным образом по разности потенциалов можно вычислить соответствующий выход энергии для любых двух переносчиков электронов в дыхательной цепи (табл. 7.4).

Расположение и функции окислительно-восстановительных систем в дыхательной цепи. По окислительно-восстановительному потенциалу компоненты дыхательной цепи можно расположить в ряд, который начинается с NAD (наиболее отрицательный потенциал) и оканчивается цитохромоксидазой и кислородом (рис. 7.11). Хиноны и цитохромы служат вспомогательными субстратами. Эти компоненты восстанавливаются водородом, доставляемым различными донорами. Получаемый через NAD водород с помощью NADH-дегидрогеназы переносится на хинон; аналогичным образом на хинон переносится водород от сукцината (через сукцинатдегидрогеназу) и водород, полученный при дегидрировании жирных кислот (через другие специфические дегидрогеназы). Хинон служит сборным резервуаром водорода из субстратов в дыхательной цепи. Некоторые из ферментов, участвующих в переносе водорода, содержат FMN или FAD, а также железосерные белки.

Восстановленные хиноны вновь окисляются системой цитохромов. Цитохромы принимают электроны и передают их кислороду; водород

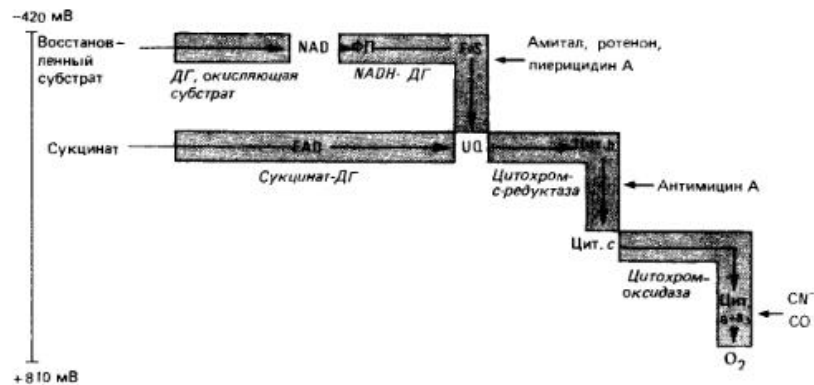


Рис. 7.11. Основная схема дыхательной цепи в митохондриях эукариот и в мембранах многих бактерий. ДГ—дегидрогеназа; УQ—убихинон; ФП—флавопротеин.

же ионизируется и покидает мембрану (рис. 7.8 и 7.12, Г). Последовательность окислительно-восстановительных систем, выведенная из соответствующих потенциалов, была подтверждена экспериментально с помощью спектрометрии и специфических ингибиторов.

Ингибиторы дыхательной цепи. Дыхательная цепь ингибируется или блокируется различными клеточными ядами. Амитаг, ротенон и пирицидин А подавляют активность НАДН-дегидрогеназы; антимидин А блокирует перенос электронов между цитохромами *b* и *c*. Цианид и окись углерода ингибируют только цитохромоксидазу; в цитохроме *c* ион железа, по-видимому, так спрятан в глубине белка, что не взаимодействует ни с CN^- , ни с CO . Специфическое действие этих ядов и изменения характерных спектров поглощения компонентов дыхательной цепи послужили индикаторами, с помощью которых была изучена эта цепь.

Коэффициент Р/О и энергетический баланс. Рассмотрение окислительно-восстановительных потенциалов (табл. 7.4) показывает, что в дыхательной цепи имеются только три этапа окисления, на которых освобождается по меньшей мере столько энергии, сколько содержится в одной «высокоэнергетической» связи. При переносе 2 [H] от $NADH_2$ на кислород только три электронных перехода могут быть сопряжены с фосфорилированием ADP в ATP, так что в лучшем случае лишь три молекулы фосфата могут быть включены в органическое соединение. Эту связь окисления с фосфорилированием обычно выражают в виде коэффициента Р/О (число молекул ATP, образующихся на 1 атом затраченного кислорода). Для митохондрий животных, используя в качестве доноров водорода изоцитрат или малат (переносящие свой водород на NAD), можно экспериментально получить коэффициент Р/О, равный 3; для сукцината, от которого водород может быть включен в цепь дыха-

ния только на уровне флавопротеинов, коэффициент Р/О составляет лишь 2.

Знание того факта, что при переносе двух эквивалентов водорода по дыхательной цепи образуются три молекулы ATP, позволяет составить энергетический баланс для случая окисления глюкозы. Если катаболизм глюкозы идет по фруктозобисфосфатному пути и через цикл трикарбоновых кислот и при этом весь водород сжигается в дыхательной цепи до воды, то на 1 моль использованной глюкозы образуются: а) по фруктозобисфосфатному пути—2 моля $NADH_2$; б) при дегидрировании пирувата—2 моля $NADH_2$; в) в цикле трикарбоновых кислот—2·3 моля $NADH_2$ и 2 моля $FADH_2$; всего—10 молей $NADH_2$ и 2 моля $FADH_2$. При коэффициентах Р/О, равных 3 и 2, число синтезируемых молей ATP составит $10 \cdot 3 + 2 \cdot 2 = 34$. Если к этому добавить два моля ATP, синтезируемых во фруктозобисфосфатном пути, и два моля, образующихся при окислении 2-оксоглутарата, то получим в общем итоге 38 молей ATP.

Этот расчет справедлив для митохондрий и многих бактерий. Однако у бактерий часто имеются только два пункта фосфорилирования, т. е. и для водорода, поставляемого $NADH_2$, коэффициент Р/О равен всего лишь двум. Так обстоит дело, например, у растущих в аэробных условиях клеток *Escherichia coli*, в которых окисление 1 моля глюкозы приводит к образованию только 26 молей ATP.

Фосфорилирование в дыхательной цепи. Регенерация ATP при фосфорилировании в дыхательной цепи и фотосинтетическом фосфорилировании протекает в мембранах. ATP-синтаза, так же как и компоненты дыхательной цепи, является составной частью мембраны. Каким образом происходящий в дыхательной цепи перенос водорода и электронов сопряжен с синтезом ATP, до конца еще не выяснено. Однако многочисленные эксперименты показали, что регенерация ATP происходит только в пространствах, окруженных со всех сторон мембранами,—в пузырьках, или везикулах. Процессы переноса водорода и электронов теснейшим образом сопряжены с перемещением протонов, а этот процесс в свою очередь необходим для регенерации ATP.

Транспорт протонов. Добавляя молекулярный кислород к суспензии аэробных бактерий или митохондрий, находившихся перед тем в анаэробных условиях, можно заметить снижение pH среды. Это позволяет заключить, что во время дыхания из бактериальных клеток и митохондрий выводятся протоны (рис. 7.12, А и Б). Если из мембран бактерий или митохондрий приготовить пузырьки, у которых прежняя внутренняя сторона обращена наружу (вывернутые везикулы), то при дыхании будет наблюдаться «обращенный» перенос протонов, приводящий к подщелачиванию суспензионной среды (рис. 7.12, В). В результате перемещения протонов создается градиент электрохимического потенциала. Внутреннее пространство интактных митохондрий или бактерий электроотрицательно по отношению к суспензионной среде и отличается более высоким pH. Оба трансмембранных градиента—градиенты pH

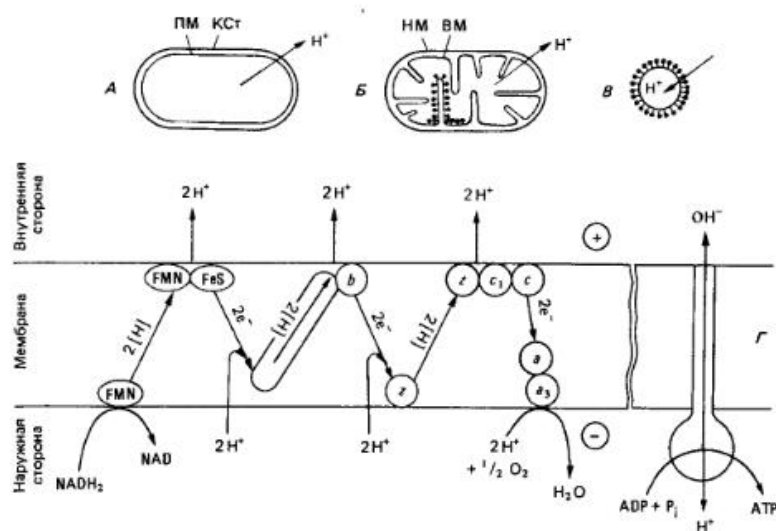


Рис. 7.12. Транспорт протонов при субстратном дыхании. Из бактериальной клетки (А) или из митохондрии (Б) в суспензионную среду выходят протоны. У «субмитохондриальных частей» (В) мембраны вывернуты (внутренней стороной наружу), поэтому протоны транспортируются внутрь. Г. Путь переноса протонов и электронов при окислении NADH_2 согласно хемосмотической гипотезе. *KСт* – клеточная стенка; *PM* – плазматическая мембрана; *BM* и *HM* – внутренняя и наружная мембраны митохондрий; *Q* – кофермент *Q*; *Z* – гипотетический переносчик водорода; *FeS* – железосерные белки; *b*, *c*, *a*, *a₃* – цитохромы.

и электрического потенциала – стремятся вернуть перенесенный наружу протон обратно внутрь. Эта разность электрохимических протонных потенциалов (называемая также протонным потенциалом или «протондвижущей силой») складывается из электрического мембранного потенциала ($\Delta\psi$) и разности рН между наружной и внутренней сторонами мембраны (ΔpH) в соответствии с уравнением

$$\Delta p = \frac{\Delta\mu_{\text{H}^+}}{F} = \Delta\psi - Z \cdot \Delta\text{pH} \quad [\text{мВ}]$$

где $Z = 2,3 \cdot R \cdot T / F$, т.е. 59 мВ при 25°C. Протонный потенциал может быть обусловлен только разностью рН, только электрическим мембранным потенциалом или тем и другим одновременно.

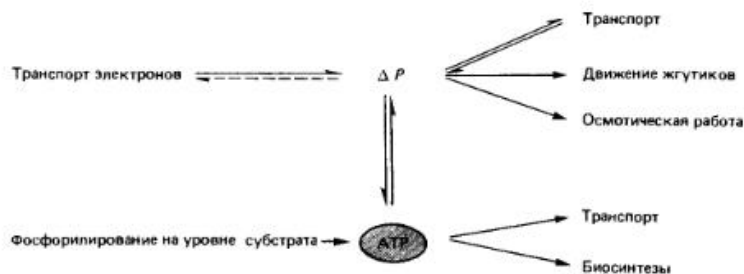
С экспериментальными данными согласуются следующие представления. Плазматическая мембрана бактерий и внутренняя мембрана митохондрий непроницаемы для ионов, в том числе H^+ и OH^- ; электрическая проводимость мембран низка. Мембра-

на асимметрична; хотя двойной липидный слой кажется симметричным, топография функциональных белков (электрон-транспортных компонентов, АТФ-синтазы, пермеазы и др.) придает мембране асимметричный характер. Пространственная ориентация ферментных молекул обуславливает направленный обмен веществами. Согласно предположению Митчелла, дыхательная цепь состоит из чередующихся переносчиков водорода и переносчиков электронов, расположенных в мембране таким образом (рис. 7.12, Г), что окисление субстрата приводит к потреблению протонов на внутренней стороне мембраны и освобождению их на наружной стороне. Если цепь образует три петли, то при окислении NADH_2 наружу выводятся шесть протонов. Такой перенос протонов за счет энергии дыхания ведет к созданию электрохимического градиента между наружной и внутренней сторонами мембраны. Протонный потенциал – это и есть та сила, которая в конечном счете осуществляет фосфорилирование, т.е. обеспечивает синтез АТФ. Биохимическое преобразование энергии путем регенерации АТФ является, таким образом, результатом создания протонного градиента и сопровождается уменьшением потенциала на мембране. Такова суть «хемосмотической теории» Митчелла.

Регенерация АТФ из АДФ и P_i . Синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P_i) катализируется *АТФ-синтазой*. Этот фермент преобразует доставляемую потоком электронов энергию в энергию фосфоэфирных связей АТФ. Фермент найден во всех мембранах, участвующих в преобразовании энергии, а именно в мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий. Он достаточно велик (мол. масса $350 \cdot 10^3$) и имеет сложное строение (рис. 7.12, Г) – состоит из головки, построенной из нескольких субъединиц, ножки и основания; последнее погружено в липидный слой плазматической мембраны. АТФ-синтаза катализирует присоединение фосфата к АДФ с отщеплением молекулы воды, в результате чего образуется АТФ. Каким образом поток протонов или протонный градиент осуществляет эту реакцию фосфорилирования, пока еще неизвестно; возможно, что протоны по какому-то каналу или поре в молекуле фермента оттекают обратно внутрь митохондрии или бактерии, а освобождающаяся при этом энергия используется для фосфорилирования.

АТФ-синтаза идентична F_1 -АТФазе, поэтому ее активность можно обнаружить по гидролизу АТФ: $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + \text{H}^+$. Обратимые реакции АТФ-синтазы имеют чрезвычайно важное значение для клетки. Например, образовавшийся в результате субстратного фосфорилирования АТФ может быть использован АТФ-синтазой для создания протонного градиента. Таким образом, этот фермент может также играть роль «протонного насоса». Благодаря обратимости процессов, протекающих при этом в плазматической мембране, протонный градиент и АТФ могут как бы взаимно превращаться друг в друга. Это имеет большое значение для ряда других процессов, таких как транспорт веществ, движение жгутиков, процессы биосинтеза, что можно по-

яснить следующей схемой:



Обратный перенос электронов за счет энергии АТФ. Особые проблемы встают перед бактериями, использующими такой донор электронов, у которого окислительно-восстановительный потенциал более положителен, чем у пиридиннуклеотидов. Восстановленные пиридиннуклеотиды необходимы для процессов синтеза, в частности для восстановления 3-фосфоглицерата при автотрофной фиксации CO_2 . Поэтому восстановление пиридиннуклеотидов требуется и в тех случаях, когда донорами электронов служат сульфид, тиосульфид, сера, нитрат или Fe^{2+} . Так как прямое восстановление NAD такими донорами невозможно по термодинамическим причинам, приходится предположить, что NAD восстанавливается здесь путем переноса электронов в обратном направлении за счет энергии АТФ и что регенерация АТФ происходит только на конечном (кислородном) участке дыхательной цепи. Такой АТФ-зависимый обратный транспорт электронов, сопровождающийся восстановлением NAD, уже обнаружен у *Nitrobacter* и *Thiobacillus*.

Токсическое действие молекулярного кислорода на аэробные и анаэробные организмы. Кислород служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании и поэтому нужен всем аэробным организмам. Еще со времен Пастера, изучавшего образование масляной кислоты бактериями, известно, что кислород токсичен для строго анаэробных видов. Неожиданностью явилось то, что кислород может оказывать токсическое действие и на аэробные организмы. Поэтому у большинства организмов имеются ферменты, способные защищать клетку от токсичных продуктов, образующихся из O_2 .

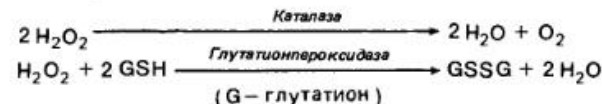
В биологических средах следует различать три вида активации кислорода в зависимости от числа электронов, одновременно переносимых на молекулу O_2 :

- (1) $\text{O}_2 + 4e^- \rightarrow \text{O}^{2-} + \text{O}^{2-}$
- (2) $\text{O}_2 + 2e^- \rightarrow \text{O}_2^{2-}$
- (3) $\text{O}_2 + 1e^- \rightarrow \text{O}_2^-$

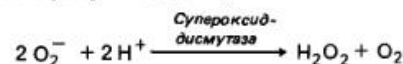
Реакцию (1) катализирует цитохромоксидаза—конечный фермент электрон-транспортной цепи. Здесь одновременно происходит перенос

четырёх электронов, и в результате получаются два иона O^{2-} , каждый из которых при взаимодействии с двумя протонами образует воду. Из всех ферментов только цитохромоксидаза и некоторые «синие ферменты», содержащие медь (тирозиназа, лакказа), способны переносить сразу четыре электрона на O_2 .

Реакция (2) характерна для некоторых ферментов, содержащих флавины (глюкозооксидаза, оксидазы аминокислот, ксантинооксидаза). Эти ферменты одновременно переносят два электрона и восстанавливают O_2 до иона пероксида O_2^{2-} , который, реагируя с протонами, образует H_2O_2 . Перекись водорода для клетки токсична, так как окисляет, например, SH-группы; защитное действие в этом отношении оказывают каталаза и пероксидаза:



Так как ферменты, содержащие флавины, есть у многих анаэробных и аэробных бактерий, становится понятным, почему большинство аэробных организмов обладает каталазой. В реакции (3), катализируемой многими оксидазами (ксантинооксидазой, альдегидоксидазой, NADPH-оксидазой и др.), переносится только один электрон. При этом образуется супероксид-ион O_2^- , который, будучи радикалом, очень реакционноспособен. Мы имеем здесь дело только с побочной реакцией названных ферментов; однако супероксид-радикал и продукт его реакции с H_2O_2 ($\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}^-$)—гидроксила-радикал, будучи весьма реакционноспособными, вызывают образование в клетке высокорективных соединений. Защитное действие оказывает супероксиддисмутаза:



Таким образом, супероксиддисмутаза совместно с каталазой превращает супероксид-радикалы в безвредный кислород (в основном состоянии).

Как полагают, присутствие кислорода переносят только те организмы, у которых имеется супероксиддисмутаза. Этот фермент найден почти у всех до сих пор изученных аэротолерантных бактерий. Однако делать обобщения еще рано, так как интенсивные исследования продолжают.

Электрон-транспортные процессы у анаэробных бактерий. В анаэробных условиях, т.е. в отсутствие кислорода, хемоорганотрофные организмы могут получать биохимическую энергию (в форме АТФ) двумя способами—путем брожения и путем фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов. В распоряжении организмов, осуществляющих брожение, имеется мало реакций, служащих для синтеза АТФ. Это реакции фосфорилирования на уровне субстрата (разд. 7.21).

Многие бактерии, однако, и в анаэробных условиях используют окислительное (электрон-транспортное) фосфорилирование; при этом происходит перенос электронов, получаемых при расщеплении субстрата, по (укороченной) электрон-транспортной цепи на экзогенные (добавленные в питательную среду) или эндогенные (образующиеся при разложении субстрата) акцепторы. Акцепторами электронов могут быть ионы нитрата, сульфата, карбоната и fumarата, а также сера; соответствующие виды бактерий объединяют в физиологические группы нитратвосстанавливающих, денитрифицирующих, сульфатредуцирующих, метаногенных и ацетогенных бактерий, а также бактерий, восстанавливающих серу. Все эти бактерии играют важную роль в природном балансе. Так как фосфорилирование, сопряженное с транспортом электронов, долгое время считалось характерной принадлежностью аэробного дыхания, то, говоря о преобразовании энергии при окислительном фосфорилировании в анаэробных условиях, в настоящее время пользуются также термином «анаэробное дыхание» (см. гл. 9).

Электрон-транспортное фосфорилирование с fumarовой кислотой в качестве акцептора электронов встречается не только у бактерий, но и у червей и даже млекопитающих. Реакцию, катализируемую fumarатредуктазой, можно выявить по накоплению или выделению янтарной кислоты.

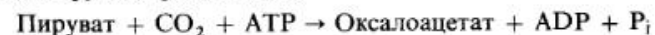
7.5 Вспомогательные циклы и глюконеогенез

Если во время роста клеток промежуточные продукты цикла трикарбонных кислот используются в биосинтетических процессах, недостаток этих продуктов компенсируется восполняющими (**анаплеротическими**) реакциями. Одна из функций таких реакций – регенерация оксалоацетата, из которого в результате взаимодействия с ацетилкоферментом А образуется цитрат.

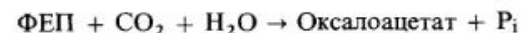
Когда субстратом для роста клетки служит глюкоза, этот сахар используется для синтеза всех клеточных компонентов, содержащих глюкозу, рибозу, дезоксирибозу и другие производные сахаров. В этом случае анаплеротические реакции обеспечивают прежде всего бесперебойную работу цикла трикарбонных кислот. При росте микроорганизмов на среде с лактатом, пируватом, ацетатом, глиоксилатом и другими углеродными соединениями дополнительные метаболические пути необходимы не только для поддержания цикла трикарбонных кислот, но и для образования промежуточных продуктов, используемых при биосинтезе сахаров (*глюконеогенезе*).

Глюкоза как субстрат. Важнейшими и наиболее распространенными анаплеротическими реакциями, восполняющими расход промежуточных продуктов цикла трикарбонных кислот у животных, растений и микроорганизмов, являются реакции карбоксилирования C_3 -кислот (пирувата, фосфоенолпирувата), ведущие к образованию оксалоацетата

(рис. 7.13). В животных тканях (в печени и почках), а также в клетках некоторых псевдомонад происходит карбоксилирование пирувата при участии пируваткарбоксилазы:

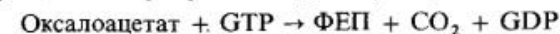


Самой распространенной реакцией следует, по-видимому, считать карбоксилирование фосфоенолпирувата (ФЕП) с помощью ФЕП-карбоксилазы:



Эта реакция практически необратима.

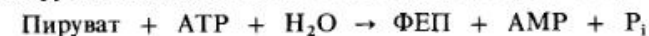
Лактат, пируват и другие C_3 -соединения как субстраты. При росте на средах с пируватом или родственными соединениями клеткам приходится не только восполнять расход промежуточных продуктов цикла трикарбонных кислот, но, кроме того, синтезировать глюкозу и ее производные, т.е. осуществлять **глюконеогенез**. Синтез сахаров из лактата происходит через те же промежуточные соединения, что и гликолиз (фруктозобисфосфатный путь). Однако этапы, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой, необратимы, и для их обхода используются ферментативные реакции, которые являются экзергоническими, когда процесс протекает в направлении синтеза глюкозы (рис. 7.3). В животных тканях (печень, почки) существует следующий путь в обход практически необратимой пируваткиназной реакции: сначала пируват карбоксилируется в оксалоацетат (под действием пируваткарбоксилазы), а последний при участии ФЕП-карбоксикиназы превращается в фосфоенолпируват (ФЕП):



Этот синтез, ведущий от пирувата через оксалоацетат к фосфоенолпирувату, требует двух высокоэнергетических фосфатов: одного для карбоксилирования пирувата, а другого – для образования фосфоенолпирувата из оксалоацетата.

Недавно выяснилось, что обратная реакция, катализируемая ФЕП-карбоксилазой, – это единственный путь синтеза оксалоацетата из C_3 -соединений у многих строго анаэробных бактерий (и червей). В среде с высоким содержанием CO_2 эта реакция протекает преимущественно в сторону образования оксалоацетата.

У *Escherichia coli* и других бактерий пируват непосредственно фосфорилируется под действием ФЕП-синтетазы (рис. 7.13):



Для этого тоже требуются две высокоэнергетические фосфатные связи. Синтез оксалоацетата происходит в этом случае под действием ФЕП-карбоксилазы. Пируваткарбоксилаза у *E. coli* отсутствует.

Пропионовые (пропионовокислые) бактерии, *Acetobacter aceti*, *Entamoeba histolytica* и *Fusobacterium symbiosus* имеют еще один фермент, образующий ФЕП из пирувата, а именно пируват-ортофосфатдикина-

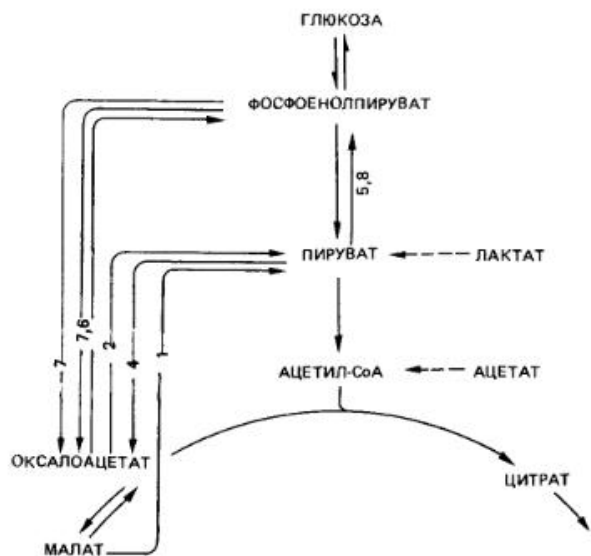
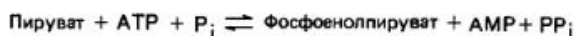


Рис. 7.13. Важнейшие метаболические пути между C₂-соединениями – пируватом и фосфоенолпируватом, с одной стороны, и оксалоацетатом и малатом – с другой. Участвующие ферменты: 1 – малатдегидрогеназа (декарбоксилирующая); 2 – оксалоацетатдекарбоксилаза; 3 – фосфоенолпируват-карбоксикиназа; 4 – фосфоенолпируват-карбоксилаза; 5 – фосфоенолпируват-синтетаза; 6 – фосфоенолпируват-карбокситрансфосфориллаза; 7 – пируваткарбоксилаза; 8 – пируват, ортофосфат-дикиназа.

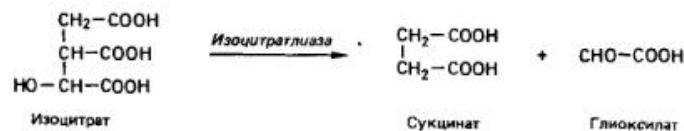
зу¹, которая катализирует обратимую реакцию:



Следует отметить, что высокоэнергетическая связь дифосфата при этом сохраняется. У C₄-растений, накапливающих дикарбоновые кислоты (кукуруза, сахарный тростник), пируват-ортофосфатдикиназа тоже ответственна за синтез фосфоенолпирувата, который затем с помощью ФЕП-карбоксилазы превращается в оксалоацетат.

Ацетат как субстрат. Рост микроорганизмов на среде с ацетатом или соединениями, катаболизм которых ведет к образованию ацетата (жирные кислоты, углеводороды), оказывается возможным благодаря глиоксилатному циклу, или **циклу Кребса – Корнберга** (рис. 7.14). Эта анаплеротическая последовательность реакций протекает при участии двух ферментов: **изоцитратлиаза** расщепляет изоцитрат на сукцинат и глиоксилат:

¹ Такой же фермент есть у некоторых фототрофных пурпурных и зеленых бактерий. – Прим. ред.

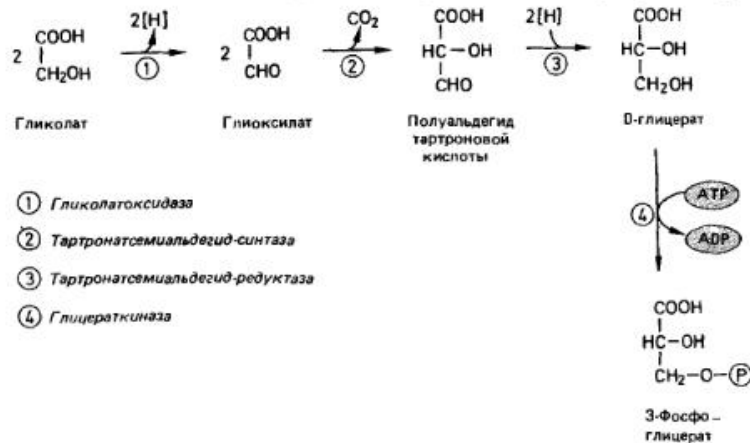


а **малатсинтаза** катализирует присоединение глиоксилата к ацетилкоферменту А с образованием яблочной кислоты:



Таким образом, под действием изоцитратлиазы и малатсинтазы происходит превращение одного моля изоцитрата и одного моля ацетилкофермента А в два моля C₄-дикарбоновых кислот. Эти кислоты под действием **малатдегидрогеназы** (декарбоксилирующей) превращаются в пируват или под действием ФЕП-карбоксилазы – в фосфоенолпируват, т.е. могут использоваться для глюконеогенеза. Кроме того, из этих соединений образуется оксалоацетат для цитратсинтазной реакции, что служит источником строительных блоков для процессов биосинтеза. Для поддержания цикла трикарбоновых кислот во время превращений глюкозы, а также пирувата или других C₃-соединений глиоксилатный цикл, видимо, существенного значения не имеет.

Глиоксилат как субстрат. Когда источником углерода служит глиоксилат (или его предшественники – гликолат, мочевая кислота), индуцируются ферменты **D-глицератного пути**. Две молекулы глиоксилата под действием синтазы тартроновой кислоты (этот фермент называют также глиоксилат-карболигазой) превращаются в полуальдегид тартроновой кислоты (2-гидрокси-3-оксопропанат) с выделением CO₂. Этот альдегид восстанавливается с помощью специфической редуктазы до D-глицерата и фосфорилируется с образованием 3-фосфоглицерата:



- ① Гликолатоксидаза
- ② Тартроносемальдегид-синтаза
- ③ Тартроносемальдегид-редуктаза
- ④ Глицераткиназа

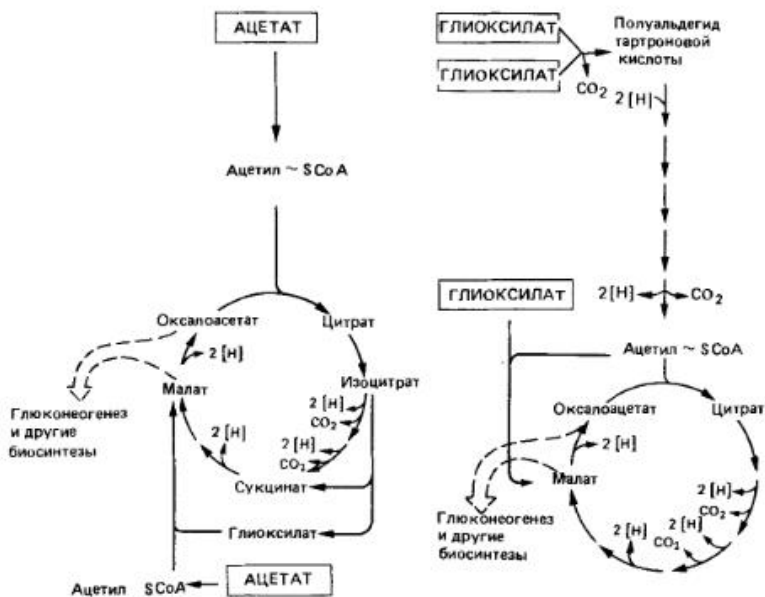


Рис. 7.14. Метаболические пути, обеспечивающие клетку энергией и углеродными компонентами во время роста на среде с ацетатом. Путь расщепления (цикл трикарбоновых кислот) показан черными, а анаплеротический путь (глиоксилатный цикл) — красными стрелками. (H. L. Kornberg.)

Рис. 7.15. Метаболические пути, обеспечивающие клетку энергией и углеродными компонентами при росте на среде с гликолатом, глиоксилатом или мочевой кислотой. Глиоксилат по D-глицератному пути превращается в ацетил-СоА и окисляется в цикле трикарбоновых кислот (черные стрелки). Анаплеротический путь показан красными стрелками. (L. N. Ornston, M. K. Ornston.)

Образующийся из 3-фосфоглицерата обычным путем ацетилкофермент А включается в цикл трикарбоновых кислот и окисляется (рис. 17.15). Поставку промежуточных продуктов обеспечивает малатсинтаза; она катализирует реакцию еще одной молекулы глиоксилата с ацетилкоферментом А, в результате которой образуется малат.

В то время как ферменты главных метаболических путей всегда присутствуют в клетках, растущих, например, на таких субстратах, как глюкоза, ферменты вспомогательных циклов могут быть индуцибельными. При росте на средах с глюкозой содержание этих ферментов в клетках очень невелико, и часто их с трудом удается выявить. Этот минимальный уровень ферментативной активности называют *основным уровнем*. Лишь после переноса клеток в питательную среду, содержащую в качестве единственного источника энергии и углерода ацетат или глиоксилат, индуцируется синтез соответствующих ферментов. При полной индукции содержание таких ферментов может в 100 и более раз превышать основной уровень. Определяя их активность до и после

смены субстрата, можно установить, действительно ли их образование было индуцировано субстратом. Если фермент образовался, то мы вправе заключить, что он участвует в метаболизме нового субстрата. Однако для полной уверенности следует провести опыты с мечеными соединениями, т.е. внести в среду вещества с радиоактивной меткой, а затем убедиться в том, что меченые атомы вошли в состав промежуточных и конечных продуктов метаболизма.

Не следует думать, что все ферменты, участвующие в углеводном обмене, входят в постоянный набор клеточных ферментов, т.е. являются конститутивными. Если, например, бактериальные клетки растут на среде с ацетатом, то в них часто образуются только те из ферментов обмена глюкозы, которые участвуют также и в глюконеогенезе; ферменты же, катализирующие только реакции катаболизма глюкозы, содержатся в таких клетках лишь в малых количествах или вовсе не выявляются.

Если среда содержит сразу два субстрата, то клетки нередко используют только один из них. Например, при росте *Escherichia coli* или псевдомонад на среде с глюкозой и ацетатом сначала метаболизируется глюкоза. Ферменты, необходимые для использования ацетата, не образуются — их синтез не индуцируется до тех пор, пока в среде присутствует глюкоза. В таком случае говорят о *катаболической репрессии* синтеза ферментов, необходимых для использования ацетата. Подробнее с регуляцией ферментов мы познакомимся в главе 16.

7.6 Биосинтез некоторых низкомолекулярных веществ

Биосинтез аминокислот. Большинство микроорганизмов и зеленые растения способны синтезировать *de novo* все двадцать аминокислот, из которых строятся белки. Углеродные скелеты аминокислот образуются из промежуточных продуктов обмена. Аминогруппы вводятся путем прямого аминирования или трансаминирования. Перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через аммиак. Нитраты, нитриты и молекулярный азот предварительно восстанавливаются до аммиака (ассимиляционная нитратредукция) и только после этого включаются в состав органических соединений (рис. 7.16, а, б, в).

Лишь немногие из аминокислот образуются в результате **прямого аминирования** свободными ионами NH_4^+ . В первичной ассимиляции аммиака участвуют *L-глутаматдегидрогеназа* (рис. 7.16, е) и *L-аланиндегидрогеназа* (ж), которые осуществляют восстановительное аминирование 2-оксокислот; АТФ в этом процессе не участвует. Образование глутамина из глутамата катализируется *глутаминсинтетазой* (з). Этот фермент имеет во много раз большее сродство к ионам аммония (меньшую константу K_M), чем названные дегидрогеназы, и поэтому активен даже при крайне низких концентрациях NH_4^+ ; для образования глутамина необходим АТФ. С помощью *глутаматсинтазы* (д) амидная группа глутамина может быть перенесена на 2-оксоглутарат. Эта система включе-

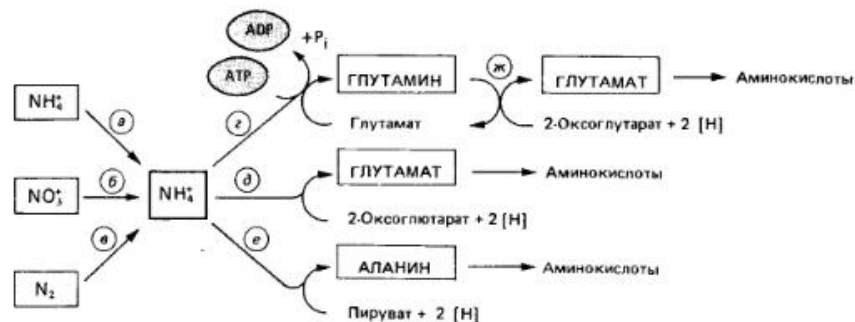


Рис. 7.16. Важнейшие пути ассимиляции азота. Ионы аммония, содержащиеся в питательной среде, непосредственно поглощаются клетками (а). Ионы нитрата при ассимиляционной нитратредукции (б), а молекулярный азот (N_2) при фиксации азота (в) восстанавливаются до ионов аммония. В органические соединения аммонийный азот переводится либо при участии АТФ путем образования глутамина, либо без затраты АТФ путем прямого восстановительного аминирования 2-оксoglутарата или пирувата.

ния аммонийного азота в органические соединения у многих бактерий и растений, видимо, создается и используется в тех случаях, когда концентрация ионов аммония в среде очень мала (меньше 1 мМ/л), а также при фиксации N_2 .

Большинство остальных аминокислот получает свою аминогруппу от одной из первичных аминокислот в результате **трансаминирования**. Из свободных аминокислот в цитоплазме количественно преобладает глутаминовая кислота (больше половины всего «пула» аминокислот).

У ряда микроорганизмов хорошо изучены пути синтеза всех двадцати аминокислот. Исходным материалом для синтеза служат простые промежуточные продукты обмена (пируват, 2-оксoglутарат, оксалоацетат или фумарат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат и АТФ). При синтезе большинства аминокислот аминогруппа вводится только на последнем этапе путем трансаминирования. Некоторые аминокислоты образуются в результате ряда превращений других аминокислот, и в этих случаях трансаминирования не требуется. Аминокислоты можно подразделить на группы, исходя из путей их синтеза (рис. 7.17). Синтез различных аминокислот включает разное число этапов, катализируемых ферментами. Примечателен тот факт, что аминокислоты, которые человек должен получать в готовом виде, синтезируются особенно длинным путем.

Относительно быстрое выяснение путей **биосинтеза** аминокислот и других соединений стало возможным благодаря использованию ауксотрофных мутантов грибов и особенно бактерий. Ауксотрофность многих мутантов обусловлена утратой способности к образованию какого-то фермента, участвующего в биосинтезе. Для роста мутанта нужен в этом случае конечный продукт того пути биосинтеза, который блокирован из-за выпадения функции фермента. Эти мутанты обладают еще

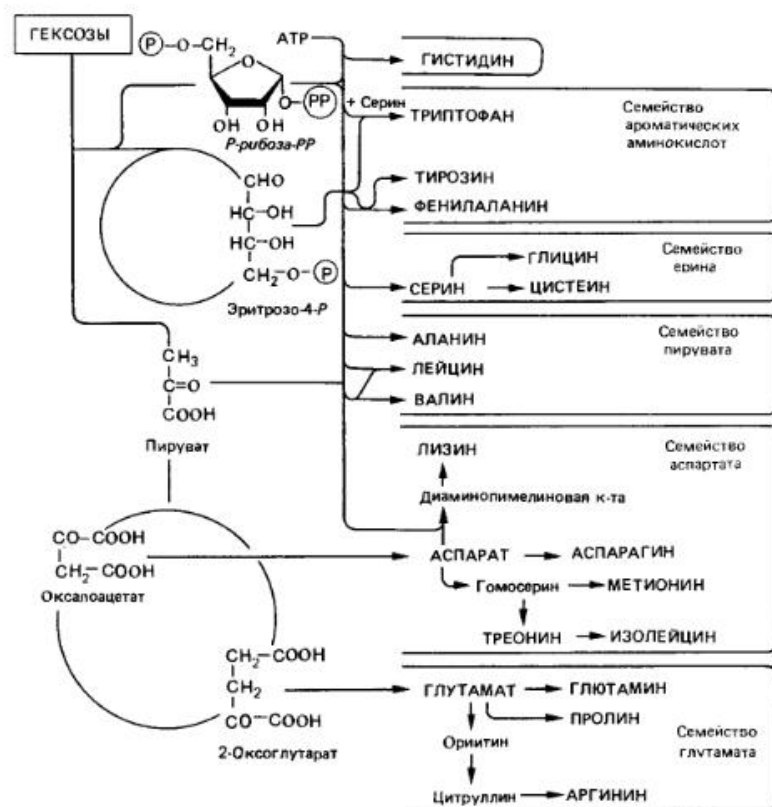


Рис. 7.17. Двадцать аминокислот, необходимых для синтеза белков, образуются из простых соединений – продуктов промежуточного обмена.

одним ценным свойством: они растут не только в присутствии конечного продукта блокированного пути, но и в присутствии промежуточных продуктов, образующихся на отрезке между блокированным этапом и конечным продуктом. В то же время субстрат для блокированной реакции часто накапливается: если, например, отсутствует фермент *b*, то в среду выделяется промежуточный продукт В:



Благодаря этому некоторые мутанты, у которых блокированы разные этапы одного и того же пути синтеза, могут снабжать друг друга недостающими веществами. Мутант с блоком на более позднем этапе (отсутствие фермента *d*) обеспечивает недостающим промежуточным

продуктом клетки другого мутанта с блоком на более раннем этапе (отсутствие фермента *b*). В результате таких опытов удается расположить определенных мутантов в ряд, в котором каждый предшествующий мутант будет поддерживать рост всех следующих за ним. Путем анализа накапливающихся промежуточных продуктов, выделения и очистки ферментов, а также с помощью других методов удалось уже выяснить многие пути биосинтеза.

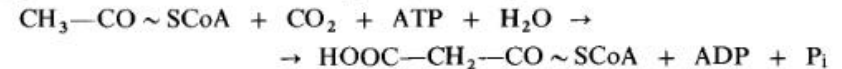
Биосинтез нуклеотидов. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те структурные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты; нуклеотиды входят также в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминокислот, сахаров, компонентов клеточной стенки и липидов. Синтез всех пуриновых нуклеотидов идет общим путем, разветвляющимся лишь на стадии инозиновой кислоты, после чего образуется либо адениловая, либо гуаниловая кислота. Общим является и путь синтеза пиримидиннуклеотидов. Здесь разделение происходит на уровне уридилловой кислоты.

Исходным соединением для образования пентозного компонента нуклеотидов служит рибозо-5-фосфат. Он может синтезироваться двумя путями: 1) окислительным — из глюкозо-6-фосфата через окислительный пентозофосфатный путь и 2) неокислительным — из фруктозо-6-фосфата и глицеральдегид-3-фосфата в результате реакций, катализируемых трансальдозазой и транскетолоазой (разд. 7.2.2). Рибозо-5-фосфат используется для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в высокоэнергетической форме — в виде фосфорибозилпирофосфата. Восстановление рибозы до дезоксирибозы происходит на стадии рибонуклеотида и может осуществляться различным образом.

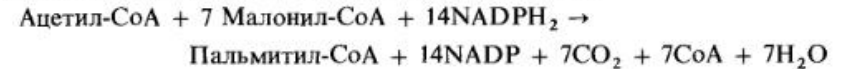
Биосинтез жиров. Жиры и вообще липиды, с одной стороны, являются важными компонентами плазматических мембран и клеточных стенок, а с другой — служат запасными веществами. В бактериальных жирах преобладают жирные кислоты с длинной цепью ($C_{14} - C_{18}$), насыщенные и ненасыщенные с одной двойной связью. Ненасыщенные жирные кислоты с несколькими двойными связями и стероиды, видимо, отсутствуют; редки также триглицериды. Большое значение имеют сложные липиды. Они представляют собой сложный эфир глицерола, в котором две спиртовые группы этерифицированы жирными кислотами¹, а третья — остатком фосфорной кислоты или сахаром. Остаток фосфорной кислоты в свою очередь связан с серином, этаноламином или глицеролом. Такие липиды обнаружены у многих бактерий; к этой группе соединений принадлежат, в частности, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол и фосфатидилэтанолламин.

Жирные кислоты с длинной цепью синтезируются путем конденсации и восстановления ацетатных групп. Для повышения реакционной способности метильная группа ацетилкофермента А сначала карбокси-

лируется в биотин-зависимой реакции с образованием малонил-CoA:



В последующих реакциях конденсации карбоксильная группа снова отщепляется в виде CO_2 . Синтез жирных кислот происходит при участии мультиферментного комплекса согласно уравнению



7.7 Поглощение веществ клетками

Для того чтобы экзогенный субстрат мог быть использован клеткой, он должен пройти через ее пограничные слои. Клеточная стенка не служит существенной преградой для небольших молекул и ионов, но она задерживает макромолекулы, масса которых превышает 600 Да. Пограничным слоем, ответственным за транспорт питательных веществ внутрь клетки, является плазматическая мембрана.

Перенос питательных веществ через плазматическую мембрану, как правило, специфичен: поглощаться могут только те вещества, для которых имеется соответствующая транспортная система. За небольшими исключениями, транспорт зависит от наличия специфических пермеаз или транслоказ. Речь идет о мембранных белках, само название которых указывает на то, что они обладают свойствами ферментов, т.е. могут индуцироваться субстратом, специфичны в отношении субстрата и образуются только в таких условиях, в которых возможен синтез белков.

Что касается механизма транспорта веществ, то различают ряд различных процессов, два из которых способны обеспечивать только транспорт, но не накопление веществ в клетке; им можно противопоставить процессы *активного транспорта*, приводящие к аккумуляции веществ внутри клетки (рис. 7.18 и 7.19).

Простая диффузия. Неспецифическое проникновение веществ в клетку происходит путем пассивной диффузии. Для диффузии существенны величина молекул и степень их липофильности. Скорость перемещения путем диффузии невелика. Для сахаров такие процессы не были обнаружены, и они мало вероятны. Путем простой диффузии в клетку проникают, видимо, яды, ингибиторы и другие чуждые клетке вещества.

Облегченная диффузия. При облегченной диффузии вещество, содержащееся в питательной среде, транспортируется в клетку «вниз» по своему градиенту концентрации. Этот процесс осуществляется благодаря субстрат-специфической пермеазе и не требует затраты метаболической энергии. Скорость транспорта в широком диапазоне зависит от концентрации субстрата в среде (рис. 7.19). Питательное вещество не может накапливаться в клетке против градиента концентрации.

¹ У архебактерий не обнаружено липидов, содержащих жирные кислоты.—

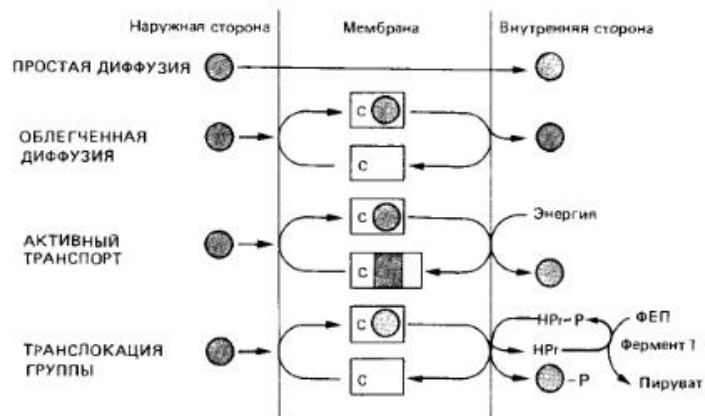


Рис. 7.18. Схема четырех механизмов транспорта веществ в клетку. Розовый кружок – транспортируемый субстрат; с – пермеаза (белок-переносчик); с с серым прямоугольником – энергизованный переносчик; ФЕП – фосфоенолпируват; ТБ – термостабильный белок. Пояснения в тексте.

Активный транспорт. Активный транспорт и транслокация группы имеют с облегченной диффузией то общее, что эти процессы происходят с участием субстрат-специфических транспортных белков. Однако в отличие от облегченной диффузии такого рода транспорт требует затраты энергии. При использовании метаболической энергии вещество может накапливаться в клетке против концентрационного градиента. Основное различие между активным транспортом и транслокацией



Рис. 7.19. Кривые насыщения при поглощении двух субстратов интактными клетками бактерий [построены по данным о потреблении O_2 (интенсивности дыхания)]. Активное и пассивное поглощение субстрата можно различить по форме кривой. Так как субстрат А поглощается путем активного транспорта и накапливается в клетке, дыхание даже при очень малых концентрациях субстрата достигает максимального уровня. Субстрат Б поглощается пассивно, и интенсивность дыхания достигает максимума лишь при относительно высокой концентрации такого субстрата (порядка 10–20 мМ/л).



Рис. 7.20. Различные виды активного транспорта, для которых источником энергии служит протонный потенциал Δp .

группы заключается в природе молекулы, поступающей внутрь клетки.

При активном транспорте в цитоплазму поступает та же молекула, которая была поглощена из питательной среды. При транслокации группы переносимая молекула в процессе транспорта видоизменяется, например фосфорилируется.

Все теории, объясняющие активный транспорт, включают представление о наличии в мембране специфических транспортных белков. Эти белки получили названия, указывающие на их функцию: пермеазы, транслоказы, белки-транслокаторы, переносчики. Транспортные процессы отличаются друг от друга главным образом тем, что служит для них источником энергии – протонный потенциал Δp (рис. 7.20), АТФ или фосфоенолпируват (рис. 7.18).

Для переноса многих веществ, в том числе неорганических и органических ионов, а также сахаров, используется энергия протонного потенциала (см. стр. 243–244). Бактериальные клетки поддерживают протонный потенциал, непрерывно откачивая из клетки протоны и другие ионы (Na^+). Для этого в мембране имеются специфические транспортные белки.

Каждый из этих белков имеет совершенно определенную функцию. Есть, например, белок, катализирующий одновременный и однонаправленный перенос одного протона и одной молекулы сахара (лактозы, мелибиозы, глюкозы). В таких случаях говорят о **симпорте** двух (или нескольких) веществ. Другие транспортные белки катализируют одновременный встречный перенос двух частиц, например одного протона и какого-то другого иона (Na^+ или аниона органической кислоты); в этих случаях говорят об **антипорте**. При переносе сахаров, сопряженном с транспортом ионов, вероятно, всегда используются ионы H^+ или Na^+ . У прокариот преобладает симпорт с ионами H^+ , у эукариот – симпорт с Na^+ (рис. 7.20).

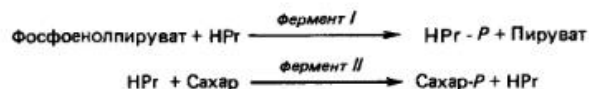
То, что у бактерий действительно существуют транспортные белки описанного типа, было подтверждено (а) путем очистки и последующего встраивания белка-переносчика в протопласты или в так называемые липосомы и (б) путем выделения мутантов, лишенных соответствующе-

го белка и его специфической функции. Что касается транспорта с использованием энергии протонного потенциала, то это, вероятно, наиболее распространенный механизм активного поглощения субстратов.

Представление об участии специфических белков-переносчиков в транспорте ионов подтверждают данные о действии ряда антибиотиков и синтетических веществ. Речь идет о **инофорах**. Это соединения с относительно небольшой молекулярной массой (500–2000), молекулы которых снаружи гидрофобны, а внутри гидрофильны. Обладая гидрофобными свойствами, они диффундируют в липидную мембрану. Из антибиотиков-инофоров наиболее известен валиномицин; он диффундирует внутрь мембраны и катализирует транспорт (унипорт) ионов K^+ , Cs^+ , Rb^+ или NH_4^+ . Поэтому присутствие таких катионов в суспензионной среде приводит к выравниванию заряда по обе стороны мембраны (как бы короткому замыканию) и тем самым к падению протонного потенциала. Другие инофоры образуют каналы, по которым могут проходить ионы. Существуют также синтетические соединения, повышающие протонную проводимость мембран; наиболее известный переносчик протонов – карбонилцианид-*l*-трифторметоксифенилгидразон. Он действует как «разобщитель» – нарушает сопряжение синтеза АТФ с транспортом электронов, перенося в клетку протоны в обход АТФ-синтазы. Изучение мембранного транспорта привело к важным результатам, которые согласуются с хемиосмотической теорией преобразования энергии и подкрепляют ее.

Наряду с транспортными системами, использующими протонный потенциал, существуют также системы, зависящие от АТФ. Определенную роль здесь играют периплазматические связывающие белки (рис. 2.28). Плазматическая мембрана животных клеток не транспортирует протоны и не создает протонного градиента. Мембранный потенциал, вероятно, поддерживается только АТФ-зависимыми насосными механизмами, например натрий-калиевым насосом, а натриевый потенциал в свою очередь доставляет энергию для симпорта питательных веществ вместе с ионами Na^+ .

Транслокация группы. При транспорте этого типа молекула химически модифицируется; поглощается, например, сахар как таковой, а внутрь клетки он поступает в фосфорилированной форме. Фруктоза, глюкоза, маннитол и родственные вещества поглощаются с помощью фосфотрансферазной системы, зависимой от фосфоенолпирувата. Эта система состоит из неспецифического и специфического компонентов. Неспецифический компонент – это термостабильный белок, который при участии фермента I, находящегося в цитоплазме, фосфорилируется фосфоенолпируватом. Второй компонент – находящийся в мембране индуцибельный фермент II, специфичный для того или иного сахара; он катализирует перенос фосфата с термостабильного белка (ТБ) на сахар во время транспорта последнего через мембрану:



Фермент II, вероятно, выполняет функцию пермеазы и фосфотрансферазы одновременно (см. рис. 7.18).

В остальном поглощении веществ клетками – процесс очень сложный и пока еще плохо изученный. Многие метаболические эффекты торможения и явления конкуренции между одновременно доступными субстратами связаны, по-видимому, с особенностями регуляторных механизмов, которые проявляются уже в процессах транспорта веществ.

Выход веществ из клетки. О выходе метаболитов в окружающую среду известно существенно меньше, чем о механизмах поглощения веществ клеткой. По-видимому, и выделение их из клетки тоже происходит как при участии транспортных систем, так и путем неконтролируемой диффузии. Вещества выходят из клетки тогда, когда в результате перепроизводства они накапливаются в ней, достигая концентраций, превышающих нормальный уровень. Накопление может быть следствием неполного окисления, нарушения регуляции или процессов брожения.

Транспорт железа. Для транспорта этого макроэлемента микробная клетка обладает специальным механизмом. В анаэробных условиях железо представлено двухвалентным ионом (Fe^{2+}), и его концентрация может достигать 10^{-1} М/л, так что она не лимитирует рост микроорганизмов. Однако в аэробных условиях при pH 7,0 железо представлено в виде гидроксидного комплекса Fe^{3+} , который почти нерастворим; концентрация ионов трехвалентного железа составляет всего лишь 10^{-18} М/л. Неудивительно поэтому, что микроорганизмы выделяют вещества, переводящие железо в растворимую форму. Эти вещества – так называемые **сидерофоры** – связывают ионы Fe^{3+} в комплекс и в таком виде транспортируют его; речь идет в основном о низкомолекулярных водорастворимых веществах (с мол. массой меньше 1500), связывающих железо координационными связями с высокой специфичностью и высоким сродством (константа устойчивости порядка 10^{30}). По своей химической природе это могут быть феноляты или гидроксаматы. К первым относится энтерохелин; он обладает шестью фенольными гидроксигруппами, и его выделяют некоторые энтеробактерии. Выйдя в окружающую среду, он связывает железо, и образовавшийся ферри-энтерохелин поглощается клеткой. В клетке железо освобождается в результате ферментативного гидролиза ферри-энтерохелина (рис. 7.21).

Многие грибы для той же цели образуют **феррихромы**; их относят к гидроксаматным сидерофорам. Это циклические гексапептиды, удерживающие трехвалентное железо с помощью трех гидроксаматных групп. Они тоже выделяются из клетки в виде не содержащих железо соединений, связывают в питательной среде железо и в виде феррихромов снова поглощаются. В клетке железо восстанавливается до Fe^{2+} , к которому феррихромы имеют лишь незначительное сродство и поэтому освобождают его. Сходную функцию выполняют ферриоксамины (у актиномицетов), микобактины (у микобактерий) и экзохелины (тоже у микобактерий).



Рис. 7.21. Примеры механизмов переноса железа в клетки микроорганизмов с участием сидерофоров. *Вверху*—система транспорта с помощью энтерохелина, свойственная многим бактериям; *внизу*—феррихромная система, имеющаяся у многих грибов.

Микроорганизмы обычно выделяют сидерофоры в питательную среду только тогда, когда железо лимитирует рост. Выделение сидерофоров—следствие депрессии их синтеза. В присутствии растворенного, комплексно связанного железа сидерофоры синтезируются лишь в малых количествах и удерживаются в клеточной стенке. В этих условиях они служат только для транспорта железа в клетку.

В связи с этим интересно то, что среди естественных защитных приспособлений высших организмов мы находим «очистку» внутренней среды от железа. Существуют специальные белки, которые так прочно связывают имеющееся железо, что оно становится недоступным для микроорганизмов. Так, например, в белке куриного яйца содержится кональбумин, в молоке, слезной жидкости и слюне—лактоферрин, а в сыворотке крови—серотрансферрин. При посеве бактерий на куриный белок они растут только в том случае, если одновременно с инокуляцией вводят ионы железа (в виде цитрата). Таким образом, железо играет важную роль в антагонистических отношениях между высшими организмами и бактериями. Борьбу выигрывает тот партнер, который вырабатывает вещество, прочнее связывающее железо.

8. Типы брожения

Как уже говорилось выше, получение энергии—необходимая предпосылка для жизнедеятельности клеток. Из трех принципиально возможных способов регенерации АТФ (дыхание, брожение и фотосинтез) брожение—наиболее простой.

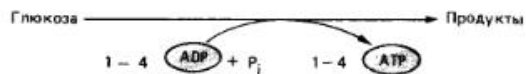
Брожение—это такой метаболический процесс, при котором регенерируется АТФ, а продукты расщепления органического субстрата могут служить одновременно и донорами, и акцепторами водорода. Реакции, приводящие к фосфорилированию АДФ, являются реакциями окисления. От окисленного углерода клетка избавляется, выделяя CO_2 . Отдельные этапы окисления представляют собой дегидрирование, при котором водород переносится на NAD. Акцепторами водорода, находящегося в составе NADH_2 , служат промежуточные продукты расщепления субстрата. При регенерации NAD последние восстанавливаются, а продукты восстановления выводятся из клетки.



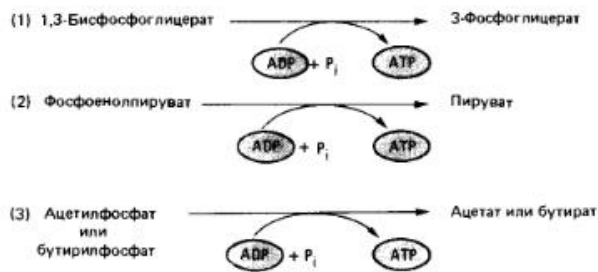
При сбраживании углеводов и ряда других веществ образуются (по отдельности или в смеси) такие продукты, как этанол, лактат, пропионат, формиат, бутират, сукцинат, капронат, ацетат, *n*-бутанол, 2,3-бутандиол, ацетон, 2-пропанол, CO_2 и H_2 . В зависимости от того, какие продукты преобладают или являются особенно характерными, различают спиртовое, молочнокислое, пропионовокислое, муравьинокислое, маслянокислое и уксуснокислое брожение. Молекулярный кислород в процес-

сах брожения не участвует: «Брожение – это жизнь без воздуха» (Л. Пастер). Многие микроорганизмы, осуществляющие брожение, – облигатные анаэробы, а некоторые – факультативные анаэробы, способные расти как в присутствии кислорода, так и без него; при этом кислород подавляет брожение и оно сменяется дыханием.

Регенерация АТФ при брожении. При сбраживании глюкозы микроорганизмами образуется от 1 до 4 молей АТФ:

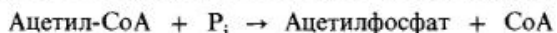


Ввиду большого числа возможных продуктов брожения кажется удивительным, что в преобразовании энергии путем фосфорилирования на уровне субстрата участвуют лишь немногие реакции, из которых здесь будут представлены три наиболее важные:



У большинства микроорганизмов, осуществляющих брожение, используются только реакции, катализируемые *фосфоглицераткиназой* (1) или *пируваткиназой* (2), а необходимые акцепторы водорода образуются при этом из пирувата и ацетилкофермента А. При сбраживании одного моля глюкозы образуется лишь от двух до трех молей АТФ, а продуктами оказываются лактат, этанол, ацетон, бутират, *n*-бутанол, 2-пропанол, 2,3-бутандиол, капролат, ацетат, CO₂ и молекулярный водород.

При использовании *ацетаткиназы* [реакция (3)] бактерии получают дополнительный АТФ. Ацетилфосфат образуется из ацетил-СоА и неорганического фосфата с помощью фосфотрансацетилазы:



Кроме того, возможно образование ацетилфосфата из фосфорилированных сахаров (ксилулозо-5-фосфата, фруктозо-6-фосфата) при участии *фосфокетолазы*.

Способность бактерий использовать реакцию, катализируемую ацетаткиназой (3), зависит от того, могут ли они выделять молекулярный водород (H₂). В случае переноса восстановительных эквивалентов (электронов) на протоны они могут выделяться в виде молекулярного водорода; поэтому клетке нет надобности синтезировать акцепторы водорода.

Чтобы понять это, нужно остановиться на механизмах высвобождения H₂.

Анаэробные бактерии окисляют пируват в ацетил-СоА двумя способами (см. реакции (2) и (3) в начале раздела 7.2.4). В реакции, катализируемой пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой (эта реакция свойственна, в частности, кластридиям), восстанавливается ферредоксин (Fd). Его окислительно-восстановительный потенциал очень низок ($E^0 = -420$ мВ), поэтому с помощью специальной гидрогеназы – ферредоксин:H₂-оксидоредуктазы – может освобождаться газообразный водород:



В реакции, катализируемой пируват:формат-лиазой (как у энтеробактерий), наряду с ацетил-СоА образуется также формиат. Он может расщепляться гидрогенлиазной системой:



Оба механизма выделения H₂ имеют между собой то общее, что у предшественников (FdH и формиата) очень низкие окислительно-восстановительные потенциалы. Поэтому клетке нетрудно избавляться от восстановительных эквивалентов, образующихся при окислении пирувата в ацетил-СоА.

В отличие от этого водород, образующийся при дегидрировании глицеральдегид-3-фосфата и связанный в форме NADH₂, у большинства анаэробных бактерий передается затем на органические акцепторы. Многие бактерии обладают, однако, способностью высвобождать и эти восстановительные эквиваленты в виде H₂ благодаря ферменту NADH₂:ферредоксин-оксидоредуктазе, катализирующему реакцию

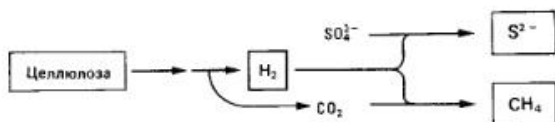


С помощью гидрогеназы от FdH может отделяться H₂. Так как эти реакции связаны с увеличением потенциала Н (от $E'_0 = -320$ мВ для NADH₂ до $E'_0 = -420$ мВ для ферредоксина) и их равновесие неблагоприятно для выделения H₂, они протекают только тогда, когда образующийся и выделяющийся молекулярный водород непрерывно удаляется. Поэтому организмы, способные к образованию H₂ из NADH₂, могут воспользоваться этим изящным способом избавления от водорода в форме H₂ только тогда, когда живут вместе с другими видами, непрерывно потребляющими H₂. Именно так обычно обстоит дело в природе. Такое явление называют межвидовой передачей водорода и говорят об особой форме симбиоза в микробных сообществах.

Бактерии, способные таким образом избавляться от связанного с NAD водорода, выделяя его в виде H₂, естественно, могут обходиться без превращения ацетил-СоА в акцепторы для NADH₂. Поэтому они

могут превращать ацетил-CoA в ацетилфосфат и регенерировать ATP путем ацетилкиназной реакции. Выделяют они главным образом ацетат и при сбраживании одного моля глюкозы способны регенерировать до четырех молей ATP (как, например, *Ruminococcus albus*; см. стр. 299).

Роль процессов брожения в балансе природы. Виды, осуществляющие брожение, играют важную роль в природном круговороте веществ. Большая часть целлюлозы, поедаемой растительными животными, выводится в неперевааренном виде с калом. Когда этот содержащий целлюлозу детрит попадает в анаэробные слои почвы или донных осадков водоемов, целлюлозу сбраживают разлагающие ее клостридии и некоторые другие строго анаэробные бактерии. При этом образуются названные выше продукты брожения, в том числе почти всегда молекулярный водород. Водород находится в начале анаэробной пищевой цепи, главные продукты которой метан и (или) сероводород:



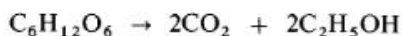
В осадках пресноводных озер и в рубце жвачных H₂ превращается метанобразующими бактериями в метан, а в морских анаэробных экосистемах сульфатредуцирующие бактерии превращают H₂ и сульфат в сероводород.

8.1 Спиртовое брожение, вызываемое дрожжами и бактериями

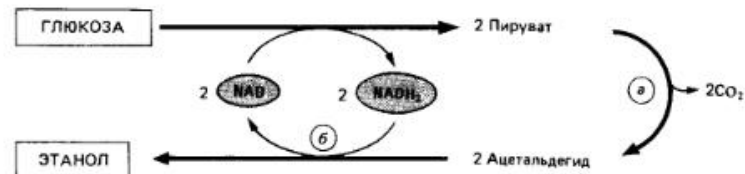
Этиловый спирт (этанол) — один из широко распространенных продуктов сбраживания сахаров микроорганизмами. Даже растения и многие грибы в анаэробных условиях накапливают этанол. Главные продуценты этанола — дрожжи, особенно штаммы *Saccharomyces cerevisiae*. Дрожжи, как и большинство других грибов, осуществляют аэробное дыхание, но без доступа воздуха они сбраживают углеводы до этанола и CO₂. У ряда анаэробных и факультативно-анаэробных бактерий этиловый спирт тоже является главным или побочным продуктом сбраживания гексоз или пентоз.

8.1.1 Образование этанола дрожжами

В изучении описанных выше путей обмена важную роль сыграли работы, проведенные на дрожжах. Еще Гей-Люссак (в 1815 г.) дал уравнение, описывающее превращение глюкозы в этанол в той форме, как это принято и теперь:



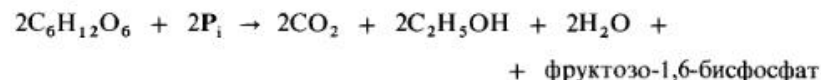
Нормальное сбраживание глюкозы дрожжами. Сбраживание глюкозы до этанола и CO₂ дрожжами (*Saccharomyces cerevisiae*) осуществляется по фруктозобисфосфатному пути. Превращение пирувата в этанол происходит в два этапа. Сначала пируват декарбоксилируется пируватдекарбоксилазой (а) при участии тиаминпирофосфата до ацетальдегида, а затем ацетальдегид восстанавливается алкогольдегидрогеназой (б) в этанол при участии NADH₂:



Переносится при этом водород, образующийся при дегидрировании триозофосфата; окислительно-восстановительный баланс, таким образом, сохраняется.

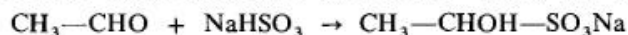
История исследования дрожжевого брожения. Нет смысла останавливаться здесь на курьезно звучащих в наше время спорах о природе брожения — о том, является ли образование спирта из сахара результатом «химического контактного действия» или же результатом деятельности живых существ. Л. Пастер окончательно разрешил вопрос о причинах брожения и установил, что дрожжи в аэробных условиях образуют из определенного количества сахара примерно в 20 раз больше клеточного вещества, чем в анаэробных. Он открыл также, что кислород подавляет брожение. Этот эффект, получивший название *эффекта Пастера*, приобрел с тех пор известность как один из классических примеров регуляции обмена веществ.

В 1896–1897 годах Бухнер и Хан обнаружили, что если к соку, полученному при растирании прессованных пивных дрожжей с кварцевым песком и кизельгуром, добавить сахар, то начинается брожение с образованием пены. Так впервые сложный биохимический процесс удалось осуществить вне клетки. В 1906 году Гарден и Ионг, тоже работавшие с дрожжевым соком, установили, что для сбраживания глюкозы нужен неорганический фосфат, который включается в фруктозо-1,6-бисфосфат. Сбраживание глюкозы дрожжевым соком происходит согласно уравнению Гардена–Ионга:



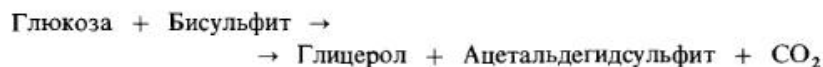
Формы брожения, открытые Нейбергом. Открытия Карла Нейберга и разработанные им оригинальные методы имеют не только историческое значение. Этот исследователь показал, что дрожжи способны сбраживать помимо глюкозы также и пируват. В качестве промежуточного продукта при сбраживании пирувата образуется ацетальдегид; это мож-

но доказать, связывая альдегид бисульфитом (который для дрожжей практически нетоксичен). Если к дрожжам, сбраживающим глюкозу, прибавить бисульфит, будет происходить следующая реакция:



При этом появится новый продукт брожения—глицерол—и одновременно снизится выход этанола и CO_2 .

Брожение в присутствии бисульфита стали использовать в промышленности при производстве глицерола. Эта технология основана на том, что ацетальдегид связывается и поэтому не может служить акцептором водорода. Вместо ацетальдегида роль такого акцептора принимает на себя дигидроксиацетонфосфат; он восстанавливается до глицерол-3-фосфата и дефосфорилируется с образованием глицерола. Брожение можно представить так:



Это модифицированное дрожжевое брожение известно как **вторая форма брожения по Нейбергу**. Принцип перехватывания одного из метаболитов—*метод ловушки*—стал впоследствии общим биохимическим методом.

При добавлении к бродящему раствору NaHCO_3 или Na_2HPO_4 тоже образуется глицерол, так как ацетальдегид превращается в результате реакции дисмутации в этанол и уксусную кислоту и поэтому не может быть использован в качестве акцептора водорода. Это **третья форма брожения по Нейбергу**:



Нормальное дрожжевое брожение Нейберг назвал **первой формой брожения**. Он считал, что образующийся при небиологическом разложении фруктозы 2-оксопропаноль (метилглиоксаль, $\text{CH}_3\text{—CO—CHO}$) также является промежуточным продуктом сбраживания глюкозы.

Отношение дрожжей к кислороду. Сбраживание дрожжами глюкозы—анаэробный процесс, хотя дрожжи—аэробные организмы. В анаэробных условиях брожение идет очень интенсивно, но роста дрожжей почти не происходит. При аэрации брожение ослабевает, уступая место дыханию. У некоторых дрожжей можно почти полностью подавить брожение усиленной аэрацией (эффект Пастера). Пастер открыл этот эффект более ста лет тому назад, исследуя процессы брожения при изготовлении вина. Это явление свойственно не только дрожжам, но и всем другим факультативно-анаэробным клеткам, включая клетки тканей высших животных.

Баланс превращений глюкозы (на примере типичного опыта с дрожжами) представлен в табл. 8.1. Аэрация уменьшает потребление глюко-

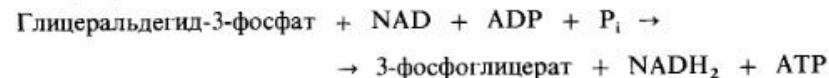
Таблица 8.1. Баланс превращений глюкозы при анаэробной и аэробной инкубации дрожжей (при 25°C) с 2,4-динитрофенолом (ДНФ) и без него. Числа указывают количество глюкозы, потребленной, расщепленной или ассимилированной в единицу времени. (Lynen F., Netter K. J., Schuegraf A. und G. Stix. "Phosphat-kreislauf und Pasteur-Effekt. 8. Colloquium d. Ges. f. Physiol. Chemie, Mosbach, Springer-Verl., Berlin, 1958)

	Анаэробные условия	Аэробные условия	Аэробные условия + 0,4 мМ ДНФ
Потребление	— 3,085	— 1,950	— 3,020
Расщепление	— 1,945	— 0,699	— 1,943
Брожение	— 1,945	— 0,343	— 1,387
Дыхание	—	— 0,356	— 0,556
Ассимиляция	— 1,145	— 1,251	— 1,077

зы, а также образование этанола и CO_2 , но делает возможным рост дрожжей. С энергетической точки зрения эти явления понятны; они указывают на существование у дрожжей чрезвычайно полезного регуляторного механизма: в анаэробных условиях образуются только 2 моля АТФ на один моль использованной глюкозы, а при дыхании—38 молей АТФ. Таким образом, клетка, регулируя превращения субстрата, может получать максимум энергии как в тех, так и в других условиях.

В третьем столбце табл. 8.1 приводятся результаты опыта, в котором дрожжи инкубировали в аэробных условиях в присутствии 0,4 мМ 2,4-динитрофенола (ДНФ). ДНФ разобщает фосфорилирование и окисление в дыхательной цепи: он нарушает сопряжение между переносом электронов и фосфорилированием, после чего дыхание протекает уже без контроля со стороны фосфорилирования. Добавление ДНФ практически исключает фосфорилирование в дыхательной цепи, и водород, отщепляющийся в цикле трикарбоновых кислот, уже не может использоваться для энергетических целей. Доступным для использования оказывается только высокоэнергетический фосфат, образующийся при расщеплении сукцинил-СoA. Результаты опыта показывают, что в присутствии ДНФ потребление глюкозы возрастает до величины, наблюдаемой в анаэробных условиях, что связано с его разобщающим действием.

В реакции Пастера участвует, видимо, несколько регуляторных механизмов, действующих в одном направлении. Эффект одного из них проявляется на уровне процессов фосфорилирования. В основе его лежит конкуренция за аденозиндифосфат (ADP) и неорганический фосфат (P_i). Для дегидрирования при расщеплении глицеральдегидфосфата необходимы ортофосфат и ADP:



Таким образом, расщепление субстрата (глюкозы) по фруктозобисфосфатному пути зависит от наличия ADP и неорганического фосфата. В отсутствие ADP и фосфата дегидрирование глицеральдегидфосфата оказывается невозможным. Однако в аэробных условиях с этой реакцией конкурирует за ADP и фосфат процесс фосфорилирования в дыхательной цепи, который тоже приводит к образованию АТФ. Вполне вероятно, что расщепление глюкозы, а вместе с тем и образование этанола тормозятся в результате снижения внутриклеточной концентрации ADP и фосфата. Если же под действием ДНФ процессы окисления в дыхательной цепи и фосфорилирование разобщаются, то ADP и фосфат снова могут использоваться для дегидрирования глицеральдегидфосфата, и аэробное потребление глюкозы повышается до уровня, соответствующего анаэробным условиям (табл. 8.1).

За реакцию Пастера ответствен еще один регуляторный механизм, а именно аллостерический эффект торможения фермента *фосфофруктокиназы* аденозинтрифосфатом. Это торможение будет рассмотрено в разделе 16.2.2.

Объяснение процесса, описанного Гарденом и Ионгом. Отжатый дрожжевой сок разлагает глюкозу в соответствии с уравнением Гардена–Ионга. Накопление фруктозо-1,6-бисфосфата объясняется в этом случае тем, что АТФ в нарушенной ферментной системе (в отличие от живой клетки) не может использоваться для энергетических целей и остается в избытке. Дрожжевой сок не содержит фосфатаз, поэтому ADP должен непрерывно регенерироваться за счет фосфорилирования лишней глюкозы или фруктозо-6-фосфата.

Применение дрожжей. Человек использует дрожжи в различных целях. Уже в древние времена из множества видов, рас и штаммов были отобраны наиболее подходящие для того или другого процесса. Для производства пива применяются слабо дышащие, преимущественно бродящие формы, относящиеся к так называемым «**низовым дрожжам**». Для получения спирта и вин и в хлебопечении используются главным образом «**верховые дрожжи**».

Пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) должны поднимать тесто в результате образования CO₂, т. е. осуществлять интенсивное брожение. Их выращивают в чанах при сильной аэрации. В качестве побочного продукта при этом всегда образуется этанол. Варьируя степень аэрации и режим добавления сахара, можно изменять относительный выход дрожжей и спирта. При проточном способе непрерывно прибавляют сахар, но так медленно, чтобы он ограничивал рост дрожжей. Это избавляет от образования продуктов брожения – весь сахар используется для роста. Источником азота служит аммоний. Необходимые ростовые вещества дрожжи получают из добавляемого пшеничного затора.

Пивные дрожжи по большей части относятся к низовым расам (мюнхенское, пильзенское пиво), реже к верховым (светлое пиво, эль, портер). В Центральной Европе пиво варят в основном из ячменя, выбирая для

этой цели ячмень с наименьшим содержанием белка и высоким содержанием крахмала. Поскольку дрожжи не образуют амилаз и могут сбраживать только сахара, но не крахмал, необходимо сначала обеспечить осахаривание крахмала. Для этого используют специфическую амилазу, образующуюся при прорастании зерен ячменя. Зерна дают набухнуть и прорастить; образовавшийся зеленый солод осторожно сушат при определенной температуре, при которой прерывается только процесс прорастания, а ферменты сохраняются. Просушенный солод размалывают и погружают в чаны с водой. При умеренной температуре крахмал через некоторое время осахаривается, превращаясь в мальтозу. Полученное сусло освобождается от дробины, к нему добавляют хмель, варят, охлаждают и подвергают брожению в бродильных чанах, прибавляя предварительно выращенные дрожжи.

Для получения **спирта (этанола)** путем брожения используют отходы производства сахара (мелассу) или картофель. Большие количества дешевого спирта получают также из гидролизатов древесины лиственных пород или из сульфитных щелоков – отходов бумажных фабрик. В гидролизатах древесины сбраживаются до этанола только гексозы. Остающиеся после этого пентозы используют для выращивания кормовых дрожжей (*Endomyces lactis* и видов *Torula*), для которых они служат источником углерода; эти дрожжи, богатые белками, добавляют в корм скоту.

Многие немецкие **вина** получают в результате спонтанного брожения виноградного сока, вызываемого дрожжами рода *Kloeckera*. Для подавления неконтролируемого брожения, вызываемого дикими дрожжами, неоднократно вносят чистые культуры дрожжей или смеси *Kloeckera* и *Saccharomyces*, которые подбирают в специальных винодельческих районах. Еще большее значение для букета вина имеет, однако, сорт винограда (Рислинг, Сильванер, Мюллер-Тургау, Шейребе, Кернер и др.), а также климатические и почвенные факторы, влияющие на рост виноградной лозы.

Во всех жидкостях, полученных путем дрожжевого брожения, содержатся **сивушные масла**: пропанол, 2-бутанол, 2-метилпропанол, амилловый (пентанол) и изоамиловый (триметилбутанол) спирты. Они представляют собой продукты нормального бродильного метаболизма дрожжей и обнаруживаются не только при их росте в сложных питательных растворах, содержащих аминокислоты. Основными компонентами сивушного масла являются побочные продукты обмена изолейцина, лейцина и валина.

8.1.2 Образование этанола бактериями

Известный для дрожжей путь образования этанола (фруктозобисфосфатный путь, пируватдекарбоксилазная реакция) из всех исследованных бактерий обнаружен только у *Sarcina ventriculi*.

Из пульке – бродящего сока агавы (*Agave mexicana*) в Мексике была

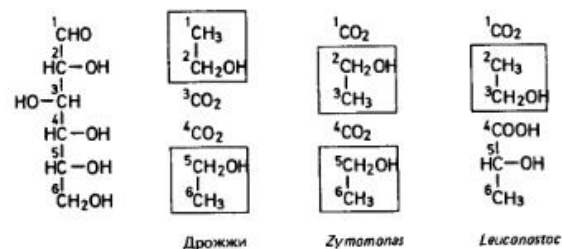


Рис. 8.1. Происхождение углеродных атомов этанола из углеродного скелета глюкозы при сбраживании глюкозы.

выделена палочковидная подвижная бактерия с полярными жгутиками, образующая этанол. Эта бактерия *Zyotomonas mobilis* разлагает глюкозу по 2-кето-3-дезоксиглюконовой пути и расщепляет пируват с помощью пируватдекарбоксилазы на ацетальдегид и двуокись углерода. Ацетальдегид восстанавливается до этанола. Единственными продуктами этого брожения являются этанол, CO_2 и небольшие количества молочной кислоты. Интересно, что в водке, приготовленной из сока агавы, обнаруживаются углеродные атомы 2, 3, 5 и 6 глюкозы, тогда как в спирте, образуемом дрожжами, содержатся углеродные атомы 1, 2, 5 и 6 (рис. 8.1).

При брожениях, вызываемых некоторыми видами *Enterobacteriaceae* и клостридиями, этанол является побочным продуктом. Предшественник этанола – ацетальдегид – образуется в этом случае не прямо из пирувата (под действием пируватдекарбоксилазы), а путем восстановления ацетил- CoA .

Совершенно иным путем образуют этиловый спирт гетероферментативные молочнокислые бактерии (например, *Leuconostoc mesenteroides*). Глюкоза разлагается ими по пентозофосфатному пути до пентозофосфата. На ксилулозо-5-фосфат воздействует фосфокетолаза:



Образовавшийся ацетилфосфат восстанавливается ацетальдегиддегидрогеназой и алкогольдегидрогеназой в этанол. Другой продукт расщепления глюкозы – глицеральдегид-3-фосфат – восстанавливается до лактата (через пируват).

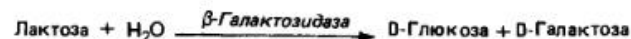
8.2 Молочнокислое брожение и семейство *Lactobacillaceae*

Молочнокислые бактерии объединяют в сем. *Lactobacillaceae*. Хотя эта группа морфологически гетерогенна (включает длинные и короткие палочки, а также кокки), в физиологическом отношении ее можно охарак-

теризовать достаточно хорошо. Все относящиеся к ней бактерии грамположительны, не образуют спор (за исключением *Sporolactobacillus inulinus*) и в подавляющем большинстве неподвижны. Все они используют в качестве источника энергии углеводы и выделяют молочную кислоту. В отличие от *Enterobacteriaceae*, тоже образующих лактат, молочнокислые бактерии способны только к брожению; они не содержат гемопroteinов (таких, как цитохромы и каталаза). Несмотря на это, *Lactobacteriaceae* могут расти в присутствии кислорода воздуха; будучи анаэробами, они все же азотолерантны. Если какая-нибудь бактерия растет в аэробных условиях, но не образует каталазу, ее с большой вероятностью можно отнести к молочнокислым бактериям.

Потребность в факторах роста. Еще один отличительный признак молочнокислых бактерий – это их потребность в ростовых веществах. Ни один представитель этой группы не может расти на среде с глюкозой и солями аммония. Большинство нуждается в ряде витаминов (лактофлавине, тиамине, пантотеновой, никотиновой и фолиевой кислотах, биотине) и аминокислотах, а также в пуринах и пиримидинах. Культивируют эти бактерии преимущественно на сложных средах, содержащих относительно большие количества дрожжевого экстракта, томатного сока, молочной сыворотки и даже крови. Неожиданным оказалось то, что некоторые молочнокислые бактерии (и другие организмы, осуществляющие брожение) при росте на средах, содержащих кровь, образуют цитохромы и даже, возможно, способны осуществлять фосфорилирование в дыхательной цепи. Молочнокислые бактерии не могут, следовательно, синтезировать порфирины; если же порфирины добавлены в питательную среду, то некоторые из этих бактерий способны образовать соответствующие геминные пигменты.

Таким образом, молочнокислые бактерии – это своего рода «метаболические инвалиды», которые, вероятно в результате своей специализации (рост в молоке и других средах, богатых питательными и ростовыми веществами), утратили способность к синтезу многих метаболитов. С другой стороны, многие из них обладают способностью, которой нет у большинства других микроорганизмов: они могут использовать молочный сахар (лактозу). В этом они сходны с многими кишечными бактериями (например, *Escherichia coli*). Лактоза в растительном царстве, по-видимому, не встречается; она образуется у млекопитающих, выделяется с молоком и соответственно с ним же поглощается. Таким образом, способность использовать лактозу можно считать приспособлением к среде, характерной для кишечника млекопитающих. Лактоза – дисахарид, который, прежде чем вступить на путь катаболизма гексоз, должен быть расщеплен:



Галактоза после фосфорилирования превращается в глюкозофосфат.

В связи с образованием больших количеств молочной кислоты питательная среда для молочнокислых бактерий должна быть хорошо забуферена. Чаще всего с этой целью добавляют карбонат кальция. На агаризованной среде со взвесью CaCO_3 («меловом агаре») образование кислоты обнаруживается по прозрачным ореолам вокруг колоний.

Распространение и места обитания. Распространение молочнокислых бактерий в природе определяется их сложными потребностями в питательных веществах и способом получения энергии (только брожение). Эти бактерии почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах. В естественных условиях они встречаются:

а) в молоке, местах его переработки и молочных продуктах (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*, *S. diacetilactis*);

б) на растениях и на разлагающихся растительных остатках (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrückii*, *L. fermentum*, *L. brevis*; *Streptococcus lactis*; *Leuconostoc mesenteroides*);

в) в кишечнике и на слизистых оболочках человека и животных (*Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium*; *Streptococcus faecalis*, *S. salivarius*, *S. bovis*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*).

Streptococcus faecalis—обычный обитатель кишечника человека; *S. bovis* распространен в пищеварительном тракте жвачных. Многие стрептококки являются безобидными обитателями слизистых рта, дыхательных и мочевых путей, половых органов; однако среди стрептококков есть и паразиты крови—весьма вирулентные возбудители болезней.

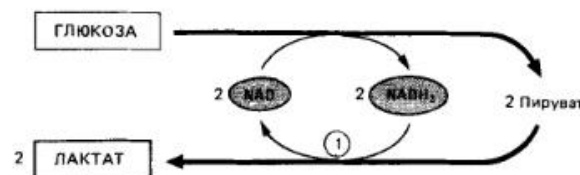
Благодаря образованию больших количеств молочной кислоты, к которой сами они в значительной степени толерантны, молочнокислые бактерии при подходящих условиях могут довольно быстро размножаться, вытесняя другие микроорганизмы. По этой причине их легко культивировать на элективных средах и легко выделять. «Естественные накопительные культуры» этих бактерий содержатся в кислом молоке и молочных продуктах, кислом тесте, кислой капусте, силосе и т.п.

Катаболизм углеводов и продукты брожения. В зависимости от того, какие продукты образуются при сбраживании глюкозы—только молочная кислота или также другие органические продукты и CO_2 ,—молочнокислые бактерии принято подразделять на гомоферментативные и гетероферментативные (табл. 8.2). Это старое деление отражает коренные различия в путях катаболизма сахаров.

Гомоферментативное молочнокислое брожение. Гомоферментативные молочнокислые бактерии образуют практически только одну молочную кислоту (она составляет не менее 90% всех продуктов брожения). Катаболизм глюкозы происходит у них по фруктозобисфосфатному пути (бактерии обладают всеми необходимыми для этого ферментами, включая альдолазу), а водород, отщепляющийся при дегидрировании глицеральдегид-3-фосфата, передается на пируват:

Таблица 8.2. Молочнокислые бактерии, сгруппированные по форме клеток (кокки или палочки) и по типу брожения

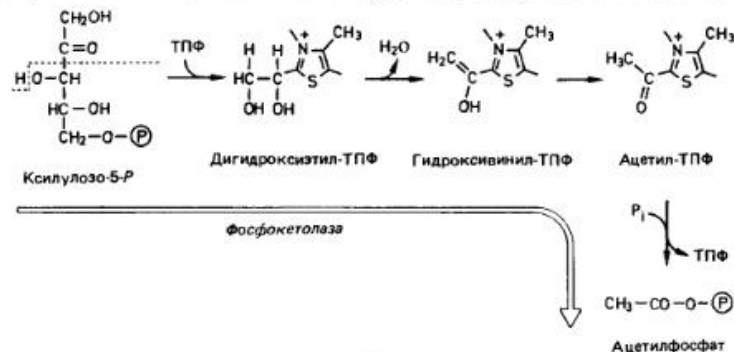
Кокки	Палочки
Гомоферментативное брожение: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow 2\text{CH}_3\text{—CH(OH)—COOH}$	
<i>Streptococcus lactis</i> <i>S. faecalis</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. cremoris</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. diacetilactis</i>	Термобактерии (температурный оптимум 40°C; при 15°C не растут) <i>L. lactis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. delbrückii</i>
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	Стрептобактерии (температурный оптимум 30–37°C; при 15°C растут) <i>Lactobacillus casei</i> <i>L. plantarum</i> <i>Sporolactobacillus inulinus</i>
Гетероферментативное брожение: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{CH}_3\text{—CH(OH)—COOH} + \text{CH}_3\text{—CH}_2\text{OH} + \text{CO}_2$ (или $\text{CH}_3\text{—COOH}$)	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (= <i>Betacoccus</i>) <i>L. cremoris</i>	Бетабактерии <i>Lactobacillus brevis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. viridescens</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>



От стереоспецифичности лактатдегидрогеназы (а) и от наличия лактатрацемазы зависит, какой продукт образуется—D(–), L(+)- или DL-молочная кислота. Лишь небольшая часть пирувата декарбоксилируется, превращаясь в уксусную кислоту, этанол и CO_2 , а также в ацетон. Количество образующихся побочных продуктов зависит, по-видимому, от доступа кислорода.

Гетероферментативное молочнокислое брожение. У гетероферментативных молочнокислых бактерий нет главных ферментов фруктозобисфосфатного пути—альдолазы и триозофосфат-изомеразы. Начальное превращение глюкозы идет у них исключительно по пентозофосфатному пути, т.е. через глюкозо-6-фосфат, 6-фосфоглюконат и рибулозо-5-фосфат (см. рис. 7.4 и 8.2). Рибулозо-5-фосфат под действием эпимеразы превращается в ксилулозо-5-фосфат, который в результате тиаминпирофосфат-зависимой реакции, катализируемой пентозофосфокетолазой,

расщепляется с образованием глицеральдегидфосфата и ацетилфосфата:

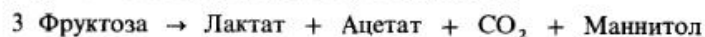


Нерастущие, отмытые клетки *Leuconostoc mesenteroides* сбраживают глюкозу почти стехиометрически согласно уравнению

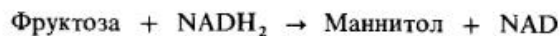


в лактат, этанол и двуокись углерода. Таким образом, у этих бактерий ацетилфосфат восстанавливается через ацетил-СoА и ацетальдегид в этанол (рис. 8.2). Другие гетероферментативные молочнокислые бактерии переводят ацетилфосфат частично или целиком в уксусную кислоту, что сопровождается переносом высокоэнергетической фосфатной связи на ADP с образованием АТФ. Избыток водорода передается в этом случае глюкозе, из которой образуется маннитол. Глицеральдегидфосфат через пируват превращается в лактат. Рибозу *Leuconostoc mesenteroides* сбраживает в лактат и ацетат.

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



Фруктоза при этом служит акцептором избыточных восстановительных эквивалентов:



Lactobacillus plantarum (= *pentosus* или *arabinosus*) сбраживает глюкозу по гомоферментативному пути, а пентозы расщепляет с помощью фосфокетолазы, превращая в лактат и ацетат. Следует отметить, что даже такая типичная гомоферментативная бактерия, как *Lactobacillus casei*, хотя и сбраживает глюкозу по гомоферментативному пути, но рибозу превращает в ацетат и лактат гетероферментативным путем. Рибоза индуцирует у нее синтез фосфокетолазы. Если клетки, выросшие на среде с рибозой, отмыть, то после этого они и глюкозу будут сбраживать как гетероферментативные бактерии.

Брожение, осуществляемое *Bifidobacterium bifidum*. Гетероферментативная молочнокислая бактерия *B. bifidum* получила это название за

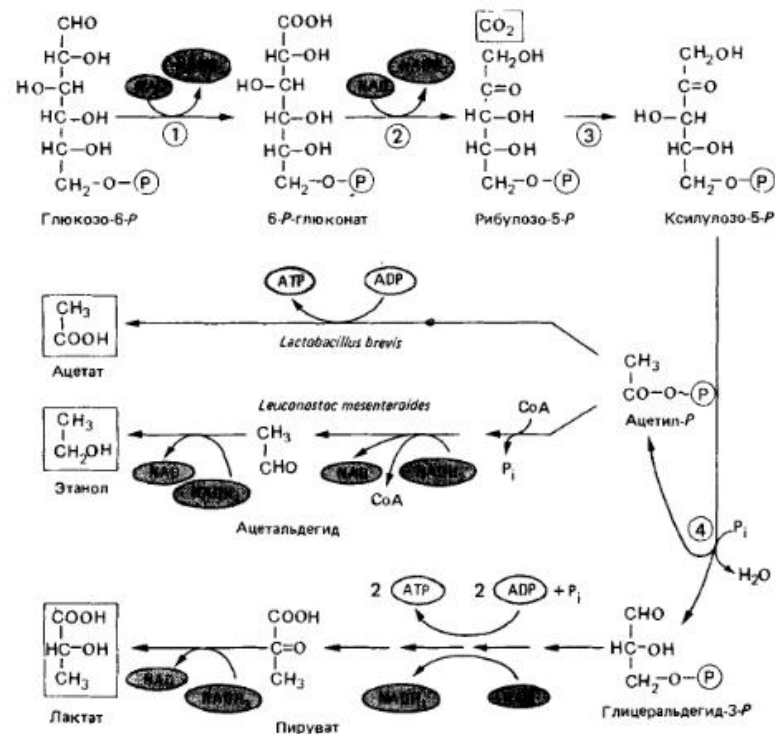


Рис. 8.2. Гетероферментативное молочнокислое брожение, осуществляемое *Lactobacillus brevis* и *Leuconostoc mesenteroides*. Участвующие ферменты (цифры в кружках): 1 – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 2 – фосфоглюконатдегидрогеназа; 3 – эписмераза; 4 – фосфокетолаза. Ацетилфосфат либо расщепляется под действием ацетаткиназы с фосфорилированием ADP (*L. brevis*), либо восстанавливается до этанола (*L. mesenteroides*). Окисление глицеральдегидфосфата происходит обычным путем (см. разд. 7.2.1 о фруктозобисфосфатном пути). ФК – фосфокетолаза; ТА – трансальдолаза; ТК – транскетолаза; Ац ~ Р – ацетилфосфат; ГА-3-Р – глицеральдегид-3-фосфат.

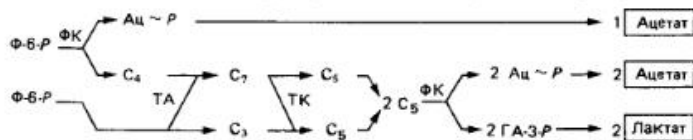
свою V- или Y-образную форму (лат. *bifidus* – раздвоенный)¹. Она известна тем, что преобладает в кишечнике грудных детей, особенно детей, вскармливаемых грудью. Эту зависимость ее распространения от способа кормления грудного ребенка можно было связать с потребностью бактерии в углеводах, содержащих N-ацетилглюкозамин, которые имеются только в молоке человека, но не коровы. Все представители рода *Bifidobacterium* – строгие анаэробы; они не переносят присутствия кислорода, и для их роста нужна атмосфера, содержащая 10% CO_2 . С тех пор как стали известны эти необычные для молочнокислых

¹ Род *Bifidobacterium* сейчас относят к актиномицетам, а не к семейству Lactobacillaceae. – Прим. ред.

бактерий особенности, бифидобактерии были обнаружены и в кишечной флоре взрослых людей, и во многих других местах, даже в гниющем иле, и теперь различают много видов этого рода. Бифидобактерии расщепляют глюкозу согласно уравнению



т.е. сбраживают ее по фосфокетолазному побочному пути. Они не имеют ни альдолазы, ни глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, но содержат активные фосфокетолазы, расщепляющие фруктозо-6-фосфат и ксилулозо-5-фосфат на ацетилфосфат и эритрозо-4-фосфат или глицеральдегид-3-фосфат. Гексозы претерпевают следующие превращения:



Применение молочнокислых бактерий в домашнем хозяйстве, сельском хозяйстве и для приготовления пищевых продуктов. Если нестерильный раствор, содержащий наряду с сахарами также сложные источники азота и факторы роста, оставить без доступа воздуха или просто налить в сосуд достаточно большое количество такого раствора, то вскоре в нем появятся молочнокислые бактерии. Они снижают рН до значений < 5 и тем самым подавляют рост других анаэробных бактерий, которые не могут развиваться в столь кислой среде. Какие именно молочнокислые бактерии вырастут в таких накопительных культурах, зависит от прочих условий. Благодаря своему стерилизующему и консервирующему действию, основанному на подкислении среды, молочнокислые бактерии используются в сельском и домашнем хозяйстве и в молочной промышленности.

Приготовление силоса. Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при запасании впрок кормов для скота. Для приготовления силоса используют листья сахарной свеклы, кукурузу, картофель, травы и люцерну. Растительную массу прессуют и прибавляют к ней мелассу, чтобы повысить отношение C/N, и муравьиную или какую-либо неорганическую кислоту, чтобы заранее обеспечить преимущественный рост лактобацилл и стрептококков. В таких условиях происходит контролируемое молочнокислое брожение.

Приготовление кислой капусты. Кислая капуста тоже представляет собой продукт, в приготовлении которого участвуют молочнокислые бактерии. В мелко нарезанной, посыпанной солью (2–3%) и спрессованной белокочанной капусте при исключении доступа воздуха начинается спонтанное молочнокислое брожение, в котором принимает участие сначала *Leuconostoc* (с образованием CO₂), а позднее *Lactobacillus plantarum*.

Молочные продукты. Молочнокислые бактерии, образующие кислоту

и придающие продуктам определенный вкус, находят широкое применение в молочной промышленности. Стерилизованное или пастеризованное молоко или же сливки сбраживают, прибавляя в качестве закваски чистые («стартовые») культуры молочнокислых бактерий. Кисломолочное масло готовят из сливок, сквашенных с помощью *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* и *Leuconostoc cremoris*. Образующийся в процессе брожения диацетил (см. стр. 289) придает маслу специфический аромат.

Закваски, содержащие *Streptococcus lactis* или *Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, вызывают свертывание казеина при приготовлении творога и немецких сыров (гарцского и майнцского). При изготовлении твердых сыров (в отличие от сыров из кислого молока) для свертывания казеина пользуются сычужным ферментом. Молочнокислые бактерии (*Lactobacillus casei*, *Streptococcus lactis*) вместе с пропионовокислыми участвуют лишь на стадии созревания сыров.

Для приготовления молочнокислых продуктов (табл. 8.3) в качестве заквасок тоже используются стартовые культуры молочнокислых бактерий, образующих кислоту и некоторые вещества, придающие продукту характерный запах. Ароматное пахтање получают с помощью упомянутых выше заквасок, применяемых для приготовления кисломолочного масла. Пахтање наряду с молочной кислотой содержит также уксусную кислоту, ацетон и диацетил. Йогурт получают из пастеризованного гомогенизированного цельного молока, инокулированного *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus bulgaricus* (после внесения закваски молоко выдерживают 2–3 ч при 43–45°C). Под названием биоурт в продажу поступает кислое молоко, сквашенное *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus*. Кефир принадлежит к молочнокислым продуктам, содержащим кислоты и этанол; его получают из молока (коровьего, овечьего или козьего). Закваску готовят на так называемых кефирных зернах, которые состоят из пока еще не полностью изученного сообщества организмов, включающего лактобациллы, стрептококки, микрококки и дрожжи. Сквашивание молока ведут при 15–22°C в тече-

Таблица 8.3. Выпускаемые в продажу молочнокислые продукты и соответствующие микробные закваски

Молочный продукт	Культуры, входящие в состав закваски	Температура и продолжительность инкубации
Сметана и пахтање	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> или <i>S. diacetylactis</i>	22°C, 18 ч
Йогурт	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	43–45°C, 2,5–3 ч
Биоурт	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	37–40°C, 24 ч
Кефир и кумыс	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , дрожжи	15–22°C, 24–36 ч
Творог	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i>	22°C, 18 ч или 35°C, 5 ч

ние 24–36 ч. Для приготовления кумыса используют ослиное молоко¹, которое инокулируют культурой, содержащей *Lactobacillus bulgaricus* и дрожжи рода *Torula*.

Чистую молочную кислоту, которая используется для различных промышленных целей и как добавка к пищевым продуктам, получают в результате брожения. Молоко или сыворотку сбраживают при помощи *Lactobacillus casei* или *L. bulgaricus*. Для сбраживания глюкозы и мальтозы применяют *L. delbrückii*, *L. leichmannii* или *Sporolactobacillus inulinus*. Источником необходимых факторов роста служат меласса и солод.

Образование кислоты в **кислом тесте**, используемой для его подъема, тоже обеспечивается молочнокислыми бактериями, в частности *Lactobacillus plantarum* и *L. coryneformis*. Стартовые культуры лактобацилл и микрококков применяются также для приготовления **сырокопченых колбас** (салями, сервелат). Образуя молочную кислоту и снижая pH, молочнокислые бактерии предохраняют от порчи те виды колбас, которые не подвергаются варке.

8.3 Пропионовокислородное брожение и пропионовокислые бактерии

Распространение, методы выделения и систематика. Пропионовокислые бактерии обитают в рубце и кишечнике жвачных животных (коров, овец); они участвуют там в образовании жирных кислот, главным образом пропионовой и уксусной. Благодаря им образующаяся в рубце в результате различных видов брожения молочная кислота превращается главным образом в пропионовую. Пропионовокислые бактерии не встречаются в молоке, и их не удается выделить из почвы или природных вод. Для получения накопительной культуры этих бактерий питательную среду с лактатом и дрожжевым экстрактом инокулируют швейцарским сыром и инкубируют в анаэробных условиях. В швейцарский сыр, в созревании которого пропионовокислые бактерии играют важную роль (определяя также его вкус), они попадают с сычужным ферментом, применяемым в процессе приготовления сыра для свертывания молока. Сычужный фермент добавляют в виде водного экстракта из телячьих желудков, содержащего множество жизнеспособных пропионовокислых бактерий. Различают несколько видов таких бактерий, из которых наиболее известны вид *Propionibacterium freudenreichii* и его подвид *shermanii*, а также *P. acidi-propionici* (прежнее название — *P. pentosaceum*). Возбудитель угрей-воспаления волосяных фолликулов у человека — тоже относится к пропионовокислым бактериям (*P. acnes*). Помимо рода *Propionibacterium* к бактериям, образующим пропионовую кислоту, причисляют *Veillonella alcalescens* (= *Micrococcus lactilyticus*),

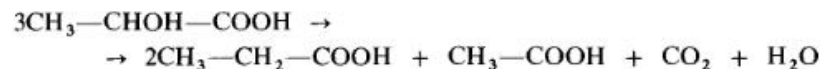
¹ Обычно кумыс готовят из кобыльего молока (реже из верблюжьего).— Прим. ред.

Clostridium propionicum, *Selenomonas* и *Micromonospora*. Пропионат как продукт брожения выделяют и многие другие бактерии.

Рост и метаболизм представителей рода *Propionibacterium*. Этот род относят к коринеформным бактериям (разд. 3.6); он включает грам-положительные неподвижные палочки, не образующие спор. При неблагоприятных условиях роста часто появляются булавовидные формы. Пропионовокислые бактерии на твердых средах при доступе воздуха не растут. Так как они не переносят присутствия атмосферного O₂, способны расти в анаэробных условиях и регенерировать АТФ за счет энергии брожения, их считали организмами, облигатно осуществляющими брожение. С другой стороны, давно известно, что они обладают гемсодержащими ферментами, такими как цитохромы и каталаза. Действительно, исследованные представители рода *Propionibacterium* оказались способными расти как в анаэробных, так и в аэробных условиях. При достаточно слабой контролируемой аэрации урожай их клеток во много раз больше, чем в строго анаэробных условиях. В случае аэробного роста, правда, скорость диффузии кислорода из газовой фазы в бактериальную взвесь не должна превышать его потребления в процессе дыхания: кислород при измеримых парциальных давлениях оказывает токсическое действие. Виды *Propionibacterium*, таким образом, следует относить к микроаэротолерантным формам. В анаэробных условиях представители этого рода сбраживают глюкозу, сахарозу, лактозу и пентозы, а также лактат, малат, глицерол и другие субстраты с образованием пропионовой кислоты. Расщепление гексоз идет по фруктозобисфосфатному пути.

Исследуя сбраживание глицерола клетками *Propionibacterium acidi-propionici*, Вуд и Веркман (1936) нашли, что при этом происходит фиксация CO₂, поддающаяся количественному определению. Связанный углерод можно было обнаружить в выделяемом сукцинате, что указывало на карбоксилирование пирувата с образованием дикарбоновых кислот. Такое карбоксилирование получило название реакции Вуда—Веркмана. Эта реакция свойственна не только пропионовокислым бактериям — она широко распространена у животных, растений и различных гетеротрофных микроорганизмов. Соответствующие биохимические превращения описаны в разделе 7.5 — там, где речь идет о глюконеогенезе.

Образование пропионовой кислоты (метилмалонил-СоА-путь). Пропионовая кислота образуется из молочной согласно следующему уравнению:



Восстановление лактата или пирувата до пропионата идет по пути, который по характерному промежуточному продукту был назван метилмалонил-СоА-путем (рис. 8.3). Сначала пируват при участии комплекса биотин-СО₂ карбоксилируется метилмалонил-СоА-карбокси-

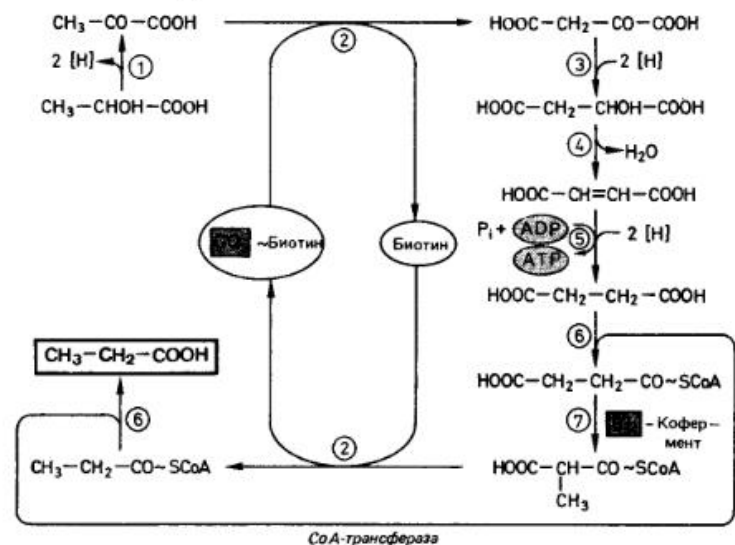
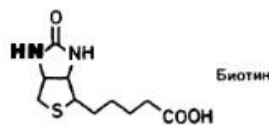


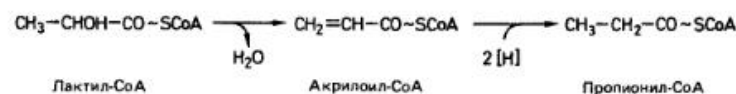
Рис. 8.3. Метилмалонил-СоА-путь образования пропионата. Участвующие ферменты: 1 – лактатдегидрогеназа; 2 – метилмалонил-СоА-карбокситрансфераза; 3 – малатдегидрогеназа; 4 – фумараза; 5 – фумаратредуктаза (участвует в регенерации АТФ в результате перемещения протонов); 6 – СоА-трансфераза; 7 – метилмалонил-СоА-мутаза.

трансферазой с образованием оксалоацетата, а затем восстанавливается через малат и фумарат до сукцината. Транспорт электронов на этом этапе сопряжен с фосфорилированием (фумаратное дыхание; см. разд. 9.6). Затем сукцинат с помощью СоА-трансферазы (сукцинил-СоА: пропионат-СоА-трансферазы) присоединяется к СоА и таким образом активируется. Сукцинил-СоА под действием метилмалонил-СоА-мутазы и при участии кофермента B_{12} (цианкобаламина) превращается в метилмалонил-СоА, и только от этого промежуточного продукта, наконец, отщепляется CO_2 ; в результате образуется пропионил-СоА, а CO_2 связывается с упомянутой выше метилмалонил-СоА-карбокситрансферазой. Из пропионил-СоА образуется пропионат, в результате того что СоА-трансфераза переносит СоА на сукцинат. Следует особо отметить, что в процессе образования пропионата две группы (CO_2 и СоА) переносятся с последнего продукта на предшествующий, не освобождаясь. Заслуживает внимания и участие трех кофакторов (биотина, СоА и кофермента B_{12}) в этом процессе. По метилмалонил-СоА-пути пропионат образуется у большинства пропионовокислых бактерий, а также у *Veillonella alcalescens* и *Selenomonas ruminantium*.



Реакции метилмалонил-СоА-пути могут протекать и в обратном направлении, как, например, при расщеплении валина, изолейцина и жирных кислот с длинной цепью и нечетным числом углеродных атомов. Из жирных кислот и изолейцина образуется пропионил-СоА, который карбоксилируется с образованием метилмалонил-СоА. Для превращения последнего в сукцинил-СоА при участии метилмалонил-СоА-мутазы необходим витамин B_{12} (кофермент B_{12}); это относится и к корневым клубенькам бобовых, и к клеткам *Rhizobium*, и к животным клеткам.

Акрилоил-СоА-путь. Образование пропионовой кислоты у *Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola* и *Megasphaera elsdenii* происходит более простым путем. Промежуточным продуктом здесь является СоА-производное акриловой кислоты – акрилоил-СоА:



8.4 Муравьинокислое брожение и семейство Enterobacteriaceae

Некоторые микроорганизмы, образующие при брожении кислоты, объединяют в одну физиологическую группу на том основании, что характерным, хотя и не главным продуктом брожения является у них муравьиная кислота. Наряду с муравьиной кислотой такие бактерии выделяют и некоторые другие кислоты; такой тип метаболизма называют поэтому муравьинокислым брожением или брожением смешанного типа. Так как некоторые типичные представители этой группы обитают в кишечнике, все семейство носит название Enterobacteriaceae. Это грам-отрицательные, активно подвижные, не образующие спор палочки с перитрихальным жгутикованием. Будучи факультативными аэробами, они обладают гемопротейнами (цитохромами и каталазой) и способны получать энергию как в процессе дыхания (в аэробных условиях), так и в процессе брожения (в анаэробных условиях). В отношении питания эти бактерии исключительно нетребовательны – растут на простых синтетических средах, содержащих минеральные соли, углеводы и аммоний. Сбраживание глюкозы у всех представителей этой группы происходит с образованием кислот. Значение Enterobacteriaceae для эпидемиологии, а также для разного рода экспериментальных исследований общеизвестно; поэтому полезно будет рассмотреть здесь некоторых представителей этого семейства.

Наиболее важные виды. *Escherichia coli* – обитатель кишечника, в количественном отношении, однако, не главный (в кишечной флоре преобладают *Bacteroides* и *Bifidobacterium*). Эта бактерия может некоторое время сохранять жизнеспособность и вне кишечника, и ее легко выя-

Таблица 8.4. Признаки родов, относящихся к Enterobacteriaceae

Род	Знак «плюс» означает, что большинство штаммов по данному признаку положительно							
	Подвижность	Сбраживание глюкозы	Сбраживание лактозы	Образование H ₂	Образование индола	Образование ацетона	Протеолиз	Использование мочевины
<i>Escherichia</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>Enterobacter</i>	+	+	+	+	-	+	(+)	(+)
<i>Serratia</i>	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>Proteus</i>	+	+	-	+	+	-	+	+
<i>Citrobacter</i>	+	+	+	(+)	+	-	-	(+)
<i>Salmonella</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>Erwinia</i>	+	+	(+)	-	-	(+)	(+)	-

вить. Этим пользуются для того, чтобы обнаружить загрязнение питьевой воды фекалиями.

Proteus vulgaris тоже принадлежит к нормальной кишечной флоре, но, кроме того, широко распространен в почве и воде. Эта бактерия известна своей склонностью к изменению формы (отсюда ее название) и большой подвижностью, а также способностью образовывать на поверхности агара сплошную пленку (разд. 2.2.5).

Enterobacter aerogenes можно в известном смысле считать «близнецом» *E. coli* (оба вида относят к «группе кишечной палочки»). Эта бактерия широко распространена в почве; как показывает ее видовое название, она образует много газообразных продуктов. От *E. coli* она отличается лишь немногими биохимическими признаками (см. табл. 8.4 и 8.5).

Serratia marcescens (прежнее название — *Bacterium prodigiosum*, или чудесная палочка) может рассматриваться как вариант *Enterobacter*, отличающийся образованием пигмента.

К роду *Erwinia* относятся некоторые фитопатогенные виды, поражающие стебли, листья и корни. В результате выделения пектиназы они вызывают мягкие гнили.

Klebsiella pneumoniae отличается от *Enterobacter* только более толстой слизистой капсулой и неподвижностью. Ее находят при некоторых тяжелых формах пневмонии.

Salmonella typhimurium — самая распространенная из бактерий, вызывающих гастроэнтерит, или так называемую «пищевую токсикоинфекцию»; в основе симптомов лежит раздражение слизистой желудочно-кишечного тракта выделяемыми липополисахаридными токсинами бактерии. В кровяное русло возбудитель не проникает. *S. typhi* является

возбудителем эпидемического брюшного тифа, а *Shigella dysenteriae* и родственные штаммы — возбудителями дизентерии.

Vibrio cholerae — возбудитель холеры, эпидемической болезни. Он не относится к группе Enterobacteriaceae, но близок к ней по типу метаболизма. Холерный вибрион размножается в кишечнике. Он прикрепляется к кишечному эпителию, но не проникает в клетки. Холерный энтеротоксин — белок, связываемый клетками кишечного эпителия (специфическими рецепторами). Он вызывает переход воды и ионов натрия, бикарбоната и хлорида в просвет кишечника.

Yersinia pestis — возбудитель чумы. Род *Yersinia* не относится к таксономической группе Enterobacteriaceae, но близок к ней по своему факультативно-анаэробному образу жизни и по типу брожения. Природным резервуаром этого возбудителя эпидемий служат дикие грызуны, главным образом крысы. Бактерии передаются человеку инфицированными блохами и другими эктопаразитами; в результате развивается бубонная или легочная чума. Быстрое размножение бактерий в организме и интенсивная выработка ими токсина могут приводить к скорой смерти.

Анализ питьевой воды. Основная цель анализа питьевой воды — обнаружение *Escherichia coli*. Этот анализ — простой пример бактериологической дифференциальной диагностики, поэтому на нем стоит остановиться подробнее. *E. coli* — обычный и совершенно безвредный обитатель кишечника человека, и его присутствие в питьевой воде само по себе неопасно. Однако в кишечнике может находиться и ряд патогенных бактерий. Вместе с *E. coli* эти бактерии выделяются с калом больных, реконвалесцентов и бациллоносителей, так что и они могут попадать в питьевую воду. Чтобы не применять специальных методов для выявления каждой из таких патогенных бактерий, пользуются общим индикатором загрязнения. Таким индикатором и служит постоянный обитатель кишечника *E. coli*. Обнаружение этого вида в пробе воды показывает, что вода загрязнена содержанием кишечника и кишечными бактериями, среди которых могут быть и патогенные формы. В таком случае требуется принять соответствующие меры. Нормой для питьевой воды считается, когда общее число бактериальных клеток в 1 мл не превышает 100; при этом в 100 мл воды не должно быть ни одной клетки *E. coli*.

E. coli хорошо растет на средах, содержащих глюкозу или лактозу и пептон. Для того чтобы создать условия, при которых рост других бактерий сводился бы к минимуму, пользуются лактозой. На средах с лактозой могут расти только те бактерии, которые способны ее расщеплять с помощью β-галактозидазы. Этот фермент синтезируют бактерии группы кишечной палочки и молочнокислые бактерии, тогда как многие почвенные и водные бактерии его лишены.

Первые указания на присутствие газообразующих бактерий дает появление газа во время инкубации пробы в растворе с лактозой и пептоном в бродильных трубках Эйхорна. Если в одну трубку высеять *Escherichia coli*, а в другую — *Enterobacter aerogenes*, то уже после 24-часовой инкубации при 37°C станет заметной разница в выделении газообразных продуктов. *E. aerogenes* оправдывает свое название и образует примерно вдвое больше газа, чем *E. coli*. Различен и состав выделяющегося газа: *E. coli* выделяет H₂ и CO₂ примерно в соотношении 1:1, тогда как *Enterobacter aerogenes* образует больше CO₂, чем водорода.

Таблица 8.5. Реакции для дифференциации *Escherichia coli* и *Enterobacter aerogenes*

	Образование индола	Проба с метиловым красным	Образование ацетона	Цитрат
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	+	+

Некоторые молочнокислые бактерии тоже обладают способностью расщеплять лактозу с образованием газа, так что их присутствие может исказить результаты анализа. Это делает необходимым применение дальнейших методов дифференциации. Если такую культуру высеять на агар с эозин и метиловым синим (лактоза-пентон-эозин-метиловый синий), то появляются колонии *E. coli*, окрашенные в темно-синий цвет с металлическим отливом (результат отражения света); *Enterobacter* же образует розовые слизистые колонии без металлического блеска.

Для более точной дифференциации этих двух микроорганизмов требуется полный анализ брожения. Это, конечно, самый точный, но и самый трудоемкий способ. В повседневной практике для заключительной дифференциации используют метод, основанный на качественных различиях между двумя рассматриваемыми видами бактерий (табл. 8.5). Учитываются следующие показатели: 1) образование индола из триптофана; 2) количество кислоты, образуемой из сахара (проба с метиловым красным); 3) образование ацетона при сбраживании глюкозы (реакция Фогес-Проскауэра) и 4) рост на среде с цитратом в качестве источника углерода.

1. **Образование индола.** Индол, образуемый из триптофана, выявляется с помощью реактива Эрлиха (*n*-диметиламинобензальдегида) по вишнево-красному окрашиванию.
2. **Проба с метиловым красным.** Образование кислоты приводит к изменению цвета pH-индикатора (метилового красного): красный < pH 4,5 < желтый.
3. **Образование ацетона (реакция Фогес-Проскауэра).** Ацетон, образовавшийся в питательной среде с глюкозой и пептоном, в сочетании с креатином, содержащимся в пептоне, вызывает после прибавления сильной щелочи (1 мл 10%-ного КОН на 5 мл питательного раствора) появление красной окраски. Чувствительность метода повышается при добавлении креатина и α -нафтола.
4. **Использование цитрата.** В синтетическом питательном растворе с цитратом использование последнего можно обнаружить по помутнению и подщелачиванию (выявляется с помощью бромтимолового синего).

Продукты брожения и метаболические пути. При брожениях, вызываемых факультативными анаэробами, в том числе представителями Enterobacteriaceae, многими видами *Bacillus* и другими бактериями, образуется большое число различных соединений, среди которых преобладают органические кислоты. Важнейшими продуктами брожения являются уксусная, муравьиная, янтарная и молочная кислоты, этанол, глицерол, ацетон, 2,3-бутандиол, CO₂ и молекулярный водород. Гексозы расщепляются в основном по фруктозобисфосфатному пути и только в незначительной части — по пентозофосфатному. Разложение

Таблица 8.6. Продукты сбраживания глюкозы бактериями *Escherichia coli* и *Enterobacter aerogenes*. (Thimann K. V., The Life of Bacteria. Macmillan, New York, 1955)

Продукт	Химическая формула	Число молей на 100 молей глюкозы	
		<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
2,3-Бутандиол	CH ₃ -CH(OH)-CH(OH)-CH ₃	0	66,5
Этанол	CH ₃ -CH ₂ OH	42	70
Янтарная кислота	COOH-CH ₂ -CH ₂ -COOH	29	0
Молочная кислота	CH ₃ CH(OH)-COOH	84	3
Уксусная кислота	CH ₃ -COOH	44	0,5
Муравьиная кислота	HCOOH	2	18
Водород	H ₂	43	36
Двуокись углерода	CO ₂	44	172

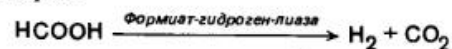
глюконата идет по 2-кето-3-дезоксиглюконолатному пути.

В зависимости от того, какие продукты брожения выделяются в анаэробных условиях, различают два типа процессов: а) при брожении, характерном для *Escherichia coli*, образуются главным образом кислоты и совсем не образуется бутандиол; б) при брожении, характерном для *Enterobacter*, основным продуктом является бутандиол, кислоты же занимают второе место. В табл. 8.6 приведены результаты типичного анализа продуктов брожения. Два указанных типа брожения различаются главным образом по реакциям, связанным с превращениями пирувата.

Особенности брожения, осуществляемого *Escherichia coli*. Для этой бактерии характерны следующие особенности брожения; 1) расщепление пирувата с образованием ацетил-CoA и формиата; 2) разложение формиата на CO₂ и молекулярный водород; 3) восстановление ацетил-CoA до этанола; 4) отсутствие способности образовывать из пирувата ацетон и 2,3-бутандиол.

Превращение пирувата в ацетил-CoA и формиат происходит только в анаэробных условиях; его катализирует пируват:формиат-лиаза (см. разд. 7.2.4). Этот фермент чрезвычайно чувствителен к кислороду, удерживается флавоксином в восстановленном состоянии и для своей активации нуждается в S-аденозил-L-метионине.

Муравьиную кислоту большинство штаммов *E. coli* и другие газообразующие виды энтеробактерий расщепляют на CO₂ и молекулярный водород:



Эту реакцию катализирует ферментная система, называемая формиат-водород-лиазой. Речь идет, вероятнее всего, о комбинированном дей-

ствии форматдегидрогеназы ($\text{HCOOH} + \text{X} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{XH}_2$) и гидрогеназы ($\text{XH}_2 \rightarrow \text{X} + \text{H}_2$). У *E. coli* газообразные продукты H_2 и CO_2 образуются почти в равных количествах. Такое стехиометрическое отношение (1:1) согласуется с образованием обоих газов в результате расщепления формиата. Однако при изменении pH это отношение меняется.

Этанол, образуемый энтеробактериями, является продуктом восстановления ацетил-СоА. У этих бактерий нет пируватдекарбоксилазы, декарбоксилирующей пируват с образованием ацетальдегида. Часть образующегося ацетил-СоА выделяется в виде ацетата; высокоэнергетическая связь может при этом сохраняться благодаря реакциям, осуществляемым фосфотрансацетилазой и ацетаткиназой.

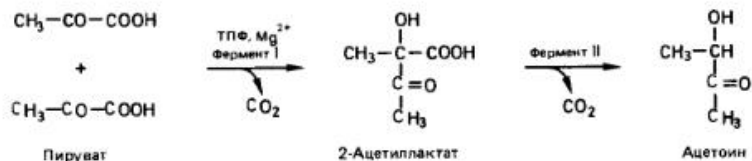
Лактат получается в результате восстановления пирувата.

Сукцинат является продуктом «фумаратного дыхания», при котором происходит фосфорилирование, сопряженное с транспортом электронов (разд. 9.6). Сначала в результате карбоксилирования фосфоенолпирувата образуется оксалоацетат, который затем через малат превращается в фумарат. Фумарат при участии мембраносвязанной фумаратредуктазы восстанавливается до сукцината, который выделяется в окружающую среду. Выделение значительных количеств сукцината (табл. 8.6), синтез которого включает фиксацию CO_2 , позволяет объяснить то, что *Escherichia coli* может покрывать за счет CO_2 до 20% своей потребности в угледе.

Особенности брожения, осуществляемого *Enterobacter aerogenes*. Эта бактерия в анаэробных условиях тоже образует целый ряд кислот; в количественном отношении они, однако, существенно уступают ацетону и 2,3-бутандиолу. Ацетон образуется из двух молекул пирувата. Процесс включает двукратное декарбоксилирование. Образование нейтрального продукта брожения – бутандиола – в известной мере конкурирует за промежуточный продукт – пируват, подавляя тем самым синтез кислот.

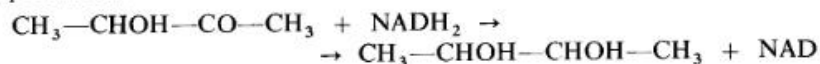
С другой стороны, образование бутандиола связано с дополнительным освобождением CO_2 . Количество дополнительно образуемой двуокиси углерода находится в стехиометрическом соотношении с количеством бутандиола. Из табл. 8.6 видно, что некоторая часть CO_2 образуется при расщеплении формиата, однако основное ее количество выделяется в процессе образования бутандиола. Своим названием *Enterobacter aerogenes* обязан, как уже говорилось, очень интенсивному выделению газообразных продуктов. Соответствующие отличия от брожения, осуществляемого *Escherichia coli*, составляют основу для применения пробы с метиловым красным и проведения реакции Фогес–Проскауэра на ацетон.

Образование ацетона у *Enterobacter* идет через 2-ацетиллактат. Активный ацетальдегид (гидроксиэтилтиаминпирофосфат; см. рис. 7.6) участвует в реакции с пируватом, катализируемой *ацетиллактатсинтазой* (ферментом I), в результате чего образуется 2-ацетиллактат:



Второй фермент (II) – 2-ацетиллактатдекарбоксилаза – отщепляет CO_2 . Продуктом этой стереоспецифической реакции является ацетон (ацетилметилкарбинол).

2,3-Бутандиол образуется при восстановлении ацетона *бутандиолдегидрогеназой*:



У *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *B. polymyxa*, *Serratia*, *Aeromonas hydrophila* и некоторых других бактерий образование бутандиола идет через 2-ацетиллактат. Брожение с выходом бутандиола находит применение в промышленности.

При окислении ацетона кислородом воздуха легко образуется сходное с ацетоином соединение **диацетил**. Его выделяют и различные молочнокислые бактерии (*Leuconostoc cremoris*, *Lactobacillus plantarum*), добавляемые к молоку специально для этой цели в процессе приготовления молочнокислых продуктов (масла, йогурта). Диацетил придает продукту запах масла. У названных бактерий он синтезируется не через 2-ацетиллактат, а из гидроксипропил-тиаминпирофосфата и ацетил-СоА.

8.4.1 Светящиеся бактерии и биолюминесценция

Светящиеся бактерии – в основном морские организмы. Это хемоорганотрофные бактерии, по своим морфологическим и физиологическим признакам сходные с *Enterobacteriaceae*; поэтому их называют также «морскими энтеробактериями».

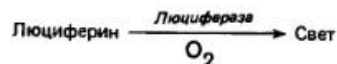
Светящиеся бактерии легко выделить из морской и солоноватой воды. На мясе и рыбе они образуют естественные накопительные культуры, особенно при низких температурах. Если морскую рыбу в неглубокой посуде наполовину залить соленой водой и оставить на несколько дней в холодильнике (при 4–6°C), то на поверхности рыбы появятся колонии светящихся бактерий, которые можно выделить и получить в чистой культуре. Как правило, они не вызывают гниения и не образуют токсичных веществ, но выделяют амины. Р. Бойль (1667) писал: «Иной кусок мяса вчера еще светился, а сегодня из него уже приготовлено питательное и вкусное блюдо».

Светящиеся бактерии. Все выделенные до сих пор светящиеся бактерии – грам-отрицательные факультативные анаэробы, передвигающиеся с помощью 1–8 жгутиков. В зависимости от морфологии жгутиков (по-

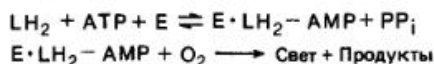
лярное или перитрихальное расположение, простые жгутики или жгутики в чехле) их относят к родам *Photobacterium* или *Beneckea*. В анаэробных условиях большинство светящихся бактерий осуществляет муравьинокислое брожение или брожение смешанного типа, как это свойственно Enterobacteriaceae, и образует муравьиную, уксусную, молочную и янтарную кислоты, спирт, CO₂ и ацетон. Как и многие другие морские бактерии, они являются галофилами; если поместить их в гипотоничную среду (дистиллированную воду), они мгновенно лизируются.

Рост и биолюминесценция в сильной степени зависят от состава среды. Свечение наблюдается только в присутствии кислорода, поэтому такие бактерии еще в конце прошлого века использовались как чувствительные индикаторы для выявления фотосинтетического образования кислорода у зеленых и красных водорослей в опытах со светом разной длины волны.

Процесс свечения. Свечение следует рассматривать как процесс аэробного окисления, своего рода побочный путь дыхания, приводящий не к образованию АТФ, а к возбуждению какого-то промежуточного продукта, испускающего при этом свет. Дюбуа первым в 1885 г. исследовал процесс свечения, используя водные экстракты из светящегося органа моллюска-точильщика *Pholas dactylus*; он выяснил, что в реакции участвует вещество, экстрагируемое горячей водой (люциферин), и фермент, экстрагируемый холодной водой (люцифераза):



В разных системах вещества, участвующие в биолюминесценции, различны. Лучше всего этот процесс изучен у *Photinus pyralis* – американского светлячка. Люциферин его люминесцентной системы оказался производным бензтиазола. Люцифераза (Е) катализирует реакцию восстановленного люциферина (LH₂) с АТФ; продукт этой реакции – аденилат – при окислении испускает свет:

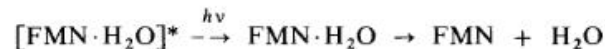


Между количеством вступившего в реакцию АТФ и интенсивностью свечения существует прямая зависимость. Поэтому «светлячковая реакция» стала излюбленным методом количественного определения АТФ.

В бактериальном свечении тоже участвует несколько компонентов: восстановленный FMN, O₂ и альдегид с длинной цепью (тетрадеканаль). Люцифераза представляет собой монооксигеназу (см. разд. 14.11.4). Уравнение реакции можно написать следующим образом:



Окисление FMNH₂, вероятно, приводит к возбуждению FMN, т.е. к образованию [FMN·H₂O], который испускает свет, возвращаясь в основное состояние:



Способность к свечению очень распространена у грибов (*Armillaria mellea*, *Panus stipticus* и др.), у простейших (динофлагеллят) и у различных многоклеточных животных. У каракатиц и некоторых глубоководных морских рыб за свечение ответственны симбиотические бактерии, находящиеся в светящихся органах. Значение биолюминесценции для таких животных понятно, однако биологическая роль ее у одноклеточных организмов пока не ясна.

8.5 Маслянокислое и ацетоно-бутиловое брожение; клостридии

Масляная кислота (бутират), *n*-бутанол, ацетон, 2-пропанол и ряд других органических кислот и спиртов являются типичными продуктами сбраживания углеводов анаэробными спорообразующими бактериями (клостридиями). Поэтому клостридии, а также некоторые специализированные виды, сбраживающие только этанол, аминокислоты или иные вещества, рассматриваются здесь в связи с маслянокислым брожением, которое они вызывают.

Признаки. Род *Clostridium* относится к семейству Bacillaceae. Как и другие представители этого семейства (*Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum* и *Sporosarcina*), клостридии грам-положительны. Благодаря перитрихально расположенным жгутикам они очень подвижны. Вегетативные клетки палочковидные, однако форма их может изменяться в зависимости от условий среды. Овальные или шарообразные эндоспоры изменяют форму палочковидной материнской клетки, так как их диаметр, как правило, больше толщины этой клетки. Споры терморезистентны.

Физиологически клостридии отличаются резко выраженным **бродильным** типом метаболизма, а также чувствительностью к кислороду: они растут только в **анаэробных** условиях. Однако существуют, по-видимому, все переходные формы – от строго анаэробных видов (*Clostridium pasteurianum*, *C. kluyveri*) до почти аэротолерантных (например, *C. histolyticum*, *C. acetobutylicum*). Клостридии, как правило, не содержат гемопroteинов (цитохромов, каталазы). Некоторые виды способны, однако, образовывать цитохромы, если в питательной среде содержатся их предшественники. Из запасных веществ широко распространены крахмалоподобные полисахариды.

Температурный оптимум для роста большинства известных видов *Clostridium* лежит между 30 и 40°C. Наряду с этими мезофильными представителями встречается много термофильных видов с оптимумом 60–75°C, таких как *C. thermoaceticum* и *C. thermohydrosulfuricum*. Подобно

другим представителям *Vacillaceae*, клостридии способны расти только при нейтральной (или щелочной) реакции среды. Поэтому их рост, часто нежелательный, может быть полностью подавлен при подкислении (например, в квашеной капусте, силосе, фруктовых консервах, сырых колбасах).

Субстраты. Клостридии весьма сильно различаются в отношении субстратов, которые они могут использовать и сбраживать. Некоторые виды мало разборчивы и используют широкий круг веществ, другие узко специализированы и способны сбраживать лишь один или несколько субстратов. В целом же клостридиям доступно множество различных природных соединений. Они способны разлагать полисахариды (крахмал, гликоген, целлюлозу, гемицеллюлозы, пектины), нуклеиновые кислоты, белки, аминокислоты, пурины и пиримидины. Одним клостридиям нужны сложные питательные среды или ростовые вещества, другие в них не нуждаются. Некоторые могут обходиться молекулярным азотом как единственным источником этого элемента; азот они связывают с большой скоростью (*Clostridium pasteurianum*)¹.

По способности использовать различные субстраты клостридии можно подразделить на ряд групп. **Сахаролитические** клостридии расщепляют преимущественно полисахариды или сахара. **Пептолитические** клостридии расщепляют белки, пептоны и аминокислоты. Группы в свою очередь объединяют на основе типов брожения и его продуктов (табл. 8.7 и 8.8).

Для получения накопительных культур видов *Clostridium* можно воспользоваться некоторыми их особенностями. Поскольку их споры терморезистентны, инокулят предварительно пастеризуют. Создавая строго анаэробные условия, заранее исключают рост всех аэробных бактерий. Так как некоторые бактерии, расщепляющие полисахариды, прикреплены к поверхности частиц, например к крахмальным зернам или к частицам целлюлозы в рубце жвачных или каких-то осадках, эти частицы можно сначала промыть, чтобы освободить их от других бактерий, а затем использовать как материал для инокуляции. Для поддержания способности к интенсивному брожению нужно и в последующей работе с выделенными штаммами всегда пользоваться пастеризованными инокулятами.

Биохимия брожения и его продукты. При брожении образуются в разных соотношениях кислоты (масляная, уксусная, молочная), спирты (бутанол, этанол, 2-пропанол), а также ацетон и газообразные продукты (H_2 и CO_2). Клостридии расщепляют глюкозу по фруктозобисфосфатному пути. Водород, освобождающийся при дегидрировании глицеральдегидфосфата, переносится, как правило, на органические кислоты или кетоны, образуемые из пирувата или ацетил-СоА. Прототипом броже-

Таблица 8.7. Клостридии, различающиеся по характеру брожения

Типы брожения и виды бактерий	Субстраты	Продукты брожения
I. Маслянокислое брожение		
<i>C. butyricum</i>	Глюкоза, крахмал, декстрин	Бутират, ацетат, CO_2 , H_2
<i>C. tyrobutyricum</i>	Глюкоза или лактат (глицерол) + ацетат	Бутират, ацетат, CO_2 , H_2
<i>C. pasteurianum</i>	Глюкоза, крахмал, маннитол, инулин	Бутират, ацетат, CO_2
<i>C. pectinovorum</i>	Пектин, крахмал, гликоген, декстрин	Бутират, ацетат
II. Образование бутанола		
<i>C. butylicum</i>	Глюкоза	Бутират, ацетат, бутанол, 2-пропанол, CO_2 , H_2
<i>C. acetobutylicum</i>	Глюкоза, глицерол, пируват	Бутират, ацетат, бутанол, ацетон, ацетонин, этанол, CO_2 , H_2
III. Образование пропионовой кислоты		
<i>C. propionicum</i>	Аланин, треонин	Ацетат, пропионат, CO_2
IV. Образование капроновой кислоты		
<i>C. kluyveri</i>	Этанол + ацетат + CO_2	Капронат, бутират, H_2
V. Осуществление реакции Стикленда		
<i>C. botulinum</i>	Белки, аминокислоты	Ацетат, лактат, NH_3 , H_2
<i>C. histolyticum</i>		
<i>C. sporogenes</i>		
<i>C. sticklandii</i>		
VI. Наличие особых метаболических путей		
<i>C. acetium</i>	$(CO_2 + H_2)$, фруктоза	Ацетат
<i>C. tetanomorphum</i>		
<i>C. acidi-urici</i>	Мочевая кислота, ксантин	Ацетат, формиат, CO_2 , NH_3

ния, осуществляемого клостридиями, можно считать сбраживание глюкозы *Clostridium butyricum* и *C. acetobutylicum*; при этом образуются бутират, ацетат, бутанол, этанол, ацетон, 2-пропанол, CO_2 и H_2 . Выход продуктов варьирует в зависимости от условий.

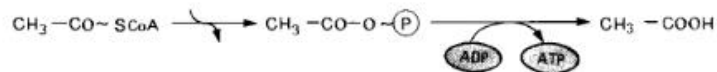
Масляная кислота (бутират) — продукт конденсации двух молекул ацетил-СоА при участии тиолазы с образованием ацетоацетил-СоА и его последующим восстановлением (рис. 8.4). Ацетоацетил-СоА восстанавливается за счет $NADH_2$ при участии β -гидроксибутирил-СоА-дегидро-

¹ В последние годы установлено, что некоторые виды *Clostridium* способны к автотрофному росту с использованием молекулярного водорода. Таковы *C. thermoautotrophicum*, *C. acetium* и *C. thermoaceticum* (см. разд. 9.5). — *Прим. ред.*

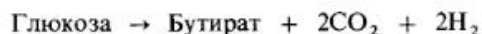
Таблица 8.8. Особые виды брожения

Вид бактерий	Субстраты	Продукты брожения
<i>Eubacterium limosum</i> (<i>Butyrivibrio rafterii</i>)	Глюкоза, лактат, пируват	Бутират, ацетат, CO ₂ , H ₂ ; лактат (при использовании глюкозы)
<i>Peptococcus anaerobius</i> (<i>Diplococcus glycinophilus</i>)	Глицин	Ацетат, CO ₂ , H ₂ , NH ₃
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Аминокислоты	Ацетат, лактат, этанол, CO ₂ , NH ₃
<i>Clostridium oroticum</i>	Оротовая кислота	Ацетат, сукцинат, CO ₂ , NH ₃

геназы до β-гидроксибутирил-СоА. От последнего с помощью крото-назы отщепляется вода. Крото-нил-СоА под действием флавинового фермента *бутирил-СоА-дегидрогеназы* восстанавливается до *бутирил-СоА*. От *бутирил-СоА* с помощью *СоА-трансферазы* СоА может переноситься на ацетат; при этом освобождается масляная кислота, которая выходит в среду. Из ацетил-СоА при участии *фосфотрансацетилазы* и *ацетаткиназы* может быть получен свободный ацетат, что сопровождается синтезом АТФ из АДФ (см. также стр. 264).



При чистом маслянокислом брожении образующийся при окислении пирувата водород выделяется в газообразном виде. Когда глюкоза сбраживается согласно уравнению



баланс водорода сходится; на один моль глюкозы образуются три моля АТФ.

Бутанол, бутират, ацетон и 2-пропанол образуются при сбраживании глюкозы клетками *Clostridium acetobutylicum*. При этом вначале выделяется также масляная кислота; однако по мере подкисления среды (рис. 8.5) начинают синтезироваться ферменты (в том числе ацетоацетатдекарбоксилаза), действие которых приводит к накоплению **ацетона** и **бутанола**. Процессы образования этих веществ тесно связаны между собой. В результате декарбоксилирования части ацетоацетата утрачивается потенциальный акцептор водорода, который при восстановлении в *бутират* мог бы дважды присоединить 2[H]. Этот водород так или иначе должен быть передан другим акцепторам, в том числе и только что образовавшемуся *бутирату*. Для восстановления до *бутанола* *бутират* должен быть сначала активирован путем превращения в *бутирил-СоА*. Реакции, происходящие при образовании *бутирата*, *ацетона* и *бутанола*, представлены на рис. 8.4. При брожении в щелочной среде (например, в присутствии CaCO₃; табл. 8.9) *C. acetobutylicum* ведет себя

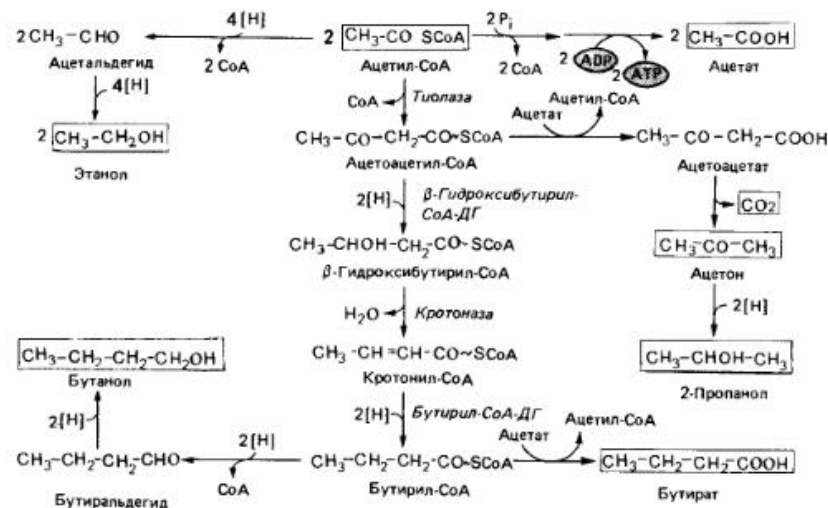


Рис. 8.4. Образование ацетата, этанола, н.бутанола, бутирата, ацетона и 2-пропанола при брожениях, осуществляемых клостридиями. Начальное расщепление глюкозы идет по фруктозобисфосфатному пути; пируват дегидрируется при участии пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы. На схеме представлены только последовательности реакций, начинающиеся от ацетил-СоА. ДГ — дегидрогеназа.

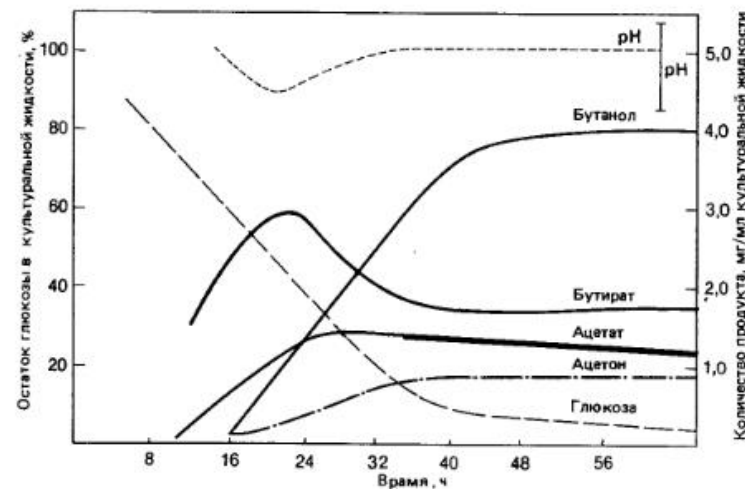


Рис. 8.5. Динамика сбраживания глюкозы бактерией *Clostridium acetobutylicum*. (Davis R., Stephenson M., Biochem. J., 35 [1941], 1320.)

Таблица 8.9. Ацетоно-бутиловое брожение, осуществляемое *Clostridium acetobutylicum* в присутствии и в отсутствие CaCO_3 , (Bernhauer et al., Biochem. Zeitschrift, 287 [1936], 61)

Продукт брожения	Количество продукта, мг на 50 мл сброженного 6%-ного затора	
	Без CaCO_3	В присутствии CaCO_3
Масляная кислота	32,4	630
Бутанол	411,5	45,7
Уксусная кислота	102,1	230,7
Этанол	44,5	22,4
Ацетон	222,3	13,2

как *C. butyricum*. Некоторые штаммы восстанавливают ацетон и выделяют 2-пропанол.

Этанол образуется в результате восстановления ацетил-СоА.

Молекулярный водород может происходить из NADH_2 , образующегося как при расщеплении пирувата, так и при дегидрировании глицеральдегидфосфата (см. стр. 265). Чем больше водорода может быть образовано при этом, тем меньше нужно синтезировать акцепторов водорода (ацетоацетил-СоА). Таким образом, энергия связи ацетил-СоА может быть сохранена в форме АТФ. Значит, если при сбраживании глюкозы *C. butyricum* на один моль глюкозы образуется больше двух молей H_2 и поэтому меньше бутирата и соответственно больше ацетата, то выход АТФ может превышать 3 моля (см. ниже о *Ruminococcus*).

Поскольку ацетон, 2-пропанол и бутанол служат важными органическими растворителями, брожение, осуществляемое клостридиями, имеет большое техническое значение. Именно в связи с получением этих веществ перед промышленностью впервые встала задача проведения микробиологических синтезов в условиях, исключающих возможность всякого загрязнения.

Сбраживание этанола и ацетата. Из накопительных культур *Methanobacterium omelianskii*, содержавших в качестве субстрата этанол, была выделена анаэробная спорообразующая бактерия, которая наряду с этанолом нуждается и в ацетате. Эта бактерия — *Clostridium kluyveri* — превращает смесь уксусной кислоты и этанола в масляную и капроновую кислоты и молекулярный водород (рис. 8.6). Ацетат служит дополнительным акцептором водорода, и он образуется в ходе брожения. АТФ синтезируется только при ацетаткиназной реакции.

Сбраживание лактата и ацетата. Из накопительных культур, содержащих в качестве субстрата лактат, была выделена бактерия *Clostridium tyrobutyricum*, которой тоже необходим ацетат как дополнительный акцептор водорода, если главным субстратом служит лактат или глице-

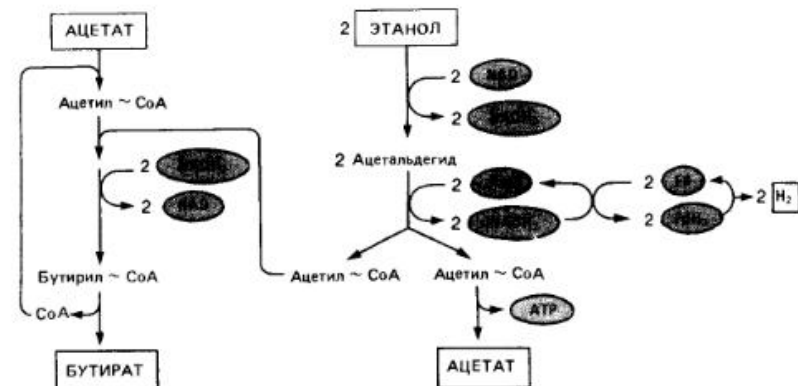
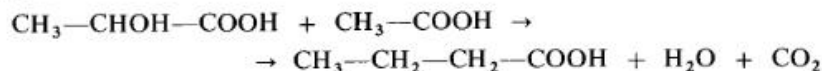


Рис. 8.6. Сбраживание этанола и ацетата с образованием бутирата и молекулярного водорода *Clostridium kluyveri*. Fd — ферредоксин.

рол:



C. tyrobutyricum сбраживает глюкозу по схеме, известной для *C. butyricum*, не нуждаясь в экзогенном акцепторе водорода.

Сбраживание глутаминовой кислоты. Из множества процессов брожения, при которых аминокислоты в анаэробных условиях превращаются в жирные кислоты, CO_2 и аммиак, мы рассмотрим только расщепление глутамата бактерией *Clostridium tetanomorphum*. Это брожение привлекло к себе внимание потому, что на его примере была выяснена биохимическая функция витамина B_{12} . *C. tetanomorphum* обычно выделяют из накопительной культуры с гистидином в качестве субстрата. Гистидин расщепляется через глутамат. При сбраживании глутамата образуются масляная и уксусная кислоты, аммиак, CO_2 и молекулярный водород. Путь катаболизма глутамата включает ряд необычных реакций (рис. 8.7). Сначала разрываются связи между углеродными атомами 2 и 3 и образуются связи между атомами 2 и 4, и в результате получается аминокислота с разветвленной цепью — метиласпарагиновая кислота. В этом участвует кофермент — производное витамина B_{12} . Лишь на этой стадии происходит дезаминирование. К ненасыщенной мезаконовой (метилфумаровой) кислоте присоединяется вода, а образующаяся цитрамалева (2-метил-яблочная) кислота расщепляется затем на уксусную и пировиноградную кислоты. Уксусная кислота выделяется, а пировиноградная рассмотренным выше путем превращается в масляную кислоту и CO_2 .

Соприженное сбраживание двух аминокислот (реакция Стикланда). Пептолитические клостридии (табл. 8.7, V) гидролизуют белки и затем используют аминокислоты. Многие аминокислоты сбраживаются толь-

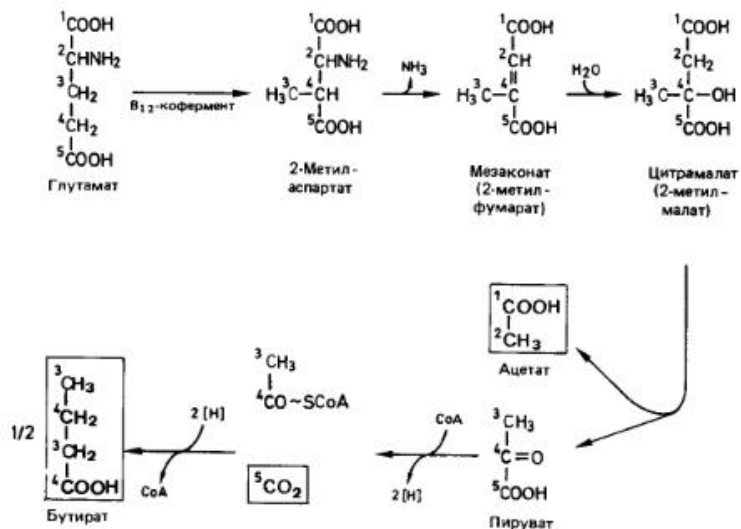
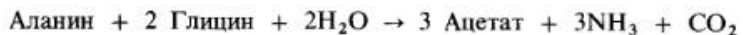
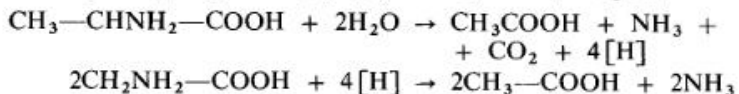


Рис. 8.7. Сбраживание глутамата бактерией *Clostridium tetanomorphum* по мезаконатному пути.

ко вместе с какими-нибудь другими. Как установил Стикленд (1934), *Clostridium sporogenes* быстро сбраживает смесь аланина и глицина, но не может использовать ни ту ни другую из этих аминокислот в отдельности. Судя по суммарному уравнению



аланин служит донором водорода, а глицин—акцептором:



Источником энергии, очевидно, служит сопряженная реакция окисления—восстановления. Роль донора водорода могут выполнять, например, аланин, лейцин, изолейцин, валин, серин, метионин и т. д. Акцепторами водорода могут служить глицин, пролин, аргинин, триптофан и т. д. Аминокислота-донор дезаминируется в оксокислоту, которая затем в результате окислительного декарбоксилирования превращается в жирную кислоту. Этот этап сопряжен с фосфорилированием и, таким образом, представляет собой реакцию, доставляющую энергию. Водород, перенесенный при этом на ферредоксин, снова связывается при восстановительном дезаминировании аминокислоты-акцептора. Однако не все аминокислоты используются всеми пептолитическими кластридиями.

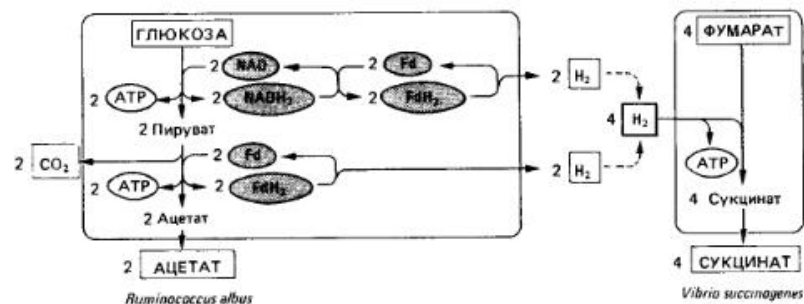


Рис. 8.8. Сбраживание глюкозы бактерией *Ruminococcus albus* и использование образовавшегося водорода в смешанной культуре с *Vibrio succinogenes*. (Пример симбиоза с передачей продукта одного вида другому виду.) Fd—ферредоксин.

Маслянокислое и уксуснокислое (ацетатное) брожение¹, осуществляемое неспорообразующими бактериями. Некоторые роды анаэробных бактерий близки к кластридиям по продуктам брожения; они, однако, не образуют спор, и многие из них грам-отрицательны. Большинство таких бактерий, образующих масляную и уксусную кислоты, было выделено из рубца, где они участвуют в разложении целлюлозы, крахмала и других углеводов. Они выделяют много молекулярного водорода и CO₂ и создают метаногенным бактериям условия для образования метана. Из бактерий рубца, образующих масляную кислоту, следует особо упомянуть *Butyrivibrio fibrosolvens*, а из обитающих в рубце продуцентов уксусной кислоты—*Ruminococcus albus*. Этот последний вид—строгий анаэроб, использующий целлюлозу и ксилан, а также многие сахара. Он способен превращать 1 моль глюкозы в 2 моля ацетата, 2 моля CO₂ и 4 моля H₂—правда, при условии, что концентрация выделенного водорода поддерживается на низком уровне. Это возможно в смешанной культуре с какой-либо бактерией, использующей водород, например *Vibrio succinogenes* (рис. 8.8). Из приведенной схемы видно, что при чистом ацетатном брожении может быть образовано 4 моля АТФ на 1 моль глюкозы. Столь высокая эффективность регенерации АТФ возможна, однако, лишь в том случае, если все возникающие при расщеплении глюкозы восстановительные эквиваленты будут освобождаться в виде молекулярного водорода (см. выше).

Кластридии—возбудители болезней и продуценты токсинов. Некоторые пептолитические кластридии могут быть возбудителями болезней при раневой инфекции (газовая гангрена и столбняк), а также причиной пищевых отравлений. Споры их очень распространены в почве. Если споры *Clostridium histolyticum* или *C. septicum* попадают в открытую рану, к которой нет доступа воздуха или где аэробные бактерии,

¹ С уксуснокислым брожением не следует смешивать аэробный процесс, осуществляемый уксуснокислыми бактериями.—Прим. перев.

потребляя кислород, создают анаэробные условия, то эти клостридии начинают расти, расщеплять с помощью протеиназ collagen и другие белки, вызывая образование дурно пахнущих продуктов брожения и газа. С такого рода газовой гангреной («госпитальной гангреной») в прежние времена можно было бороться только путем ампутации пораженной конечности. С раневой инфекцией связан и до сих пор еще нередко встречающийся столбняк. Его вызывает *Clostridium tetani*. Эта бактерия при своем росте выделяет очень сильный нейротоксин, вызывающий тонические судороги мышц.

Наиболее тяжелую форму пищевого отравления – ботулизм – вызывает *Clostridium botulinum*. Это широко распространенная почвенная бактерия, которая может развиваться в недостаточно простерилизованных мясных продуктах и бобовых консервах. Она получила свое название потому, что встречается в колбасе (лат. *botulus* – колбаса). Образующий ею токсин в случае потребления зараженного продукта может вызвать смерть вследствие нервного паралича, в частности паралича дыхания. Токсин этот, к счастью, термолабилен и быстро (за 15 мин) инактивируется при кипячении.

8.6 Гомоацетатное брожение. CO₂ как акцептор водорода

Некоторые клостридии (*Clostridium formicoaceticum*, *C. thermoaceticum*, *C. acidi-urici* и *C. cylindrosporum*) способны переносить водород, отщепленный от субстрата в начальных реакциях окисления, только на CO₂ и образуют при этом ацетат:



Термофильный вид *C. thermoaceticum* и мезофильный *C. formicoaceticum* сбраживает гексозы в основном до ацетата. Процесс идет по фруктозобисфосфатному пути, и на 1 моль гексозы образуется при этом почти 3 моля ацетата. Большая часть двуокиси углерода, освобождающейся при расщеплении пирувата, должна соответственно снова фиксироваться и служить акцептором водорода. Образование ацетата из CO₂ и восстановительных эквивалентов (электронов), освободившихся в начальных окислительных реакциях, происходит по пути, показанному на рис. 8.9.

Гексоза окисляется по обычному для клостридий фруктозобисфосфатному пути до пирувата, а последний с помощью пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы (1), фосфотрансацетилазы (2) и ацетаткиназы (3) превращается в ацетат и CO₂ с образованием также ферредоксина-H₂ и АТР. Акцептором водорода служит CO₂. Молекулы CO₂ частично восстанавливаются при участии формиадегидрогеназы (4) в формиат, а затем в метильную группу третьей молекулы ацетата и частично при участии СО-дегидрогеназы (5) в СО, превращаясь далее в карбоксильную группу ацетата. Восстановление формильной группы до метильной

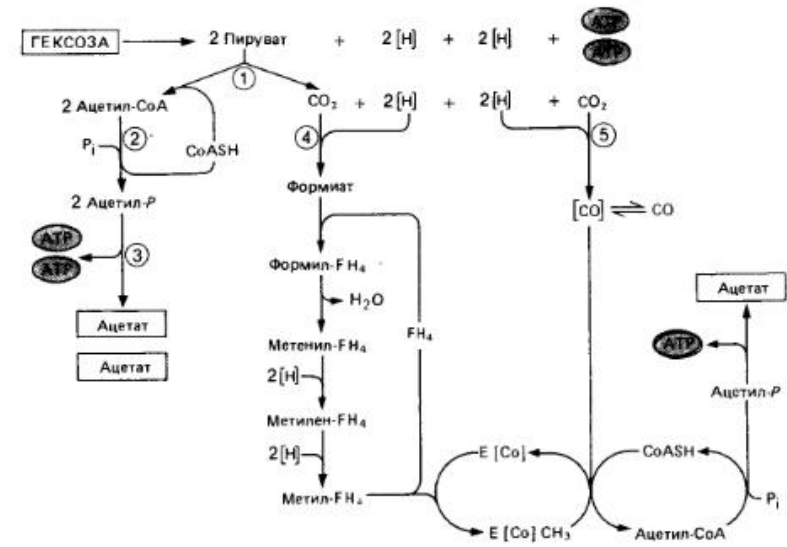
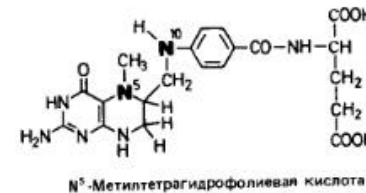


Рис. 8.9. Путь биосинтеза ацетата из гексозы у *Clostridium thermoaceticum* по ацетил-СоА-пути. Пояснения в тексте. E[Co] – корриноидный белок; FH₄ – тетрагидрофолат; [H] – водородные эквиваленты в виде NADH₂ или FdH₂; CO – экзогенная окись углерода, [CO] – связанная.

происходит с помощью тетрагидрофолата (FH₄) как кофермента. Метильная группа затем переносится на комплекс белка с корриноидом



(B₁₂-коферментом) и карбоксилируется путем присоединения связанного СО. Продукт этих превращений – ацетилкофермент А; из него обычным путем образуется ацетат, что сопровождается регенерацией АТР.

Этот путь синтеза ацетил-СоА из CO₂ и водородных эквивалентов – ацетил-СоА-путь – во многом сходен с синтезом ацетата анаэробно дышащими метанобразующими и ацетогенными бактериями (разд. 9.4 и 9.5).

У *Clostridium formicoaceticum* и *C. thermoaceticum* был найден цитохром b. Способны ли эти бактерии, а также *C. acetium* и другие клостридии получать энергию путем фосфорилирования, связанного с транспортом электронов, еще не выяснено (см. разд. 9.5).

8.7 Сбраживаемые и несбраживаемые природные соединения

Большинство природных соединений, состоящих из углерода, водорода, кислорода и (или) азота, поддается сбраживанию в анаэробных условиях. Предпосылкой для этого является возможность частичного окисления субстрата в результате внутримолекулярного расщепления, сопровождающегося выделением энергии (экзергоническая реакция). Сбраживаются, например, полисахариды, гексозы, пентозы, тетразы, многоатомные спирты, органические кислоты (в том числе сахарные кислоты, глюконат, малат, тартрат и т.д.), аминокислоты (за исключением ароматических, лишь условно поддающихся сбраживанию), пурины и пиримидины.

Наряду с соединениями, которые сбраживаются в анаэробных условиях, есть вещества, неспособные сбраживаться. Таковы насыщенные алифатические и ароматические углеводороды, стероиды, каротиноиды, терпены, порфирины. В аэробных условиях все эти вещества поддаются расщеплению и полностью окисляются, но в анаэробных условиях они очень стабильны. Стабильность их может быть обусловлена двумя причинами. Во-первых, большинство названных соединений содержит только атомы углерода и водорода; при внутримолекулярном расщеплении таких веществ энергия не выделяется. Во-вторых, насыщенные углеводороды и полиизопреноиды могут окисляться только в присутствии моле-

кулярного кислорода; первичное воздействие на них катализируется в этом случае оксигеназой. Высокая стабильность углеводородов в анаэробных условиях подтверждается в каждом лабораторном опыте. По-видимому, именно благодаря этой стабильности углеводороды так долго сохраняются в нефтяных месторождениях. Очевидно, в эпоху образования нефти микроорганизмы не обладали способностью сбраживать парафины. Не приобрели они ее и по сей день.

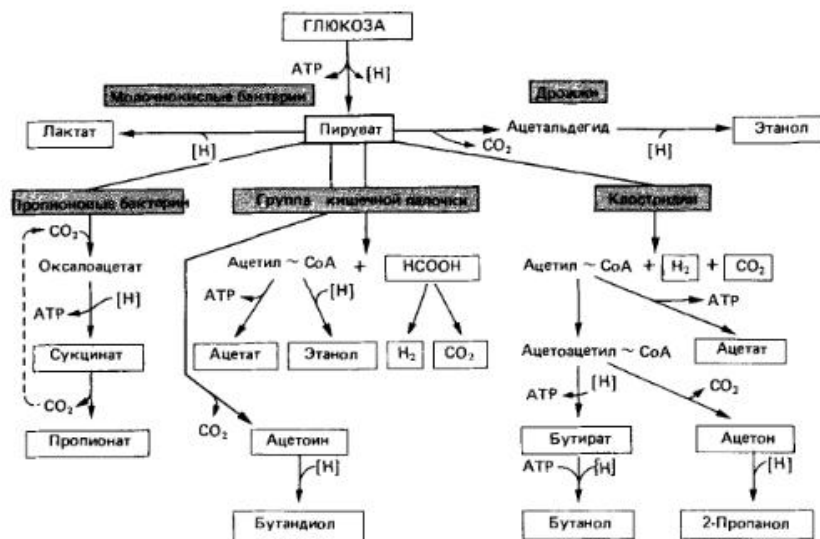


Рис. 8.10. Обобщающая схема важнейших брожений.

9. Перенос электронов в анаэробных условиях

В результате фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов при дыхании аэробных организмов, образуется намного больше АТФ, чем при фосфорилировании на уровне субстрата при брожении; поэтому неудивительно, что в процессе биохимической эволюции возник и в дальнейшем сохранился такой тип метаболизма, при котором водород от органического субстрата переносится на «связанный кислород». При этом «носителями» кислорода могут быть нитрат, сульфат, карбонат или другие соединения; они восстанавливаются водородом субстрата. Способность переносить электроны на эти соединения дает бактериям возможность окислять субстраты без участия молекулярного кислорода и таким образом извлекать больше энергии, чем это возможно при брожении.

Такого рода бактерии обладают системой переноса (транспорта) электронов и, как правило, содержат цитохромы. Получение энергии путем фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, при участии указанных выше «носителей кислорода» (вернее, конечных акцепторов водорода) в принципе сходно с дыханием, при котором роль конечного акцептора водорода играет кислород. Но поскольку такой процесс осуществляется в анаэробных условиях, говорят об **анаэробном дыхании**, причем различают *нитратное, сульфатное, карбонатное* дыхание и т. д. (рис. 9.1). Бактерии, способные к анаэробному дыханию с использованием неорганических акцепторов водорода (нитрат, сульфат, карбонат), играют очень важную роль как в природе, так и в хозяйстве человека.

9.1 Денитрификация и восстановление нитрата

Микроорганизмы используют нитрат для двух целей. Во-первых, подобно большинству растений, многие бактерии способны извлекать из него азот для синтеза азотсодержащих клеточных компонентов. Такая *ассимиляционная* нитратредукция может протекать и в аэробных, и в анаэробных условиях. Во-вторых, возможна также *диссимиляционная* нитратредукция, или «нитратное дыхание»; при этом нитрат в анаэробных условиях служит конечным акцептором водорода. В обоих случаях ни-

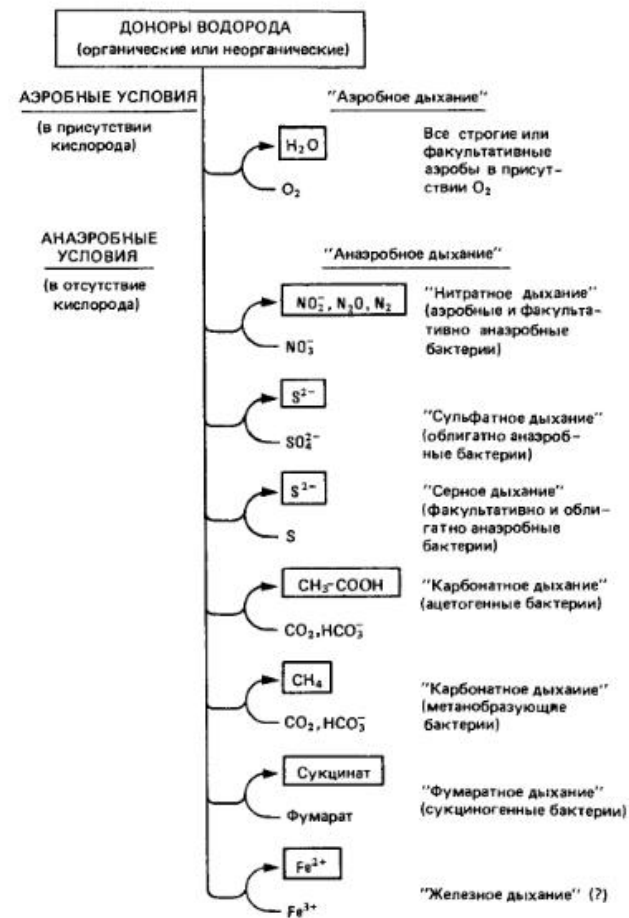
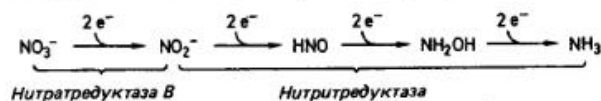


Рис. 9.1. Процессы получения энергии путем окислительного фосфорилирования в аэробных и анаэробных условиях («аэробное дыхание» и «анаэробное дыхание»)

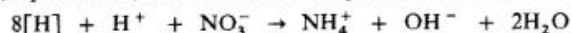
трат сначала восстанавливается до нитрита с помощью молибденсодержащего фермента *нитратредуктазы*.

Ассимиляция нитрата. В процессе ассимиляции нитрат сначала восстанавливается до нитрита, а затем до аммиака; последний используется для синтеза аминокислот и других азотсодержащих компонентов клетки. Первый этап катализирует *нитратредуктаза*; этот фермент (нитратредуктаза В) находится в цитоплазме, и его синтез индуцируется в том случае, если нитрат оказывается единственным источником азота в питательной среде. Нитрит восстанавливается до аммиака с помощью *нитритредуктазы*, на что затрачивается 6 электронов. Электроны поступают от NAD(P)H₂ (у грибов и бактерий) или ферредоксина (у

растений и некоторых бактерий). Нитритредуктаза – сложный фермент, его каталитические центры содержат атомы железа, из которых одни входят в состав гема (сирогем), а другие связаны с атомами серы. Нитритредуктазная реакция сходна с превращениями, катализируемыми нитрогеназой и сульфитредуктазой, так как при восстановлении субстрата происходит перенос 6 электронов и не высвобождается никаких промежуточных продуктов:

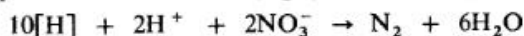


Образование аммония из нитрата представляет собой процесс восстановления, протекающий с большими затратами восстановительной силы:

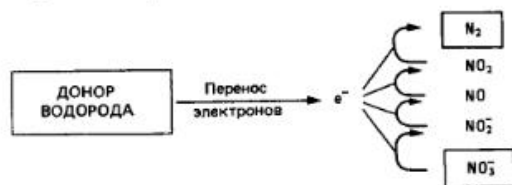


Сравнивая рост клеток в аэробных условиях на средах, содержащих в качестве источника азота нитрат или соответственно аммоний, можно заметить, что в первом случае затрачивается больше восстановительной силы (донора водорода), чем при восстановлении аммония (при одинаковом выходе биомассы).

Нитратное дыхание: денитрификация. Денитрифицирующие бактерии обладают способностью восстанавливать нитрат через нитрит до газообразной закиси азота (N_2O) и азота (N_2):

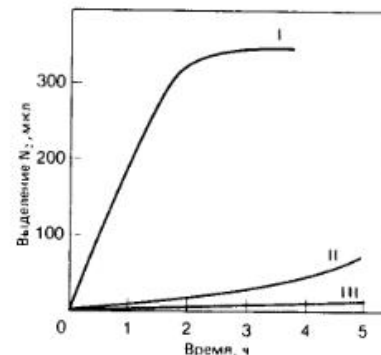


В отсутствие кислорода нитрат, таким образом, служит конечным акцептором водорода.



Способность получать энергию путем использования нитрата как конечного акцептора водорода с образованием молекулярного азота широко распространена у бактерий. Этот процесс *денитрификации* до сих пор был обнаружен только у факультативных аэробов; по-видимому, среди облигатных анаэробов нет денитрифицирующих форм. Кроме того, бактерии чаще обладают полной дыхательной системой; синтез ферментов, необходимых для денитрификации (мембраносвязанные нитратредуктаза А и нитритредуктаза), индуцируется только в анаэробных условиях (рис. 9.2). У многих денитрификаторов эта индукция происходит лишь в присутствии нитрата, хотя для некоторых достаточно создания анаэробных условий. Многие денитрификаторы могут расти, используя в качестве акцептора водорода не только нитрат, но и нитрит, а иногда даже закись азота. Из этого следует, что не только нитратре-

Рис. 9.2. Скорость образования молекулярного азота в клеточной суспензии. N_2 образуется в результате денитрификации нитрата в анаэробных условиях (окисляемым субстратом служит ацетат). Бактерии росли в различных условиях: анаэробно в присутствии нитрата (I); аэробно в присутствии нитрата (II); аэробно без нитрата (III). (Van Olden E. In: Kluyver A. J., Van Niel C. B. The Microbe's Contribution to Biology, Cambridge [Mass.]: Harvard Univ. Press, 1956.)



дуктаза А, но и диссимиляционная нитритредуктаза связана у них с дыхательной цепью и участвует в выработке энергии.

Накопительная культура денитрифицирующих бактерий. Если в среду, содержащую доноры водорода, субстраты для построения клеточных компонентов и нитрат, внести почву или ил и инкубировать культуру без доступа воздуха (см. табл. 6.3), то в ней будут расти различные бактерии: а) при наличии следов пептона и этанола или пропионовой кислоты – *Pseudomonas aeruginosa*; б) на глюкозе – *Pseudomonas fluorescens*; в) на тартрате, сукцинате или малате – *Pseudomonas stutzeri*; г) на среде с органическими кислотами, спиртом, мясным экстрактом и при высокой концентрации нитрата (5–12% KNO_3) – *Bacillus licheniformis*; д) при наличии следов дрожжевого экстракта и H_2 в качестве донора водорода – *Paracoccus denitrificans*; е) в присутствии серы или тиосульфата – *Thiobacillus denitrificans*. Поскольку некоторые денитрификаторы используют нитрат исключительно или преимущественно как акцептор водорода, но не могут восстанавливать его до NH_4^+ , необходимо добавлять в среду источник азота (пептон или соль аммония).

Обеднение почвы азотом вследствие денитрификации. Временные потери азота на ограниченных участках почвы, несомненно, связаны с деятельностью денитрифицирующих бактерий. Она имеет большое значение, когда в почве создаются анаэробные условия, например при застойном переувлажнении, особенно если при этом применяются органические удобрения и нитраты. На рисовых полях удобрение нитратами может приводить к вредным последствиям из-за накопления нитритов. Нитрит аккумулируется также в содержащих нитрат сточных водах при недостаточном доступе воздуха, а иногда попадает и в источники питьевой воды. Зависимость обеднения почвы азотом от аэрации связана с особенностями регуляции нитратредуцирующей ферментной системы у бактерий. Эти ферменты индуцируются нитратом только в анаэробных условиях (рис. 9.2); молекулярный кислород подавляет (репрессирует) синтез нитрат- и нитритредуктаз. В том случае, если ферменты уже были синтезированы до того, как клетки пришли в соприкосновение с кислородом воздуха, кислород вступает в конкуренцию с нитратом за

электроны, поступающие из дыхательной цепи, а также подавляет функцию нитратредуцирующей системы.

Значение денитрификации в природе. Денитрификация – единственный биологический процесс, благодаря которому связанный азот преобразуется в свободный N_2 . С глобальной точки зрения этот процесс имеет решающее значение для сохранения жизни на земной суше. В нормально аэрируемых почвах и водоемах нитрат представляет собой конечный продукт минерализации. Благодаря своей высокой растворимости в воде и слабому связыванию почвой нитрат-ионы вымывались бы из почвы и накапливались в морской воде; содержание молекулярного азота в атмосфере стало бы уменьшаться, и процессы роста растений и продукции биомассы на суше в конце концов прекратились бы.

Нитратное дыхание: восстановление нитрата до нитрита. Для целого ряда факультативно-анаэробных бактерий (*Enterobacter*, *Escherichia coli* и др.) нитрат может служить конечным акцептором водорода в процессе транспорта электронов, поставляющем энергию. Этот вид «нитратного дыхания» отличается от денитрификации тем, что здесь только первая ступень, а именно восстановление нитрата до нитрита с помощью нитратредуктазы А, сопряжена с переносом электронов и преобразованием энергии:



При этом нитрит может накапливаться в культуральной жидкости – образования N_2 не происходит.

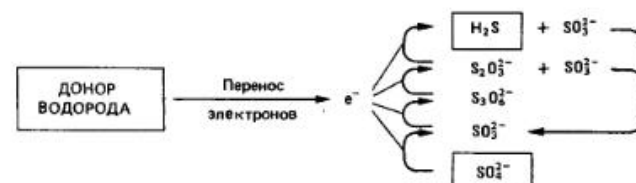
Однако вместо этого нитрит может восстанавливаться до аммиака путем ассимиляционной нитритредукции с последующим выделением NH_4^+ в среду. В таком случае говорят об *аммонификации нитрата*. Восстановление нитрата до аммиака не позволяет клетке получать энергию. Речь идет скорее о процессе брожения, в котором нитрит играет роль экзогенного акцептора электронов. Таким образом, восстановление нитрита все же дает известное преимущество: при сбраживании глюкозы часть атомов водорода расходуется на восстановление нитрита, в результате чего образуется больше ацетата (см. стр. 264, реакция 3).

Образование метгемоглобина как следствие накопления нитрата в питьевой воде и пищевых продуктах. Употребление содержащих нитрат питьевой воды (довольно частое в засушливые периоды) и овощей (например, «переудобренного» шпината) может вследствие бактериального восстановления нитрата в консервах или в кишечнике приводить к заболеваниям. Восстановление нитрата до нитрита микроорганизмами с последующим поступлением нитрита в кровь служит причиной образования метгемоглобина, в котором кислород прочно (необратимо) связан с гемоглобином. В результате эритроциты частично утрачивают

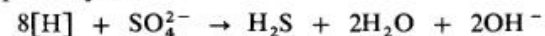
способность переносить кислород, что приводит к цианозу. Такое заболевание встречается только у детей младше 6 месяцев. У них нитратредуцирующие бактерии, по-видимому, не разрушаются в желудке и попадают в кишечник, где восстанавливают нитрат, растут и накапливают нитрит. У детей более позднего возраста и у взрослых такие бактерии погибают под действием сильноокислого желудочного сока, а ионы нитрата всасываются раньше, чем они могли бы подвергнуться восстановлению при благоприятных для этого значениях pH в двенадцатиперстной кишке.

9.2 Образование сероводорода при восстановлении сульфата

Физиологическую группу бактерий, восстанавливающих сульфат (их называют также десульфатирующими, сульфатредуцирующими или сульфидобразующими), отличает способность к переносу водорода с субстрата на сульфат как конечный акцептор электронов и, таким образом, к восстановлению сульфата до сульфида. В этом процессе происходит перенос электронов, и в нем участвует цитохром *c*. Энергия запасается благодаря фосфорилированию в электрон-транспортной цепи в анаэробных условиях:



Поскольку такое восстановление сульфата обладает формальным сходством с дыханием, при котором акцептором водорода служит кислород, принято говорить о **сульфатном дыхании**, или о *диссимиляционной сульфатредукции*. Главным продуктом такого процесса является сероводород:



Большая часть сероводорода, образующегося в природе, возникает благодаря этой реакции. Сульфатредуцирующие бактерии являются, в отличие от нитратредуцирующих, облигатными анаэробами, т.е. нуждаются в строго анаэробных условиях.

Систематика. Сульфатредуцирующие бактерии – это физиологическая группа, для которой характерна способность к образованию сероводорода из сульфата (табл. 9.1). Донорами водорода служат простые низкомолекулярные соединения, образующиеся при анаэробном разложении биомассы, главным образом целлюлозы: лактат, ацетат, пропионат, бутират, формиат, этанол, высшие жирные кислоты и молекулярный во-

Таблица 9.1. Важнейшие и наиболее распространенные сульфатредуцирующие бактерии

Вид	Форма клеток	Жгутикование	Цитохром (характерный)	Десульфурин	Рост на средах различного состава			Термофильность
					с пируватом (без сульфата)	с малатом (и сульфатом)	с форматом (и сульфатом)	
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Вибрионы	Полярное, монотрихальное	c ₃	+	+	+	-	-
<i>D. vulgaris</i>			c ₃	+	-	-	-	-
<i>D. gigas</i>	Спириллы	Полярное, политрихальное	c ₃	+	-	-	-	-
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	Палочки	Перитрихальное	b	-	+	-	-	+
<i>Dm. orientis</i>	Изогнутые палочки	»	b	-	-	-	-	-
<i>Dm. ruminis</i>	Палочки	»	b	-	+	+	-	-
<i>Dm. acetoxidans</i>	»	Полярное	b	-	-	-	-	-

дород. По степени усвоения органических кислот различают две группы сульфатредуцирующих бактерий:

1. Бактерии, относящиеся к первой группе, окисляют донор водорода не полностью и выделяют уксусную кислоту. Таковы виды спорообразующего рода *Desulfotomaculum* (*D. nigrificans*, *D. orientis* и *D. ruminis*) и неспорообразующего рода *Desulfovibrio* (*D. vulgaris*, *D. desulfuricans*, *D. gigas*, *D. thermophilus* и другие).
2. Вторая группа включает роды и виды, часть которых может расти, используя спирты, ацетат, высшие жирные кислоты или бензоат, а другие способны даже к хемоавтотрофному росту в присутствии водорода и формиата. К этой группе относятся спорообразователи (*Desulfotomaculum acetoxidans*), а также неспорообразующие палочки (*Desulfobacter*), кокки (*Desulfococcus*), сарцины (*Desulfosarcina*), нитевидные формы, передвигающиеся путем скольжения (*Desulfonema*), и некоторые другие бактерии.

Восстановление сульфата. Почти все бактерии, грибы и зеленые растения способны использовать в качестве источника серы сульфат. Они получают сульфид, необходимый для синтеза серосодержащих аминокислот, путем «ассимиляционной сульфатредукции». Первая реакция на этом пути является общей как для диссимилиационного, так и для ассимиляционного восстановления сульфата. Далее при диссимилиационной сульфатредукции происходит прямое восстановление активированного сульфата, а при ассимиляционной следует еще одна реакция активации. Восстановление сульфата в клетке начинается с его активации, на которую непосредственно затрачивается энергия АТФ (рис. 9.3); с помощью

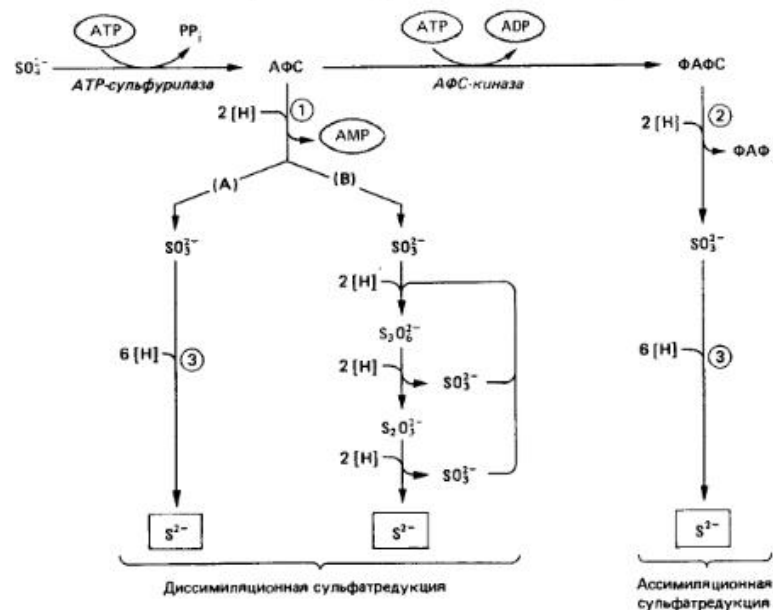


Рис. 9.3. Схема диссимилиационного восстановления сульфата («сульфатного дыхания») и ассимиляционного восстановления сульфата. АФС – аденозин-5'-фосфосульфат; ФАФС – фосфоаденозин-5'-фосфосульфат; ФАФ – фосфоаденозин-5'-фосфат. Ферменты, участвующие в реакциях (цифры в кружках): 1 – АФС-редуктаза; 2 – ФАФС-редуктаза; 3 – сульфитредуктаза (бисульфитредуктаза).

АТФ-сульфуриказы (сульфатаденилтрансферазы) дифосфатный остаток АТФ обменивается на сульфат:



Дифосфат (пирофосфат) расщепляется пирофосфатазой. Продуктом активации является аденозин-5'-фосфосульфат (АФС). Последующие реакции могут быть различными. На пути ассимиляционного восстановления сульфата АФС с помощью АФС-киназы и АТФ фосфорилируется у ряда организмов с образованием фосфоаденозинфосфосульфата (ФАФС); лишь этот вдвойне активированный сульфат восстанавливается сначала до сульфита, а затем до сульфида. При диссимилиационной сульфатредукции АФС с помощью АФС-редуктазы восстанавливается до сульфита, что сопровождается образованием АМР.

Восстановление сульфида до сульфида происходит, видимо, у разных бактерий по-разному. С помощью сульфитредуктазы сульфит прямо восстанавливается до сульфида (на что затрачивается 6 электронов) без образования промежуточных продуктов. В такого рода восстановле-

нии — как и в ассимиляционной сульфитредукции — участвуют, по-видимому, железопорфириновые соединения (десульфовиридин, десульфуробидин). Второй механизм состоит в последовательном трехступенчатом восстановлении сульфита с образованием промежуточных продуктов, таких как тритионат и тиосульфат (рис. 9.3). Предполагается, что электроны для восстановления сульфита доставляются цитохромами (у одних бактерий — цитохромом *b*, у других — цитохромом *c*).

Фосфорилирование, сопряженное с переносом электронов. Предположение о такого рода фосфорилировании у сульфатредуцирующих бактерий основано на данных о наличии цитохромов и железосерных белков в плазматических мембранах, а также о высоком выходе энергии. Цитохром *c*₃ обладает, по сравнению с другими цитохромами, весьма низким окислительно-восстановительным потенциалом ($E_0^1 = -205$ мВ) и находится на внешней поверхности мембраны или в периплазматическом пространстве.

У хорошо изученных видов сульфатредуцирующих бактерий была обнаружена конститутивная гидрогеназа (H_2 :цитохром-*c*₃-оксидоредуктаза), с помощью которой H_2 может как поглощаться и активироваться, так и выделяться в окружающую среду. Некоторые сульфатредуцирующие бактерии растут в присутствии H_2 и сульфата как единственных источников энергии. Способность к восстановлению сульфата с помощью H_2 и к образованию больших количеств сероводорода, не связанному с заметным ростом, вероятно, характерна для большинства сульфатредуцирующих бактерий.

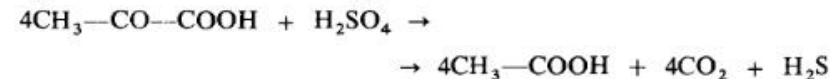
Перенос электронов с H_2 как донора, сопровождающийся восстановлением 1 моля сульфата до 1 моля сульфида, вероятно, сопряжено с регенерацией 3 молей АТФ, из которых, однако, 2 моля расходуются на активацию сульфата.

Окисление органических субстратов. Классические сульфатредуцирующие бактерии, которые были известны до 1975 года (например, *Desulfovibrio vulgaris*), окисляют органические субстраты не до H_2O и CO_2 , а до уксусной кислоты. Эти бактерии не имеют полного цикла трикарбоновых кислот. Однако недавно было выделено несколько видов, способных окислять ацетат, высшие жирные кислоты и бензоат.

Ассимиляция органических субстратов. Энергия, получаемая сульфатредуцирующими бактериями в результате окислительного фосфорилирования, делает возможной ассимиляцию органических веществ (органических кислот, аминокислот и т.п.). Некоторые штаммы способны синтезировать клеточные компоненты из ацетата и CO_2 , если донором водорода служит H_2 . Организмы, ассимилирующие органические вещества в процессе окисления неорганического донора электронов, можно называть *хемолитогетеротрофами*. Фиксация CO_2 в цикле Кальвина у данной группы микроорганизмов не обнаружена.

Брожение без сульфата. Некоторые сульфатредуцирующие бактерии обладают способностью расщеплять лактат или пируват в отсутствие

сульфата. Вместо окисления пирувата



они осуществляют брожение с выделением H_2 :



Таким образом, сульфатредуцирующие бактерии можно отнести к микроорганизмам, осуществляющим брожение.

Получение накопительных культур и выделение. Для выделения сульфатредуцирующих бактерий необходимо использовать питательную среду, содержащую подходящий донор водорода, пригодный для ассимиляции углеродный субстрат, минеральные вещества и сульфат; необходимо поддерживать анаэробные условия и достаточно низкий окислительно-восстановительный потенциал ($E_0^1 = -200$ мВ) (рис. 9.4).

Распространение и роль сульфатредуцирующих бактерий в природе. Сульфатредуцирующие бактерии встречаются главным образом в сероводородном иле, где органические вещества подвергаются анаэробному разложению. Эти бактерии, по-видимому, специально приспособлены к использованию продуктов неполного разложения углеводов — таких

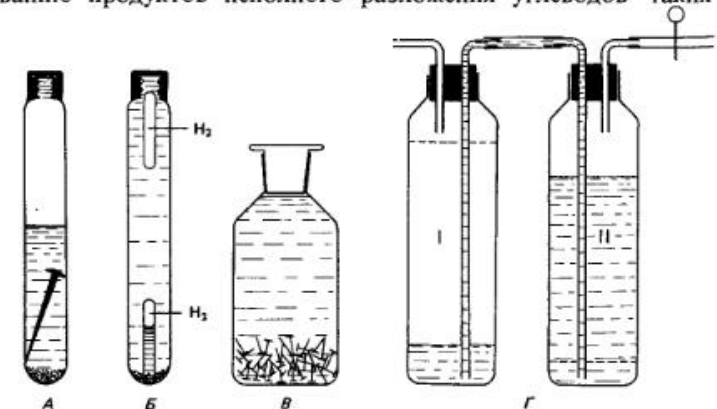


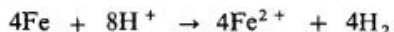
Рис. 9.4. Накопительные культуры сульфатредуцирующих бактерий. Рост после инокуляции среды сероводородным илом. А. Среда содержит лактат и сульфат; железный гвоздь обеспечивает достаточно низкий окислительно-восстановительный потенциал (в результате катодной поляризации). Б. Доказательство использования молекулярного водорода сульфатредуцирующими бактериями: пробирка Дёрхема, заполненная H_2 , перед инкубацией плавает, а после инкубации засеянной среды оказывается на дне. В. Рост бактерий в закупоренной бутылке в присутствии малых количеств органического вещества за счет восстановления сульфата и анаэробной коррозии железа. Г. Накопление сульфатредуцирующих бактерий в двойном сосуде Зенгена. Сосуд II заполняют средой, содержащей лактат и сульфат; затем впускают в него H_2 , и часть жидкости переходит в сосуд I (новые уровни показаны пунктирными линиями); в течение двухдневной инкубации при $30^\circ C$ значительная часть H_2 потребляется.

веществ, как жирные кислоты, гидроксикислоты, спирты и водород. Основную массу образующегося в природе сероводорода следует считать конечным продуктом сульфатного дыхания. Загрязненные воды содержат от 10^4 до 10^6 сульфатредуцирующих бактерий на 1 мл, а сероводородный ил – до 10^7 .

Большинство разрабатываемых месторождений серы (например, в Техасе, Луизиане и Мексике) имеет невулканическое происхождение; это отложения биогенной серы прошлых геологических эпох. Путем восстановления сульфатов морской воды за счет органических отходов (сточных вод) с помощью сульфатредуцирующих бактерий можно получать сероводород, а следовательно, и серу.

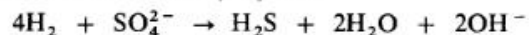
Большое экономическое значение имеет косвенный результат жизнедеятельности сульфатредуцирующих бактерий (например, *Desulfovibrio*) – **анаэробная коррозия железа**. Во влажной среде ионизация железа может происходить и в анаэробных условиях:

(1) Окисление железа:



Обычно образующаяся при этом пленка из молекулярного водорода предохраняет железо от дальнейшего разрушения. Однако в присутствии сульфатредуцирующих бактерий и при наличии в среде сульфатов происходит катодная деполяризация, и тогда железо окисляется даже в отсутствие кислорода;

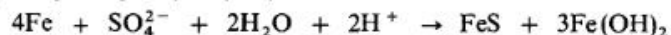
(2) Восстановление сульфата:



(3) Образование сульфида железа (выпадающего в осадок):



Суммарная реакция (1–3):



Обусловленное такой коррозией повреждение железных труб весьма убыточно.

Способность сульфатредуцирующих бактерий использовать органические кислоты, спирты и даже молекулярный водород, образующийся при поляризации железа, в качестве доноров водорода лежит в основе способа получения накопительных культур этих бактерий (рис. 9.4).

Сульфатредуцирующие бактерии считают ответственными за высокое содержание сероводорода в глубинных слоях Черного моря (глубже 200 м). В Венеции гондолы красят обычно в черный цвет; по-видимому, это защитная мера, связанная с тем, что красители, содержащие тяжелые металлы, изменяют под влиянием H_2S свой первоначальный цвет.

В образовании сероводорода в рубце жвачных животных участвует *Desulfotomaculum ruminis* (разд. 14.1).

9.3 Образование сероводорода при восстановлении серы

Давно известно, что суспензия дрожжей, сбраживающая сахар, вовлекает добавленный к ней серный цвет в «вихрь биологических восстановлений» с образованием сероводорода. Однако лишь недавно выяснилось, что и некоторые бактерии способны расти в присутствии элементарной серы, используя ее в качестве акцептора водорода при анаэробном переносе электронов. Сера восстанавливается при этом до сероводорода. Этот процесс можно назвать **серным дыханием**.

В настоящее время хорошо изучен вид *Desulfuromonas acetoxidans*. Эту бактерию, передвигающуюся с помощью латерально расположенного жгутика, можно выделить из морской воды и получить накопительную культуру в среде, содержащей минеральные соли, ацетат и серный цвет, при соблюдении анаэробных условий. *D. acetoxidans* окисляет ацетат или этанол до CO_2 . Своей способностью к восстановлению серы и к полному окислению органических субстратов этот вид отличается от большинства видов рода *Desulfovibrio*, которые могут восстанавливать сульфат или сульфит, но не серу, а лактат, например, окисляют только до ацетата. *D. acetoxidans* содержит цитохром c_7 с низким окислительно-восстановительным потенциалом, а также белок с четырьмя атомами Fe и четырьмя атомами S. Кроме того, эта бактерия обладает ферментами цикла трикарбоновых кислот.

D. acetoxidans может жить в синтрофной ассоциации с фототрофными зелеными серобактериями, которые окисляют на свету сероводород до серы и фиксируют CO_2 (рис. 9.5).

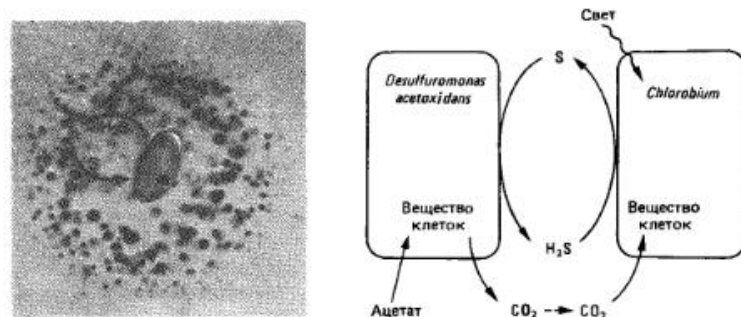


Рис. 9.5. Смешанная культура бактерий, восстанавливающих серу (*Desulfuromonas acetoxidans*), и зеленых фототрофных бактерий (*Chlorobiaceae*) на агаризованной среде. В большой центральной колонии *D. acetoxidans* происходит окисление ацетата и восстановление серы. Сероводород диффундирует в окружающий агар и служит донором водорода для клеток *Chlorobium*. Выделяемая этими клетками сера диффундирует (вероятно, в виде полисульфида) к центральной колонии, выступает в роли акцептора водорода и снова восстанавливается. Симбиоз этих двух бактерий – яркий пример синтрофной ассоциации с двусторонней передачей субстрата.

9.4 Образование метана при восстановлении карбоната

Метан образуется при анаэробном разложении органических веществ. Его запасы весьма значительны; примерные подсчеты показывают, что 1–1,5% углерода, поступающего в результате минерализации органических веществ в виде CO_2 в атмосферу, сначала попадает туда в виде метана и лишь затем превращается под воздействием гидроксильных радикалов (OH^\cdot) в CO , а потом в CO_2 . К экосистемам, в которых образуется метан, относятся большие площади, занятые тундрой и болотами (отсюда другое название метана – болотный газ); рисовые поля; осадки на дне прудов и озер; лиманы, марши и эстуарии; отстойники очистных сооружений и, наконец, желудки (рубцы) более чем 10^9 жвачных животных. В анаэробных условиях органические вещества сначала через ряд промежуточных этапов сбраживаются до ацетата, CO_2 и H_2 . Эти продукты метаболизма первичных и вторичных деструкторов используются метанобразующими (метаногенными) бактериями.

Систематическое положение метанобразующих бактерий. По морфологии эти бактерии можно подразделить на палочковидные (*Methanobacterium*), кокковидные (*Methanococcus*), сарциноподобные (*Methanosarcina*) и спирилловидные (*Methanospirillum*) (табл. 9.2).

Метанобразующие бактерии составляют обособленную группу микроорганизмов. Они отличаются от других бактерий не только типом метаболизма, но и некоторыми признаками, касающимися состава клеточных структур. У них нет типичного пептидогликанового остова:

Таблица 9.2. Некоторые метанобразующие бактерии

	Субстраты (доноры водорода)	Автотрофный рост
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	H_2	+
<i>Methanobrevibacter (Methanobacterium) arboriphilicum</i>	H_2	+
<i>Methanobrevibacter (Methanobacterium) ruminantium</i>	H_2 или формиат	–
<i>Methanobacterium formicicum</i>	H_2 или формиат	+
<i>Methanomicrobium (Methanobacterium) mobile</i>	H_2 или формиат	–
<i>Methanococcus vannielii</i>	H_2 или формиат	н. о. ¹
<i>Methanococcus (Methanosarcina) mazei</i>	H_2 , метанол, ацетат	+
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H_2 , метанол, ацетат, моно-, ди- и три-метиламин	+
<i>Methanospirillum hungatii</i>	H_2 или формиат	н. о.
<i>Methanotherix soehngenii</i>	Ацетат	–

¹ н. о. – не определяли.

Methanococcus обладает лишь белковой стенкой; у *Methanospirillum* имеется полипептидный чехол; клеточная стенка *Methanosarcina barkeri* построена из полисахарида, в состав которого входят уруновые кислоты, нейтральные сахара и аминсахара. Пенициллин не подавляет роста метанобразующих бактерий.

Цитоплазматическая мембрана содержит липиды, состоящие из эфиров глицерола и изопреноидных углеводов (разд. 3.13). Рибосомы по своей величине сходны с рибосомами эубактерий (70S), однако последовательность оснований в рибосомных РНК, особенно в 16S-рРНК, существенно иная, чем у эубактерий. В отношении последовательности 16S-рРНК метанобразующие бактерии значительно сильнее отличаются, например, от *E. coli*, чем цианобактерии. Кроме того, механизм трансляции нечувствителен к антибиотикам, подавляющим синтез белка у эубактерий. На основании этих, а также ряда других отличительных признаков метанобразующие бактерии относят к архебактериям (разд. 3.13).

Физиология. Метанобразующие бактерии – строгие анаэробы: кислород воздуха убивает их. У них нет ни каталазы, ни супероксиддисмутазы. Именно из-за высокой чувствительности этих бактерий к кислороду наши сведения об их физиологии, биохимии и экологии пока сравнительно скудны. Только после разработки специальных методов (например, метода Хангейта) появилась возможность пересевать и выделять метанобразующие бактерии без доступа кислорода.

Большинство до сих пор выделенных видов в чистой культуре способно использовать в качестве донора водорода H_2 , а некоторые из них – также формиат, метанол, ацетат или метиламин. В ряде анаэробных экосистем основным субстратом для образования метана служит ацетат. Таким образом, круг субстратов очень узок.

Метанобразующие бактерии составляют последнее звено **анаэробной пищевой цепи** (стр. 266), в начале которой находятся полисахариды (целлюлоза, крахмал), белки и жиры. В этой цепи участвуют также 1) бактерии, сбраживающие целлюлозу до сукцината, пропионата, бутирата, лактата, ацетата, спиртов, CO_2 и H_2 ; 2) ацетогенные бактерии, сбраживающие эти первичные продукты брожения до ацетата, формиата, CO_2 и H_2 (эти вещества в свою очередь служат субстратами для метанобразующих бактерий).



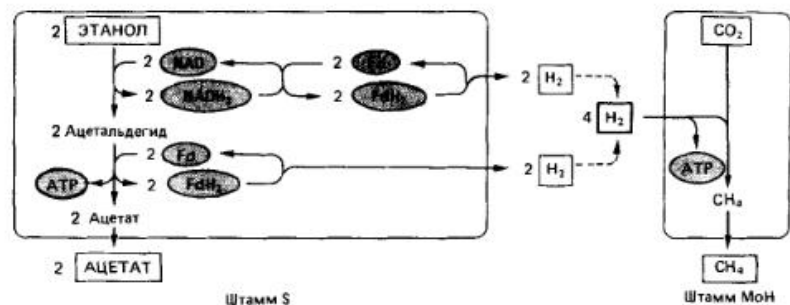
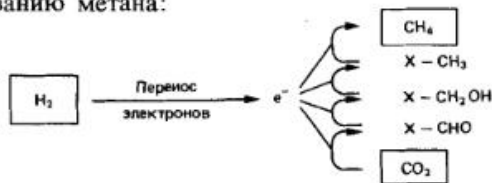


Рис. 9.6. Передача водорода от одного вида бактерий другому представлена здесь на примере компонентов культуры *Methanobacterium omelianskii*. На протяжении 30 лет ее считали чистой культурой, и только в 1967 г. она была разделена на штамм МоН (*methanobacterium oxidizing hydrogen*) и сопутствующий штамм S.

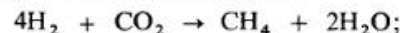
Метанобразующие бактерии, очевидно, находятся в тесном взаимодействии с бактериями, выделяющими водород (рис. 9.6). В микросреде обитания таких бактерий газообразный водород в свободном состоянии практически не встречается. Водород, выделяемый бактериями и растворенный в среде, сразу же поглощается метанобразующими видами. Известно, что высокое парциальное давление H_2 подавляет метаболизм и рост многих бактерий, образующих водород. Это означает, что не только метаногенные бактерии зависят от продуцентов H_2 , но и те в свою очередь зависят от поглощающих H_2 метанообразователей. Таким образом, имеет место ассоциация типа мутуалистического симбиоза.

Метанобразующие бактерии способны активировать водород и осуществлять его окисление, сопряженное с восстановлением CO_2 . Поскольку клеточные вещества ряда видов могут синтезироваться из CO_2 как единственного источника углерода, можно рассматривать способ существования этих бактерий как хемоавтотрофный. Для получения энергии CO_2 используется в качестве акцептора водорода, что ведет к образованию метана:



Таким образом, метанобразование можно по аналогии с другими видами дыхания называть карбонатным дыханием. Поэтому метанобразующие виды характеризуют как анаэробные автотрофные бакте-

рии, окисляющие водород:



$$\Delta G_0 = -131 \text{ кДж/моль} \quad (-31,3 \text{ ккал/моль})$$

Некоторые метанобразующие бактерии могут превращать в метан и окись углерода. При этом в качестве промежуточных продуктов образуются CO_2 и H_2 :



Биохимия образования метана и получения энергии. В биохимическом превращении H_2 и CO_2 в метан или ацетата в метан и CO_2 участвует ряд коферментов и простетических групп, которые до сих пор были найдены только у метанобразующих бактерий: производное дезазорибофлавина F_{420} , метаноптерин, метанофуран, никельтетрапиррольный фактор F_{430} и кофермент M (меркаптоэтансульфонат). Структура их показана на рис. 9.7. Наиболее вероятные пути образования метана из

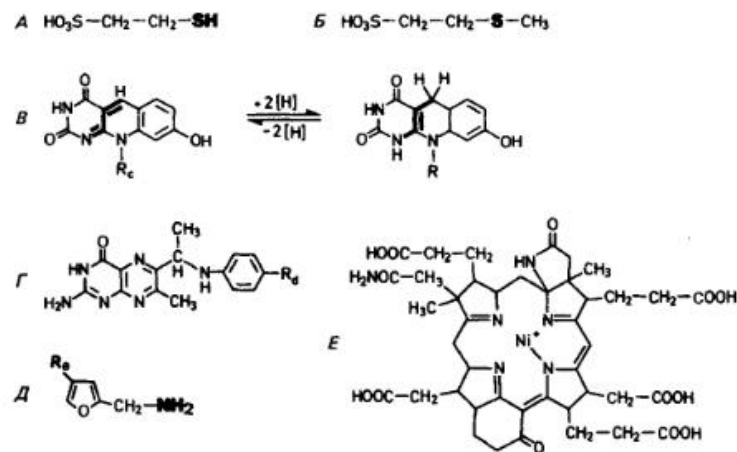
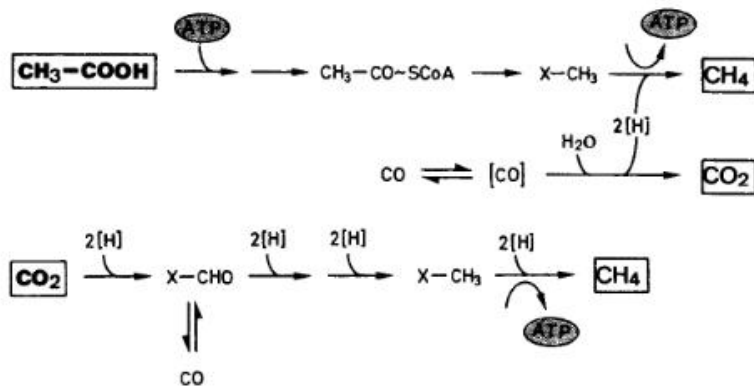
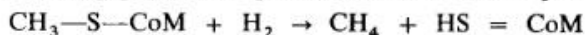


Рис. 9.7. Коферменты и простетические группы, имеющиеся у метаногенных бактерий. А — кофермент М; В — метилкофермент М; В — F_{420} , производное дезазорибофлавина; Г — метаноптерин; Д — метанофуран; Е — фактор F_{430} после отделения от метил-СоМ-метилредуктазы. Реактивные группы соединений Г и Е не указаны. R_c , R_d и R_e — различные боковые цепи, состоящие из нескольких компонентов.

ацетата и из $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ представлены на приведенных схемах:

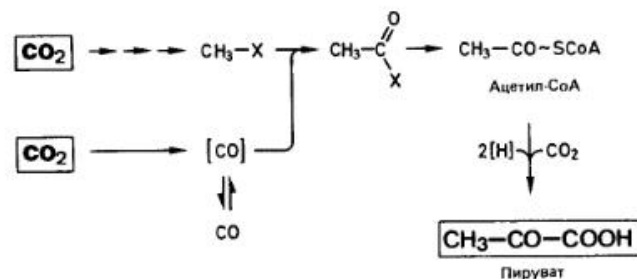


Пока мало что известно о ферментах, участвующих в отдельных реакциях. Вопрос о регенерации АТФ тоже окончательно еще не выяснен. С точки зрения термодинамики только последняя реакция, приводящая к образованию метана, может сопровождаться синтезом АТФ. Эксперименты на *Methanosarcina barkeri*-бактерии, способной также осуществлять реакцию $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$, дали следующие результаты. Добавление обоих субстратов к бактериальной суспензии приводило к выведению протонов, образованию АТФ и синтезу метана. При участии метилтрансферазы метанол может прямо превращаться в метилкофермент М, при восстановлении которого образуется метан:



Восстанавливающий фермент – метил-СoМ-метилредуктаза – представляет собой мультиферментный комплекс, который содержит, в частности, белковые факторы F_{420} , F_{430} и гидрогеназу. Вероятно, реакция всегда сопровождается выведением из клетки протонов, и создающийся в результате этого протонный потенциал доставляет энергию для регенерации АТФ. Из этих результатов можно заключить, что вообще метанобразующие бактерии синтезируют АТФ не путем фосфорилирования на уровне субстрата, а путем окислительного фосфорилирования в анаэробных условиях («анаэробное дыхание»).

Биохимия ассимиляции CO_2 . Автотрофная фиксация CO_2 у метанобразующих бактерий [так же как и у сульфатредуцирующих (гл. 9.2) и ацетогенных (гл. 9.5) анаэробов, использующих водород] происходит без участия реакций рибулозобисфосфатного цикла. Путь синтеза клеточных веществ из CO_2 идет через синтез ацетил-СoА и пирувата. Этапы этого пути были установлены с помощью радиоактивных соединений, а также в результате исследования ферментов *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Механизмы этих превращений в настоящее время интенсивно изучаются.



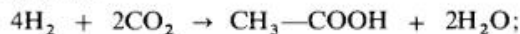
CO_2 восстанавливается до метанола (в связанной форме). Вторая молекула CO_2 восстанавливается с помощью СO-дегидрогеназы до СO. Восстановительные эквиваленты генерируются путем активации H_2 гидрогеназами и переносятся ферментами, реагирующими с фактором F_{420} или с NADP. Карбонилирование метил-Х ведет к образованию ацетил-Х, а в результате восстановительного карбоксилирования ацетил-СoА с помощью пируватсинтазы получается пируват, из которого известными путями синтезируются клеточные вещества.

Практическое значение метанобразующих бактерий. Отстойники, в которых происходит анаэробный распад органических веществ сточных вод населенных пунктов, относятся к обычному оснащению коммунальных водоочистных сооружений. В промышленных странах гниение ила служит в первую очередь стабилизации первичного ила, а также активного ила, образующегося при аэробной очистке сточных вод. Метан, выделяющийся при гниении ила, частично используется определенными микроорганизмами, а частично его применяют в качестве топлива. В сельском хозяйстве применяют биогаз-ферментеры, а также ямы для навоза, чтобы сбраживать (с получением метана) экскременты животных вместе с отбросами, содержащими целлюлозу. Метод образования биогаза, основной частью которого является метан, обладает двумя важными преимуществами: во-первых, сохраняется содержащийся в экскрементах азот, а также те ценные качества удобрения, которыми обладает сероводородный ил; во-вторых, происходит образование биогаза (в основном метана), который может быть использован в качестве источника энергии как в сельскохозяйственном производстве, так и в домашнем хозяйстве.

9.5 Образование ацетата при восстановлении карбоната

В различных местах, где образуется метан, происходит также образование уксусной кислоты. Подкисление среды в отстойниках водоочистных сооружений, вероятно, связано с деятельностью бактерий, превращающих CO_2 и молекулярный водород в уксусную кислоту согласно

уравнению



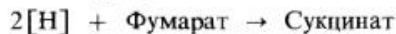
$$\Delta G_0 = -111 \text{ кДж/моль} (-26,6 \text{ ккал/моль})$$

Путем накопления в среде, которая содержала лишь необходимые неорганические соли и витамины и через которую пропускали H_2 и CO_2 , удалось выделить из сероводородного ила, а также из ила пресноводных водоемов и из морских осадков бактерии, способные к автотрофному росту в присутствии H_2 и CO_2 . Речь идет о грам-положительных палочковидных бактериях, таких как *Clostridium aceticum*, *C. thermoaceticum* и *Acetobacterium woodii* (разд. 8.6). Ацетогенные бактерии следует рассматривать как анаэробные хемолитоавтотрофные, окисляющие водород микроорганизмы, которые получают энергию с помощью одного из видов анаэробного дыхания, а именно **карбонатного дыхания**. Путь синтеза клеточного вещества идет у них через ацетил-СоА и пируват. При таком синтезе ацетата CO_2 восстанавливается через стадию формиата при участии тетрагидрофолиевой кислоты (как кофермента) до метил- FH_4 . Дальнейшие превращения, вероятно, сходны с этапами синтеза ацетата у *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Восстановительное карбоксилирование ацетил-СоА приводит к образованию пирувата, из которого затем обычными путями синтезируются клеточные вещества.

Бактерии, способные к карбонатному дыханию, при росте на среде с H_2 и CO_2 выделяют большие количества уксусной кислоты. Можно предположить, что ее образование идет по пути ассимиляционного синтеза ацетата и что высокоэнергетическая связь в ацетил-СоА используется для регенерации АТФ. Однако механизм этих превращений выяснен еще не до конца и не у всех видов.

9.6 Образование сукцината при восстановлении фумарата

Мы уже неоднократно говорили о сукцинате (янтарной кислоте) как о продукте брожения, но не упоминали о том, что образование сукцината может быть связано с окислительным фосфорилированием. Сукцинат является продуктом восстановления фумарата:



Функция фумарата не сводится к роли простого акцептора, взаимодействующего с NADH_2 , который образуется при окислении гексоз. Для пары фумарат/сукцинат окислительно-восстановительный потенциал $E'_0 = -30 \text{ мВ}$. Фумарат может акцептировать электроны, которые поставляются переносчиками водород коферментами и уже прошли часть пути по дыхательной цепи; поэтому он делает возможным окислительное фосфорилирование. Такого рода фосфорилирование с фумаратом в качестве конечного акцептора электронов можно отнести

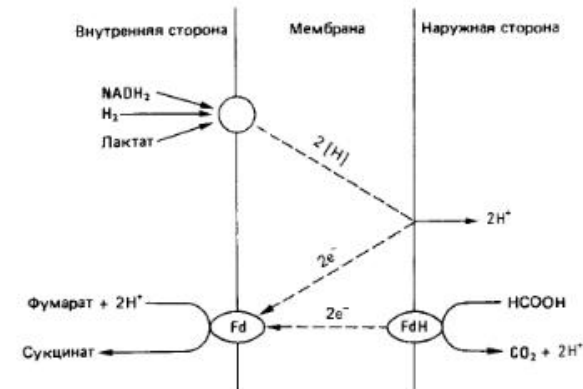


Рис. 9.8. Образование сукцината из фумарата при помощи мембраносвязанной фумаратредуктазы. Этот процесс может быть сопряжен с созданием протонного потенциала на цитоплазматической мембране, что делает возможным окислительное фосфорилирование.

к «анаэробным дыхательным процессам» и говорить о **фумаратном дыхании** (рис. 9.8).

Фумаратное дыхание широко распространено у хемоорганотрофных анаэробных бактерий. Добавление фумарата к питательной среде вызывает у многих бактерий быстрый рост и повышает выход биомассы. Это указывает на то, что фумарат делает возможной эффективную регенерацию АТФ. Соответствующие результаты были получены для энтеробактерий (*Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*), а также *Bacteroides*, *Propionibacterium* и *Vibrio succinogenes* (см. рис. 8.8). В анаэробных условиях фумарат, добавленный в питательную среду, может служить для бактерий экзогенным конечным акцептором электронов. Однако возможно и его эндогенное образование из углеводов и многих других субстратов через оксалоацетат и малат (см. рис. 7.13).

Локализация фумаратредуктазы в клетке согласуется с представлением об ее роли в транспорте электронов: этот фермент связан с мембраной. Процесс восстановления фумарата сопровождается затратой протонов. Из гипотезы, согласно которой восстановление фумарата ведет к созданию протонного потенциала (с положительным зарядом снаружи), вытекает предположение, что фермент фумаратредуктаза должен находиться на внутренней поверхности мембраны. По-видимому, так и обстоит дело. Измерения показали, что при восстановлении 1 моля фумарата образуется 1 моль АТФ.

Можно полагать, что в большинстве процессов брожения, связанных с образованием сукцината, участвует фумаратредуктаза, и это приводит к дополнительному образованию АТФ.

К таким процессам относится, например, образование сукцината у *Escherichia coli* и пропионата у *Propionibacterium*. Однако «фумаратное дыхание» встречается не только у прокариот. Существует несколько видов факультета-

тивно-анаэробных червей (*Ascaris lumbricoides*, *Fasciola hepatica*, *Trichuris vulpis*, *Arenicola marina*), способных жить в анаэробных условиях. Эти организмы выделяют сукцинат и пропионат; образование пропионата идет по метилмалонил-CoA-пути (см. рис. 8.3). Роль образования сукцината и пропионата у низших животных, видимо, сходна с ролью молочнокислого брожения в мышцах млекопитающих. Различные виды брожения, так же как и фумаратное дыхание, могут доставлять некоторое количество энергии и строго аэробным организмам, что позволяет им переносить кратковременную аноксию.

9.7 Восстановление ионов Fe (III) до Fe (II)

Смешанные популяции почвенных бактерий в анаэробных условиях восстанавливают ионы Fe(III) до Fe(II). Если в среде помимо Fe(III) присутствуют также ионы нитрата и нитрита, то сначала восстанавливаются они (до нитрита и N₂, денитрификация) и лишь после этого – ионы Fe(III). Предполагают, что перенос электронов на трехвалентное железо осуществляет нитратредуктаза А. Поскольку восстановление нитрата сопряжено с окислительным фосфорилированием, не исключено, что и восстановление Fe(III) может использоваться в процессе «анаэробного дыхания». Окислительно-восстановительный потенциал E'_0 , который для пары Fe^{3+}/Fe^{2+} равен +770 мВ, делает такую реакцию термодинамически возможной. Поскольку оксиды трехвалентного железа практически нерастворимы в воде, они сначала должны быть переведены в растворимую форму, способную проникать внутрь бактериальных клеток. Это, вероятно, осуществляется с помощью сидерофоров. Неудивительно, что в таких условиях наблюдается лишь медленный и незначительный рост бактерий.

10. Неполные окисления

Большинство аэробных микроорганизмов окисляет органические питательные вещества в процессе дыхания до CO₂ и воды. Поскольку в молекуле CO₂ достигается высшая степень окисления углерода, в этом случае говорят о *полном окислении* и отличают этот тип дыхания от *неполных окислений*, при которых в качестве продуктов обмена выделяются частично окисленные органические соединения.

Под «полным окислением» имеется в виду лишь то, что не происходит выделения каких-либо органических веществ; но это вовсе не означает, что окисляется весь поглощенный субстрат. В каждом случае значительная часть субстрата (40–70%) ассимилируется, т.е. превращается в вещества клеток.

Конечными продуктами «неполных окислений» могут быть уксусная, глюконовая, фумаровая, лимонная, молочная кислоты и ряд других соединений. Поскольку эти продукты сходны с теми, которые образуются при брожениях (пропионовая, масляная, янтарная, молочная кислоты и др.), а также в связи с тем, что при промышленных процессах брожения необходимы специальные технические устройства (ферментеры), неполные окисления называют также «окислительным брожением» или «аэробной ферментацией». Слова «брожение» и «ферментация» в этом случае отражают скорее технологический аспект.

Мы будем причислять к «неполным окислениям» также простое отщепление водорода от субстрата и использование микроорганизмов для катализа некоторых реакций, не имеющих для них какого-либо значения в обычных условиях. Ниже будут рассмотрены некоторые примеры таких окислений.

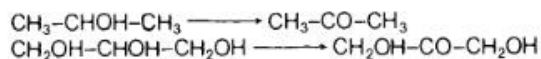
10.1 Образование уксусной кислоты и уксуснокислые бактерии

Всем уксуснокислым бактериям присуща способность к образованию кислот путем неполного окисления сахаров или спиртов. Эти кислоты как промежуточные или как непригодные для использования конечные продукты обмена выделяются в среду. Уксуснокислые бактерии – это грам-отрицательные палочки с перитрихально (*Acetobacter*) или полярно (*Acetomonas* = *Gluconobacter*) расположенными жгутиками, обладающие некоторой подвижностью. Они сходны с псевдомонадами, но отличаются от них высокой толерантностью к кислотам, слабой пептолитической

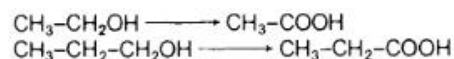
активностью, малой подвижностью и отсутствием пигментов. В природных условиях уксуснокислые бактерии поселяются обычно на растениях. В сахаристых выделениях растений вместе с уксуснокислыми бактериями обитают дрожжи.

С помощью простого эксперимента можно определить, относится ли данная бактерия к группе *peroxydans*, т.е. к организмам, накапливающим уксусную кислоту лишь в качестве промежуточного продукта, или же к группе *suboxydans*, у представителей которой уксусная кислота не подвергается дальнейшему окислению. На непрозрачном «меловом» агаре (содержащем этанол, дрожжевой экстракт и CaCO_3) вокруг растущих колоний появляется светлый ореол—результат растворения мела под действием выделяющейся кислоты. В культуре *suboxydans* этот ореол сохраняется, тогда как в культуре *peroxydans* в результате дальнейшего окисления уксусной кислоты через некоторое время вновь наблюдается помутнение, связанное с вторичным выпадением CaCO_3 в осадок. Типичным представителем первой группы является *Gluconobacter oxydans*, а ко второй группе относят *Acetobacter aceti* и *A. pasteurianum*. Между этими двумя крайними типами существует много промежуточных форм. *Acetobacter xylinum*, *A. aceti* и *A. acidophilum* окисляют уксусную кислоту лишь очень медленно. Большинство уксуснокислых бактерий нуждается в сложных питательных средах.

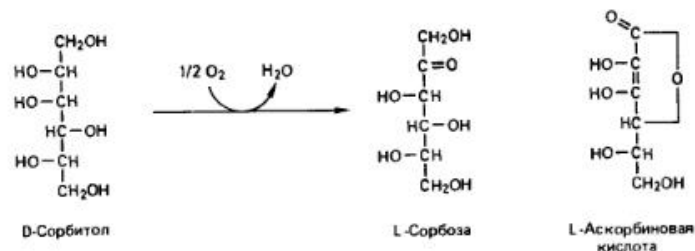
Уксуснокислые бактерии окисляют первичные спирты в соответствующие жирные кислоты, например



а вторичные спирты—в кетоны, например

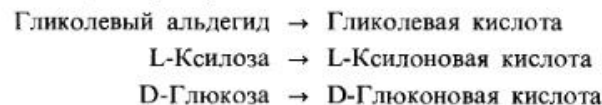


Спирты, являющиеся производными сахаров, окисляются в альдозы и кетозы (например, сорбитол в сорбозу). Такое окисление, будучи одним из этапов на пути препаративного получения аскорбиновой кислоты из глюкозы, приобрело большое промышленное значение. D-Сор-



битол можно получить путем электролитического восстановления D-глюкозы. С помощью *Gluconobacter oxydans* из растворов, содержащих до 30% сорбитола, получают сорбозу с выходом 90%. Уксуснокислые бактерии окисляют также глицерол, тетритол, пентитол, гекситол и септитолы (например, D-маннитол в D-фруктозу).

Альдегиды, альдозы и кетозы превращаются в соответствующие кислоты, например



D-Глюконовую кислоту уксуснокислые бактерии могут превращать в кетоглюконовые кислоты. Отдельные штаммы различаются между собой по способности образовывать 2- или 5-кетоглюкоонат. *Gluconobacter melanogenum* образует 2,5-дикетоглюконовую кислоту (через 2-кетоглюконовую). Эта неустойчивая при pH 4,5 кислота ответственна за коричнево-черную окраску колоний этого вида на агаре с глюкозой (отсюда и название *melanogenum*).

Технология производства уксуса. Получение уксуса из вина или спирта связано главным образом с одной проблемой—с техникой аэрации (разд. 6.2). Задача состоит в том, чтобы обеспечить тесный контакт бактерий и окисляемой жидкости с кислородом воздуха. Различают три основных способа выращивания бактерий: поверхностное, фиксированное и глубинное выращивание.

Если оставить вино в плоских чашках или бродильном чане, то на его поверхности образуется сплошная пленка культуры *Acetobacter xylinum* (= *Mycoderma aceti*). Процесс окисления при такой **поверхностной ферментации** протекает очень медленно. **Фиксированным** выращиванием называют все способы, при которых бактерии фиксируются на каком-нибудь опорном материале (например, на виноградных выжимках или измельченных веточках виноградной лозы) в хорошо аэрируемых чанах. При «скоростном» методе получения уксуса содержащую спирт жидкость многократно пропускают через сосуд, наполненный буковыми стружками (генератор), для аэрации которого подают воздух снизу. Все чаще применяют для производства уксуса и **глубинные** методы.

Биохимия образования уксусной кислоты. *Acetobacter* и *Gluconobacter* обладают алкогольдеhydroгеназой, глюкозодеhydroгеназой и другими полиолдеhydroгеназами, которые содержат недавно открытую простетическую группу, названную метоксантином или пирролохинолинкином. Эти ферменты находятся на внешней стороне плазматической мембраны и катализируют окисление этанола, глицерола или глюкозы в соответствующие кислоты (уксусную, глицериновую, глюконовую). При этом электроны поступают в электрон-транспортную цепь, а протоны выводятся наружу, в периплазматическое пространство. Метоксантин попадает также в питательную среду и в пищевой уксус, обуславливая его желтую окраску.

10.2 Образование других органических кислот

Многие органические кислоты, в том числе и аминокислоты, получают в промышленных масштабах с помощью микроорганизмов, осуществляющих неполные окисления. Преимущества использования грибов для получения лимонной, итаконовой, глюконовой, яблочной и других кислот выяснились уже в начале нашего столетия. Что касается бактерий, то еще десять лет назад с их помощью получали только уксусную и глюконовую кислоты; однако теперь они играют большую роль и как продуценты аминокислот.

10.2.1 Образование кислот грибами

Для грибов характерен окислительный тип метаболизма. Это не означает, что грибы не способны к анаэробному расщеплению углеводов, т.е. не могут их сбраживать (ведь спиртовое брожение осуществляется как раз дрожжами!); однако в анаэробных условиях сколько-нибудь длительный рост грибов невозможен. Кроме того, основными продуктами брожения оказываются этанол или молочная кислота. Другие органические кислоты образуются только в аэробных условиях.

В естественных местах обитания грибов, т.е. в почве, никогда не бывает заметного накопления промежуточных продуктов их жизнедеятельности. При недостатке питательных веществ грибы получают максимум энергии и образуют клеточные вещества за счет полного окисления и ассимиляции субстрата. Если в лабораторных условиях и в промышленной практике дело обстоит иначе и многочисленные продукты обмена выделяются в среду, то это следует объяснить избыточным снабжением грибов углеводами и известной «дезорганизацией» их метаболизма, которой часто способствует исключение из среды некоторых микроэлементов.

Известно, что грибы обладают мощной гликолитической системой. В «узких местах» метаболических путей происходит накопление промежуточных продуктов, которые прямо или после незначительных химических изменений выделяются в среду. Дж. Фостер особо подчеркивал отклонения в обмене веществ, возникающие при избытке субстрата. В конечном счете большинство неполных окислений связано с нарушением регуляции метаболизма.

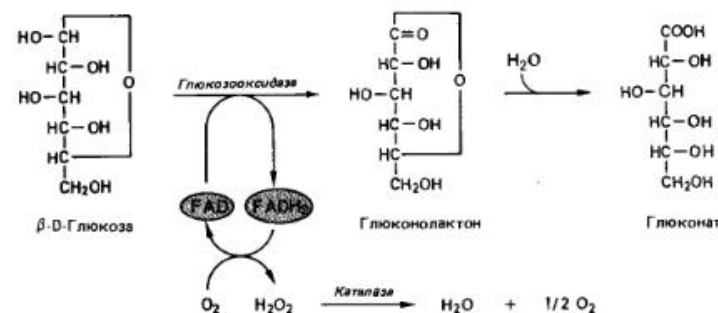


Во многих случаях достаточно удалить какой-нибудь необходимый микроэлемент, чтобы промежуточные продукты начали выделяться в среду. Значительное влияние оказывает изменение концентрации цинка, железа, марганца, меди, а также магния, калия и кальция (см. рис. 10.1).

Молочную кислоту выделяют главным образом представители порядка *Mucorales* (*Rhizopus nodosus*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. nigricans*) и другие фикомицеты (*Allomyces*, *Saprolegnia*, *Blastocladiella*). Однако у грибов она никогда не бывает единственным продуктом, как у гомоферментативных молочнокислых бактерий. Наряду с молочной кислотой грибы образуют в небольших количествах фумаровую, янтарную, яблочную, муравьиную и уксусную кислоты, а также этанол. Для получения максимального выхода молочной кислоты необходимо присутствие O_2 . Поскольку грибы не нуждаются в сложных питательных средах и в качестве источника азота довольствуются мочевиной, получать молочную кислоту в особо чистом виде с помощью грибов проще, чем использовать молочнокислое брожение, осуществляемое лактобациллами.

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

Глюконовую кислоту образуют многие аспергиллы и пенициллы. Это продукт ферментативного окисления глюкозы *глюкозооксидазой*, выделяемой грибами в питательную среду. У *Aspergillus niger* этот процесс может идти с высоким выходом даже в 30–35%-ных растворах глюкозы, если выделяющуюся кислоту нейтрализовать карбонатом кальция.



Глюкозооксидаза представляет собой фермент, содержащий в качестве простетической группы FAD. При окислении глюкозы под действием этого фермента как промежуточный продукт образуется β-D-глюконо-δ-лактон, который затем спонтанно или же с помощью другого фермента – *глюконолактоназы* – присоединяет воду и превращается в глюконовую кислоту. Восстановленная глюкозооксидаза переносит водород на кислород воздуха с образованием перекиси водорода,

которая затем под действием каталазы может расщепляться на воду и кислород.

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

Много работ посвящено образованию **лимонной кислоты**, особенно техническим и экономическим аспектам ее производства. После того как Вемер в 1893 году обнаружил лимонную кислоту в культурах грибов (*Citromyces pfefferianus*), Кюрри в 1917 году разработал основы получения ее в промышленном масштабе; он установил, что *Aspergillus niger* превосходно растет на средах с начальными значениями pH от 2,5 до 3,5 и выделяет при этом большие количества лимонной кислоты. С повышением pH появляется сначала глюконовая кислота, а затем щавелевая. Низкое начальное значение pH имеет то преимущество, что позволяет не опасаться бактериального загрязнения.

Промышленное производство лимонной кислоты до сих пор часто ведется без соблюдения стерильности, поверхностным способом в кюветах. В бродильные камеры помещают алюминиевые кюветы (размером 2 × 2,5 × 0,15 м), заполненные на высоту 8 см раствором мелассы, и после инокуляции спорами гриба выдерживают их 9–11 дней при 30°С. Выход продукта получается весьма значительным. После спуска питательной среды можно снова подвести мицелий гриба свежий раствор. Лимонную кислоту осаждают из переработанного раствора, добавляя карбонат кальция, а затем перекристаллизовывают и выделяют с помощью серной кислоты. В настоящее время при производстве лимонной кислоты все более широко применяют глубинный метод.

Зависимость образования лимонной кислоты от состава среды особенно четко выражена у *Aspergillus niger*. В этом легко убедиться, изменяя содержание одного из компонентов среды при сохранении всех прочих условий. Если к простой среде с глюкозой после удаления микроэлементов (их осаждают гидроокисью алюминия) прибавлять определенные компоненты в известных концентрациях, а затем инокулировать среду и после 9-дневной инкубации в колбах со встряхиванием определять массу мицелия, остаточное количество сахара и количество образовавшейся лимонной кислоты, то можно установить ряд интересных соотношений (рис. 10.1). Приведенные кривые позволяют сделать следующие выводы: а) нитрат аммония и сульфат магния не оказывают какого-либо специфического влияния на выход лимонной кислоты — они влияют только на рост мицелия; б) кривые для цинка, железа и фосфора характеризуются четким пиком. При концентрациях, обеспечивающих лишь субоптимальный рост мицелия, отмечается более высокий выход лимонной кислоты; однако при дальнейшем снижении концентрации этих трех элементов торможение роста мицелия ограничивает и выработку кислоты; в) особенно высокие выходы можно получить в тех случаях, когда два компонента — железо и цинк — присутствуют в лимитирующих количествах. Марганец оказывает отчетливое подавляющее действие: 3 мкг Mn^{2+} на 1 л среды уже снижают выход кислоты (между тем при использовании очищенной продажной

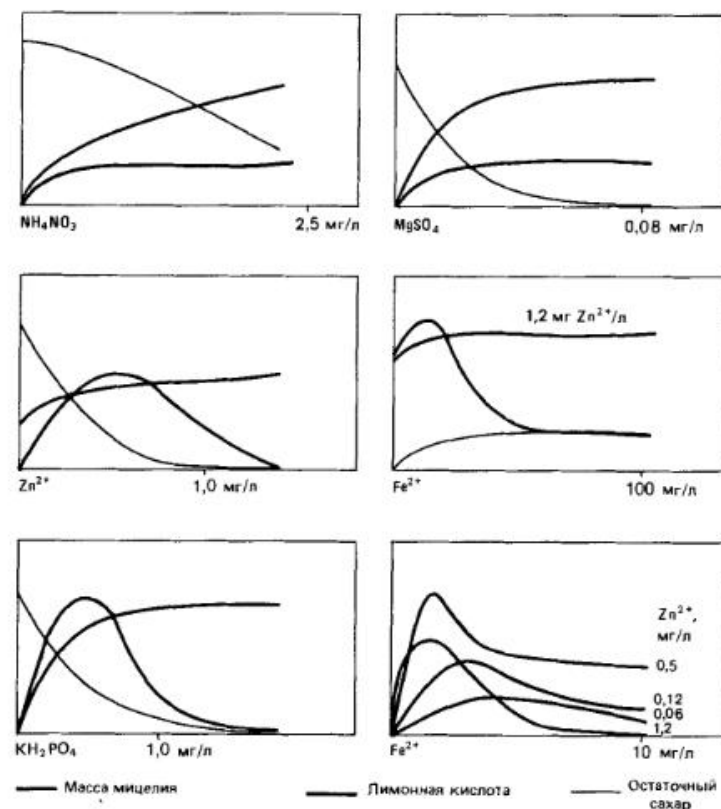


Рис. 10.1. Зависимость роста гриба *Aspergillus niger* и образования им лимонной кислоты от состава питательной среды. Полная среда содержит следующие компоненты (в г/л): глюкоза — 140; азот — 1,05; KH_2PO_4 — 2,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; железо — 0,01; цинк — 0,0025; pH 3,8. (Shu P., Johnson M.J., J. Bacteriol., 56 [1948], 577.)

глюкозы на каждый литр среды вместе с 140 г этого сахара вносится 10 мкг Mn^{2+} !).

Повышенное выделение лимонной кислоты при недостатке железа объясняется скорее всего тем, что железо выступает в роли кофактора аконитазы, медь же действует по отношению к нему как антагонист. На этом основан новый технический прием, повышающий выход нужного продукта: даже в присутствии небольших количеств ионов железа в растворе мелассы (10 мг на 1 л) можно получить максимальный выход лимонной кислоты, добавив к среде избыток ионов меди (150 мг на 1 л).

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

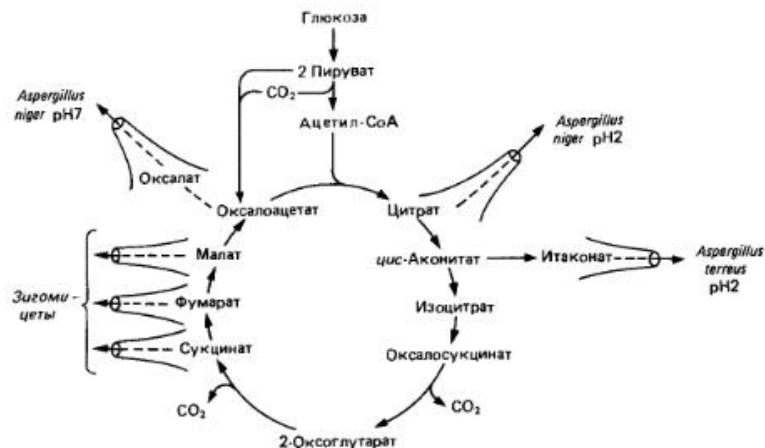
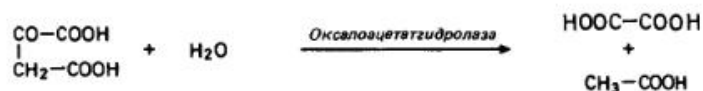


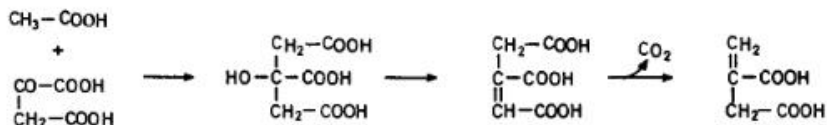
Рис. 10.2. Пути образования органических кислот у грибов.

Химизм образования кислот у грибов. Не подлежит сомнению, что в образовании различных кислот из глюкозы участвуют реакции цикла трикарбоновых кислот («цикла лимонной кислоты»). Есть основания предполагать, что яблочная, фумаровая, янтарная и лимонная кислоты образуются так, как это описано для цикла трикарбоновых кислот, а затем непосредственно выделяются в среду (рис. 10.2).

Щавелевая кислота образуется в результате гидролиза щавелевоуксусной кислоты под действием оксалоацетатгидролазы:



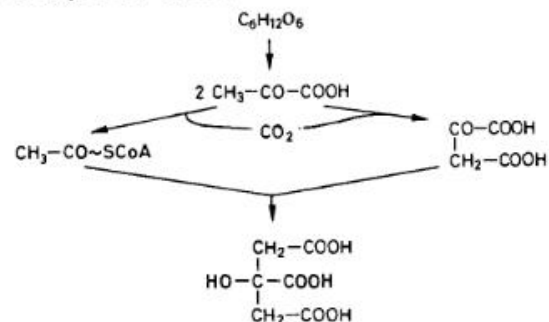
Предшественником **итаконовой кислоты** служит *цис*-аконитовая кислота. Во время декарбоксилирования происходит перемещение электронов в углеродном скелете, и при этом двойная связь переходит из положения 2,3 в положение 3,4:



Цикл трикарбоновых кислот выполняет в первую очередь катаболическую функцию. Однако наряду с этим он служит центральным «распределителем», поставляющим предшественники для синтеза многих клеточных компонентов. Если на каком-либо участке промежуточные продукты удаляются из цикла, то на долю других реакций выпадает задача обеспечить цикл оксалоацетатом (щавелевоуксусной кислотой). Мы

уже упоминали две анаплеротические реакции (см. рис. 7.7 и с. 251): 1) превращение изоцитрата через глиоксилат и ацетил-CoA в малат и сукцинат и 2) карбоксилирование пирувата с образованием оксалоацетата. Из этих двух реакций более важна вторая. Глиоксилатный цикл нужен в первую очередь для использования ацетата, высших жирных кислот и углеводов, а также других субстратов, при распаде которых в качестве промежуточного продукта образуется ацетил-CoA. Глюкоза часто подавляет синтез ключевых ферментов глиоксилатного цикла (изоцитратлиазы и малатсинтазы).

Если бы **лимонная кислота** синтезировалась только из ацетил-CoA, то 1 моль глюкозы давал бы лишь $\frac{2}{3}$ моля кислоты; это означает, что из 100 г глюкозы могло бы образоваться только 71,1 г лимонной кислоты. Между тем ее выход иногда достигает 75–87 г. Исследования показали, однако, что происходит фиксация больших количеств CO_2 . В опытах с $^{14}\text{CO}_2$ метка обнаруживалась в 6-м углеродном атоме лимонной кислоты. Превращение глюкозы в лимонную кислоту протекает по следующей схеме:



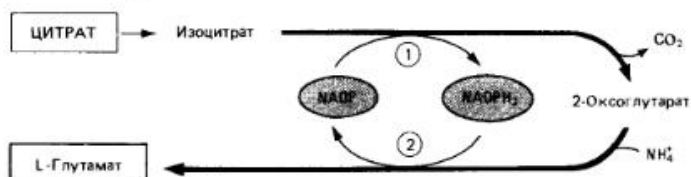
10.2.2 Образование аминокислот бактериями

В 1957 году Киносита открыл *Corynebacterium glutamicum* и тем самым положил начало новой эпохе в промышленном использовании процессов неполного окисления. Эту бактерию, выделяющую L-глутаминовую кислоту, удалось выявить с помощью простого способа отбора – *биоавтографического* метода. Большое количество почвенных бактерий переносили методом отпечатков (разд. 15.2.1) на различные питательные среды, оставляли на некоторое время для роста, а затем убивали УФ-облучением. После этого чашки заливали агаризованной средой, содержащей суспензию клеток штамма, нуждающегося в глутаминовой кислоте. Рост такой индикаторной бактерии указывал, какие из выросших ранее колоний выделяли глутаминовую кислоту.

L-Глутаминовая кислота образуется только в строго аэробных условиях. При выращивании культуры в ферментерах емкостью 50 м³ в среде, содержащей 10% глюкозы и мочевины в качестве источника азота, за 40 ч при 30°C нака-

пливается около 50 г L-глутамата на 1 л, что соответствует выходу 0,6 моля глутамата на 1 моль использованной глюкозы.

Катаболизм глюкозы идет, очевидно, по фруктозобисфосфатному пути и затем через цитрат и 2-оксоглутарат приводит к образованию L-глутамата. Щавелевоуксусную кислоту поставляет не глиоксилатный цикл, а процесс карбоксилирования пирувата, как и в случае образования лимонной кислоты у *Aspergillus niger*. При добавлении к среде $^{14}\text{CO}_2$ метка обнаруживается в дальнейшем почти исключительно в α -карбоксильной группе глутаминовой кислоты. Выделение этой аминокислоты зависит, очевидно, от накопления 20-оксоглутарата из-за отсутствия 2-оксоглутаратдегидрогеназы. Если в среде нет ионов аммония, выделяется 2-оксоглутаровая кислота. С целью промышленного получения глутаминовой кислоты в качестве субстрата вместо глюкозы в последнее время стали использовать ацетат.



Штаммы *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium divaricatum*, выделяющие L-глутаминовую кислоту, нуждаются в биотине. Концентрация биотина в среде имеет решающее значение для накопления этой кислоты. Оптимальное содержание биотина составляет 2,5 мкг на 1 л среды. При более низких концентрациях рост бактерий оказывается слишком слабым; более высокие концентрации биотина стимулируют рост, однако уменьшают выход глутаминовой кислоты (рис. 10.3).

Для получения других аминокислот можно использовать ауко-трофных мутантов *Corynebacterium glutamicum*. Мутанты, нуждающиеся в гомосерине, при подходящих условиях выделяют до 20 г L-лизина на 1 л среды. Другие мутанты *C. glutamicum*, а также представители семейств Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae служат продуцентами L-гомосерина, L-валина, L-изолейцина, L-триптофана, L-тирозина и других аминокислот.

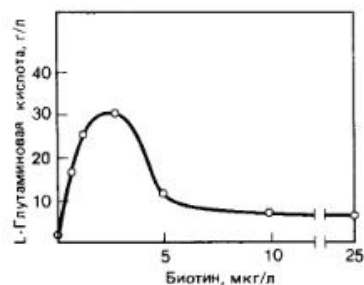


Рис. 10.3. Зависимость между образованием L-глутаминовой кислоты у *Corynebacterium glutamicum* и содержанием биотина в среде. (Huang H. T., Progr. indust. Microbiol., 5 [1964], 57.)

В Японии разработаны методы получения инозиновой и гуанидовой кислот с помощью микроорганизмов. Эти 5'-нуклеотиды используются как приправы для улучшения вкуса пищевых продуктов.

10.3 Трансформация веществ микроорганизмами

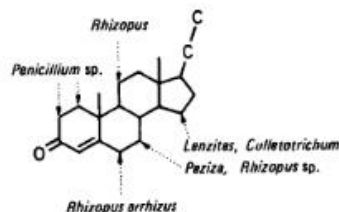
Высокая специфичность окислений, осуществляемых уксуснокислыми бактериями, весьма высокий выход продуктов и большое хозяйственное значение соответствующих процессов (например, производства сорбозы) — все это послужило причиной того, что начиная с 30-х годов микробиологи стали усиленно изучать каталитические свойства микроорганизмов, их способность перерабатывать естественные и чужеродные для них вещества.

Микроорганизмы осуществляют высокоспецифические процессы окисления, гидрирования, гидролиза, этерификации, конденсации, метилирования, декарбоксилирования, дегидратации, дезаминирования, аминирования и многие другие реакции. Эти биологические превращения к тому же стереоспецифичны. Осуществлять их способны актиномицеты и другие бактерии, а также низшие и высшие грибы.

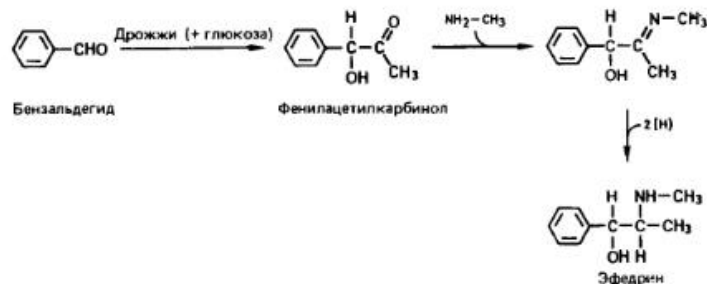
Особенно больших успехов удалось достичь при использовании микробов для синтеза стероидов. Химический синтез кортизона и гидрокортизона включает более 30 этапов и идет с малым выходом. С помощью микроорганизмов этот процесс удается свести к 13 этапам. Один из самых трудных этапов такого синтеза — введение гидроксильной группы в положение 11 стероидного скелета. Этот этап осуществляют низшие грибы (*Rhizopus arrhizus*, *Curvularia lunata*, *Cunninghamella blakesleeana*), а также *Streptomyces fradiae*. Классическим примером специфического окисления может служить превращение вещества S Рейхштейна в гидрокортизон:



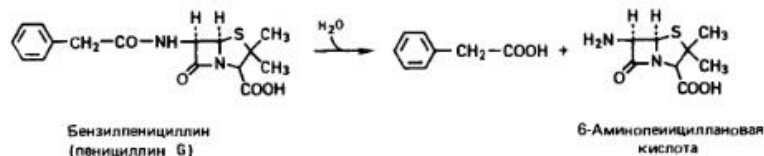
Наряду с такими окислениями многие грибы, обладающие стереоспецифичными оксигеназами, осуществляют гидрокселирование почти во всех местах стероидной молекулы. Другие микробные ферментативные воздействия заключаются в гидрировании гидроксильных групп спиртов, введении двойных связей, восстановлении кето- и оксо- групп и т. д.



Примером реакции присоединения может служить образование фенилацетилкарбинола – важного промежуточного продукта при синтезе эфедрина. Бензальдегид, добавленный в бродящую культуру дрожжей, очевидно, ацетируется ими подобно тому, как это происходит при образовании ацетона, причем «активный ацетальдегид» (см. рис. 7.6 [2]) переносится на бензальдегид. Процессы, следующие за образованием фенилацетилкарбинола, представляют собой чисто химические реакции.



Примером направленного ферментативного расщепления вещества с помощью микроорганизмов служит производство 6-аминопенициллановой кислоты. Некоторые бактерии и грибы, содержащие специфические ацилазы, расщепляют природные пенициллины с образованием 6-аминопенициллановой кислоты, которая в свою очередь может использоваться как исходное вещество для получения полусинтетических пенициллинов.



10.4 Образование вторичных метаболитов

С открытием пенициллина и других антибиотиков возникла новая обширная область промышленной микробиологии. Бактерии и грибы син-

тезируют множество веществ, которые по аналогии с подобного рода веществами растительного происхождения принято называть *вторичными метаболитами*. Многие из этих веществ играют важную роль как лечебные средства, стимулирующие препараты, добавки к кормам и т. п. В качестве продуцентов вторичных метаболитов микроорганизмы приобрели огромное экономическое значение. Открытие и исследование антибиотиков, а также получение новых полусинтетических антибиотиков оказало неоценимые услуги медицине. Мы еще не в состоянии предвидеть все возможности, которые откроются перед нами в будущем в связи с новыми исследованиями в этой области, и с новыми применениями вторичных метаболитов, синтезируемых микроорганизмами. Получение и отбор мутантов (с учетом регуляторных механизмов) позволят значительно расширить использование микробных синтезов.

10.4.1 Образование антибиотиков

Уже в прошлом веке было известно, что между различными микроорганизмами могут существовать как симбиотические, так и антагонистические взаимоотношения. Толчком к выяснению материальной основы антибиоза послужило наблюдение Флеминга, обнаружившего (1928), что колония гриба *Penicillium notatum* подавляла рост стафилококков. Выделяемое этим грибом вещество, которое диффундировало в агар, получило название пенициллина. С тех пор было выделено множество веществ с антибиотической активностью. **Антибиотики** – это вещества биологического происхождения, способные даже в низких концентрациях подавлять рост микроорганизмов. Различают вещества, подавляющие рост микробов (бактериостатические, фунгистатические) и убивающие их (бактерицидные, фунгицидные и т. д.).

Продуценты антибиотиков. К синтезу антибиотиков способны главным образом грибы из группы Aspergillales, актиномицеты и некоторые другие бактерии. На первом месте по химическому многообразию синтезируемых веществ стоят стрептомицеты. К настоящему времени подробно охарактеризовано более 2000 антибиотиков, однако в качестве химиотерапевтических средств применяется всего лишь около полусотни. Число описанных случаев антибиотических взаимодействий гораздо больше, но многие группы микроорганизмов, в том числе не поддающиеся культивированию или с трудом культивируемые бактерии и низшие грибы, в этом смысле еще недостаточно изучены.

Значение антибиотиков для образующих их организмов. Вопрос о значении антибиотиков для их продуцентов в условиях их естественного обитания – в почве – остается неясным. К образованию антибиотиков ведут специальные биохимические пути, относящиеся к вторичному метаболизму. Эти пути и обеспечивающие их ферменты не являются необходимыми для роста и выживания клеток. Генетический аппарат, который нужен для синтеза антибиотиков, для организма в случае их бесполезности был бы балластом, и организм освободился бы от него в процес-

се эволюции путем соответствующих делений. Поскольку в природе, очевидно, сохраняется лишь то, что целесообразно, нужно видеть в антибиотиках вещества, обеспечивающие их продуцентам селективное преимущество и в естественных условиях, т.е. в почве (например, преимущество в конкуренции за один и тот же субстрат). Однако такие антагонистические взаимоотношения в почве трудно обнаружить, поскольку антибиотики образуются в очень малых количествах; к тому же они обычно подавляют и рост самих продуцентов.

Постепенно утверждается представление, согласно которому в процессе эволюции может сохраняться и ненужный на первый взгляд генетический материал—даже в том случае, если в изученных до сих пор экспериментальных условиях он оказывается для организма балластом. Очевидно, природа более консервативна, чем это предполагалось на заре эры молекулярной биологии. В настоящее время антибиотики, а также другие вторичные метаболиты, прямую пользу которых для синтезирующих их клеток усмотреть трудно, причисляют, образно выражаясь, к «стружкам» обмена веществ или же к продуктам, возникшим на «игровой площадке» метаболизма. Этот пример ясно показывает, что изучение вторичного метаболизма бактерий, грибов и растений—одно из перспективных направлений в исследовании путей органической эволюции.

Методы выявления антибиотиков. Первые антибиотики были обнаружены случайно, по образованию зон подавления роста. В чашках с питательным агаром, густо засеянном тест-организмом (индикаторными бактериями), вокруг колоний гриба или стрептомицета рост отсутствовал: антибиотик, диффундирующий из колонии в агар, вызывал образование прозрачных участков в сплошном бактериальном газоне (рис. 10.4). Видами-индикаторами (тест-объектами) в таких опытах служат типичные представители различных групп микроорганизмов. Для качественного испытания продуцента антибиотика достаточно посеять его в середину чашки с питательным агаром, а индикаторные бактерии—в виде радиальных штрихов (*штрих-тест*, рис. 10.5). После инкубации по степени торможения роста различных индикаторных организмов судят о спектре действия антибиотика. Антибиотики различаются по действию на грам-положительные и грам-отрицательные бактерии, на дрожжи, дерматофиты и другие микроорганизмы.

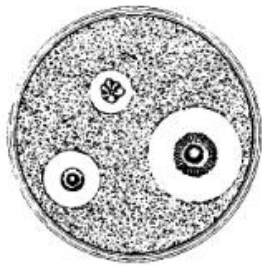


Рис. 10.4. Выделение антибиотиков бактериями или грибами можно обнаружить по образованию зон подавления роста индикаторных бактерий (*Staphylococcus aureus*), равномерно рассеянных на агаре.



Рис. 10.5. Определение спектра действия трех антибиотиков с помощью штрихового теста. 1—*Staphylococcus aureus*; 2—*Streptococcus*; 3—*Escherichia coli*; 4—*Pseudomonas aeruginosa*; 5—*Candida albicans*; 6—*Trichophyton rubrum*. В центр чашки Петри на агар с пептоном и гидролизатом казеина помещают диск из фильтровальной бумаги, пропитанный раствором испытуемого антибиотика (количество антибиотика ~10 мкг). Суспензии тест-организмов наносят платиновой петлей в виде радиальных штрихов (от одного до шести). В зоне диффузии антибиотика некоторые микроорганизмы не растут. (Wallhäusser K. H., Schmidt H., Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. Stuttgart: Thieme, 1967.)

Большинство антибиотиков было открыто в процессе предварительного отбора (скрининга). На рис. 10.6 представлена вся последовательность работы—от получения суспензии почвенной пробы до опыта на животных.

Количественное определение. Для количественной оценки действия антибиотика пользуются методом диффузии в агар (рис. 10.7), методом последовательных разведений и некоторыми другими методами. Для проведения теста с диффузией чашки заполняют до определенной высоты агаризованной средой, содержащей суспензию тест-организма. Затем в чашки вносят испытуемые растворы антибиотика. Их помещают в лунки, либо в стеклянный или металлический цилиндр, или же накладывают на агар пропитанные антибиотиком диски из фильтровальной бумаги. При положительной реакции во всех случаях после инкубации становится заметной зона подавления роста тест-организма. Диаметр этой зоны при соблюдении постоянных условий опыта (состав питательной среды, толщина слоя агара, плотность посева, время инкубации, температура и т.д.) пропорционален логарифму концентрации антибиотика (рис. 10.7).

При использовании метода последовательных разведений готовят серию разведений антибиотика в отношении 1:2 в питательном растворе, засеянном тест-организмом, и после инкубации определяют ту минимальную концентрацию антибиотика, при которой не наблюдается роста (*минимальную бактериостатическую концентрацию*).

Для установления синергического и антагонистического действия разных веществ, а также для исследования действия антибиотиков на другие организмы (на простейших, червей, водоросли, культуры клеток, вирусы) были разработаны специальные методы.

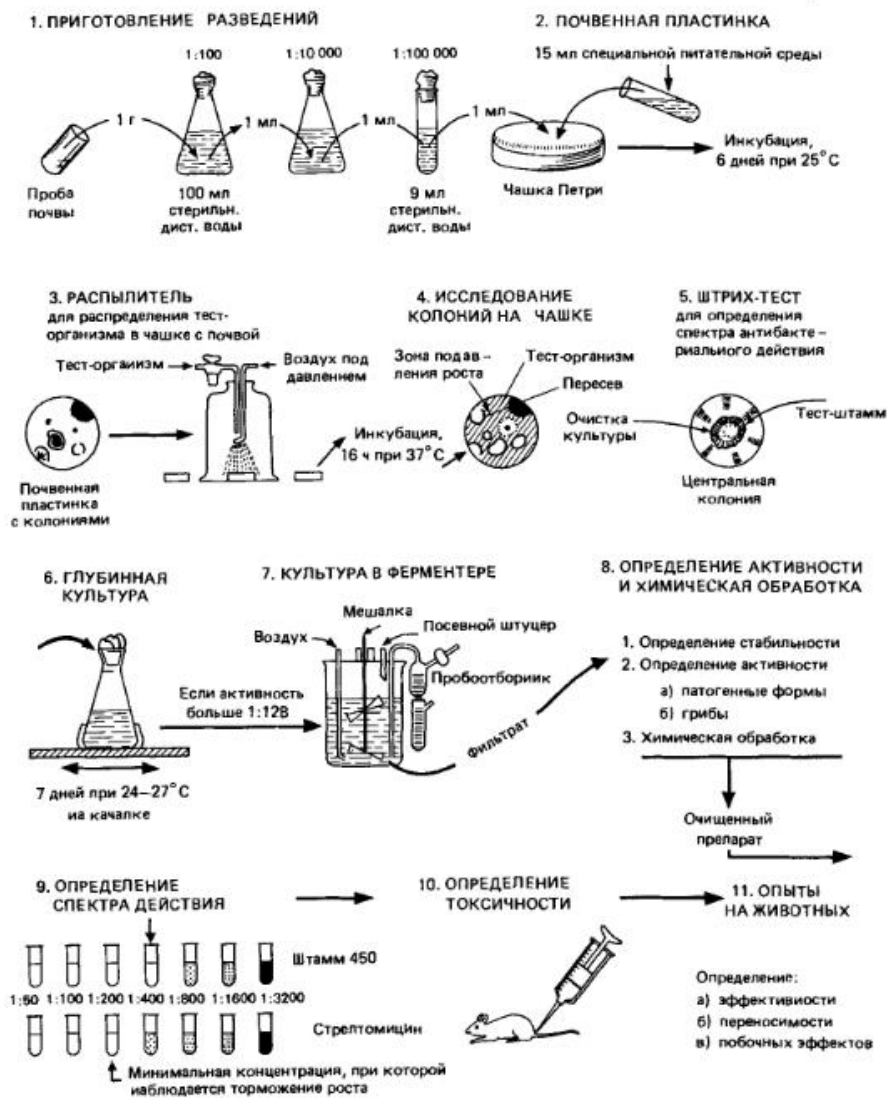
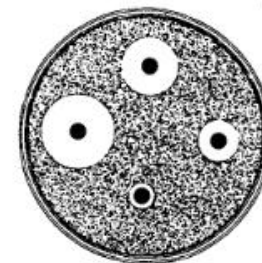


Рис. 10.6. План работы по отбору антибиотиков. (Wallhäusser K. H., Schmidt H., Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie. Stuttgart: Thieme, 1976.)

Рис. 10.7. Количественное определение антибиотика методом диффузии в чашке. Диски из фильтровальной бумаги, помещенные на поверхность засеянной агаризованной среды, содержат различные количества антибиотика. Диаметр зоны подавления роста тест-организма пропорционален концентрации антибиотика. (Zähner H., Biologie der Antibiotica. Berlin: Springer, 1965.)



Важнейшие антибиотики, применяемые в медицине. Первое место среди них все еще принадлежит пенициллину, который синтезируют *Penicillium notatum*, *P. chrysogenum* и некоторые другие грибы; удалось также получить полусинтетические пенициллины (путем расщепления природных пенициллинов до 6-аминопенициллановой кислоты, к которой затем химическим путем присоединяют различные боковые группы). О механизме действия пенициллина на бактерии уже говорилось ранее (разд. 2.2.3). Для человека пенициллин почти не токсичен и лишь в редких случаях вызывает побочные аллергические реакции. Многие бактерии образуют пенициллиназу, которая расщепляет β-лактамовое кольцо и инактивирует пенициллин. Воздействуя на 6-аминопенициллановую кислоту хлорангидридами кислот, можно получать сотни пенициллинов (рис. 10.8). Многие полусинтетические пенициллины не расщепляются пенициллиназой и ввиду их устойчивости к действию кислот могут вводиться перорально.

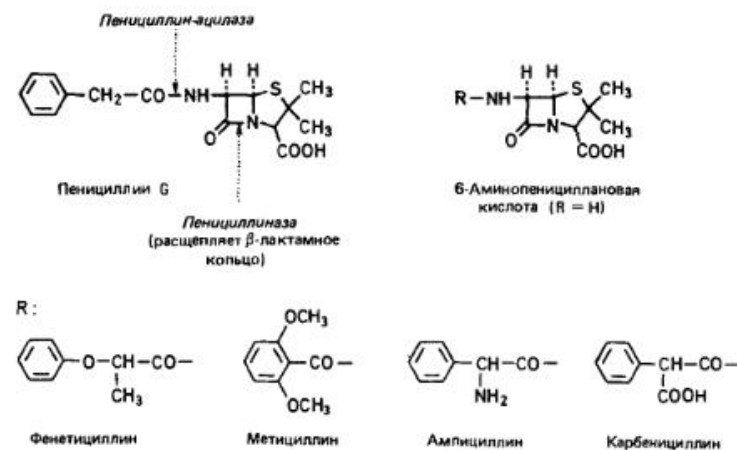


Рис. 10.8. Действие бактериальных ферментов—пенициллиназы и пенициллин-ацилазы—на пенициллин G. Замещая R в 6-аминопенициллановой кислоте различными радикалами, можно получить такие полусинтетические пенициллины, как фенетициллин, метициллин, ампициллин и карбенициллин.

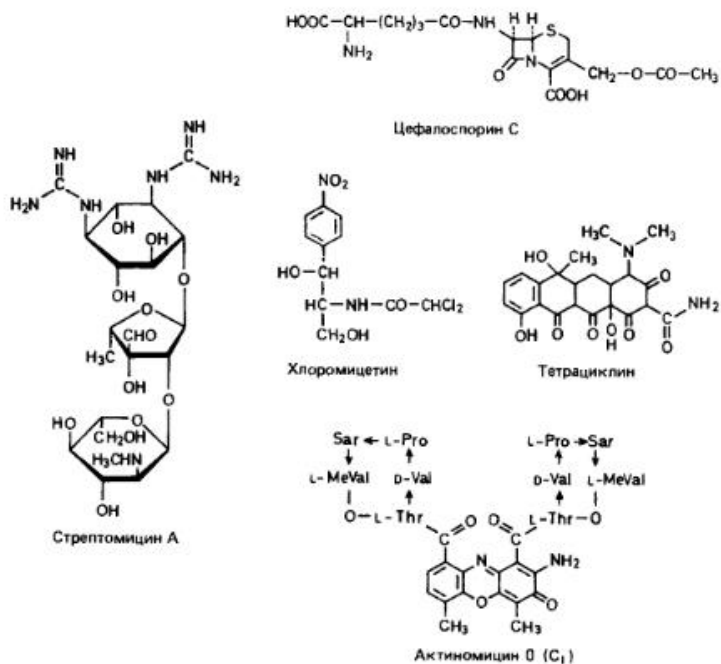


Рис. 10.9. Структурные формулы цефалоспорина С, стрептомицина А, хлормицетина (хлорамфеникола), тетрациклина и актиномицина D (актиномицина C_1).

Цефалоспорины — продукты одного из видов гриба *Cephalosporium*. Цефалоспорин С имеет β -лактамовое кольцо и по своей структуре близок к пенициллину (рис. 10.9). Отщепляя боковую цепь и затем присоединяя к образовавшейся 7-аминоцефалоспоровой кислоте другие боковые группы, можно получать полусинтетические цефалоспорины (цефалотин, цефалоридин), которые по своему действию сходны с производными пенициллина.

Стрептомицин был впервые выделен из культуры *Streptomyces griseus*, однако его синтезируют и некоторые другие виды *Streptomyces*. Молекула стрептомицина состоит из трех частей: N-метил-L-2-глюкозамина, метилпентозы и дигуанидинзамещенного инозитола (рис. 10.9). Успех применения стрептомицина объясняется его действием на ряд кислотоустойчивых и грам-отрицательных бактерий, нечувствительных к пенициллину. Однако стрептомицин вызывает у больных резко выраженные аллергические реакции. Этот антибиотик применяется также в ветеринарии и для борьбы с болезнями растений.

Хлормицетин (хлорамфеникол) был впервые обнаружен в культурах *Streptomyces venezuelae*, но его можно получить и синтетическим путем (рис. 10.9). Он отличается исключительной стабильностью и действует

на многие грам-отрицательные бактерии, включая спирохеты, риккетсии и актиномицеты, а также на крупные вирусы.

Тетрациклины тоже представляют собой метаболиты различных стрептомицетов (в том числе *Streptomyces aureofaciens*). Химически они очень близки между собой и имеют в основе структуры нафтаген (рис. 10.9). Наиболее известны хлортетрациклин (ауреомицин), окситетрациклин (террамицин) и тетрациклин. Тетрациклины отличаются широким спектром действия и хорошей переносимостью.

К **макролидам** относятся антибиотики разного происхождения с относительно большой молекулярной массой, для которых характерно макроциклическое лактоновое кольцо (эритромицин, карбомицин А, пикромидин и др.).

Актиномицин был выделен в 1940 г. (первым среди антибиотиков, образуемых стрептомицетами). Это смесь нескольких веществ; объединяет их только феноксазоновый хромофор. Роль заместителей играют различные полипептидные цепочки (рис. 10.9).

Наконец, следует упомянуть еще группу **полипептидных** антибиотиков (грамидин S, полимиксины, бацитрацин, ристоцетин и др.). В молекуле полимиксина В к кольцу из семи аминокислот присоединена с помощью пептидной связи боковая цепь (рис. 10.10). Полипептидные антибиотики обладают высоким сродством к плазматической мембране, поэтому они одинаково токсичны как для бактерий, так и для эукариот и не применяются в клинике. Благодаря своей способности избирательно транспортировать ионы через мембрану полипептидные антибиотики могут применяться в исследовательских целях в качестве **ионофоров** (см. разд. 7.7). **Валиномицин**, например, облегчает транспорт ионов калия через мембрану. В состав молекулы этого антибиотика входит кольцо из 12 звеньев (среди них валин, 2-гидроксизовалерат и лактат). Структура этого кольца такова, что ион калия как раз помещается во внутреннем пространстве молекулы. Комплекс валиномицина с K^+ благодаря присутствию валина и валерата липофилен и легко

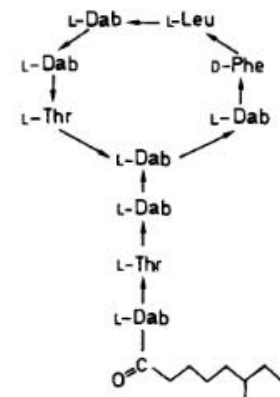


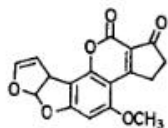
Рис. 10.10. Полимиксин В. L-Dab — 2,4-диаминомасляная кислота; L-leu — L-лейцин; D-Phe — фенилаланин; L-Thr — треонин; алифатическая боковая цепь — 6-метилоктановая кислота.

транспортируется через липидный слой мембраны. Поэтому добавление валиномицина к клеточной суспензии ведет к потере клетками ионов калия.

В фармацевтической промышленности для производства антибиотиков используются сейчас не исходные штаммы микроорганизмов, а более продуктивные мутанты. Штамм гриба, открытый Флемингом, синтезировал лишь около 3 мкг пенициллина на 1 мл среды. Современные штаммы-продуценты дают минимум в 2000 раз больше. Такое повышение выхода антибиотиков – результат мутаций и отбора более активных штаммов, улучшения состава питательных сред и оптимизации условий производства. Пути биосинтеза многих антибиотиков уже выяснены, и задача состоит сейчас в том, чтобы еще больше повысить продуктивность микроорганизмов путем получения и более целенаправленного отбора мутантов.

10.4.2 Микотоксины

Микотоксинами называют вторичные метаболиты определенных видов грибов. В широком понимании к ним можно отнести также и образующиеся грибами антибиотики. В узком смысле, однако, под микотоксинами понимают только такие продукты жизнедеятельности грибов, которые токсичны для высших животных и человека. Продуцентом микотоксина является, например, уже упоминавшийся возбудитель спорыньи *Claviceps purpurea*. Недавно микотоксины вновь привлекли к себе пристальное внимание, после того как был описан случай гибели тысяч индюшат от корма, содержавшего афлатоксины. **Афлатоксины** (производные кумарина) синтезируются отдельными штаммами *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. oryzae* и некоторыми другими видами грибов. Они могут присутствовать в разных заплесневелых продуктах (в арахисе, зерне, плодах масличных растений, в корме животных). Афлатоксины обладают канцерогенными свойствами.



Афлатоксин В₁

К микотоксинам причисляют также токсины ядовитых видов базидиомицетов – *Amanita phalloides* (аманитатоксин), *A. pantherina*, *A. muscaria*, *Inocybe patouillardii* (грибной атропин и мускарин).

10.4.3 Другие вторичные метаболиты

Среди **витаминов**, образуемых микроорганизмами, заслуживают упоминания рибофлавин и витамин В₁₂. Рибофлавин выделяют главным образом аскомицеты (*Ashbya gossypii* и *Eremothecium ashbyii*); однако

дрожжи (*Candida*) и бактерии (*Clostridium*) тоже синтезируют в больших количествах флавины. Способность к образованию витамина В₁₂ присуща бактериям, в метаболизме которых важную роль играют корриноиды (*Propionibacterium*, *Clostridium*). Этот же витамин образуют и стрептомицеты. Из мицелия зигомицетов (*Blakesleea trispora* и *Choanephora circinans*) получают каротиноиды, используемые как добавки к кормам для животных.

Что касается **алкалоидов**, то одни только алкалоиды спорыньи добываются из микроорганизма. Хотя в настоящее время склероции спорыньи (*Secale cornutum*) получают главным образом путем искусственного заражения ржи возбудителем спорыньи (*Claviceps purpurea*), глубинная культура определенных штаммов *Claviceps paspali* тоже начинает вызывать интерес с экономической точки зрения. Алкалоиды спорыньи, производные лизергиновой кислоты (эрготамин, эрготоксин), применяются при лечении сосудистых заболеваний и мигрени, а также известны как галлюциногены.

Принципы выращивания бактерий, дрожжей и других грибов все шире используются и при культивировании животных и растительных клеток. Разработаны методы выращивания растительных клеток на синтетических средах в ферментерах емкостью в тысячи литров. В таких условиях растительные клетки образуют ферменты и вторичные метаболиты в концентрациях, которые могут быть на 1–2 порядка выше, чем в интактных клетках. Неожиданным оказалось то, что в подобных культурах могут накапливаться и такие вещества, которые растение синтезирует лишь в малых количествах или же не синтезирует вовсе. Вероятно, со временем можно будет получать алкалоиды, гликозиды, стероиды, органические кислоты и другие вторичные метаболиты с помощью растительных клеток.

10.4.4 Другие продукты микробного происхождения

С помощью микроорганизмов можно получать разнообразные полисахариды, ферменты, антигены и яды. Продукты микробного происхождения дополняют вещества, получаемые классическим способом, а частично и заменяют их.

Для повышения вязкости жидкостей уже с давних времен применяются растительные слизи. В настоящее время их все больше вытесняют многочисленные бактериальные **экзополисахариды** (разд. 2.2.4) (табл. 10.1). В качестве добавок к мороженому, пудингам и кремам используют алгинаты. Они же нашли применение и как гидрофильные покрытия для поддержания корней растений во влажном состоянии. Полисахариды, добываемые из морских водорослей, постепенно вытесняются сходными продуктами, получаемыми с помощью *Azotobacter* или *Pseudomonas*. Разностороннее применение нашли слизи, образуемые фитопатогенной бактерией *Xanthomonas campestris* – ксантаны. Их структурную основу составляют цепи из молекул глюкозы, образованные

Таблица 10.1. Экзополисахариды, синтезируемые микроорганизмами, и их применение

Продукт	Микроорганизмы-продуценты	Применение
Декстран (α -1,6-глюкан)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acetobacter</i> , стрептококки	Заменители плазмы крови; адсорбенты в биохимической промышленности
Алгинат (соединенные с помощью 1,4-гликозидных связей маннуроновые и гулуруновые кислоты)	<i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Добавки к мороженому; быстрорастворимая смесь для приготовления пудингов, кремов; средства для пропитки тканей и бумаги; гидрофильная пленка для корней растений, новогодних елок; пленки для закрытия ран
Ксантан (целлюлоза с трисахаридными боковыми цепями)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Добавки к напиткам и плавленым сырам; быстрорастворимая смесь для приготовления пудингов, кремов; стабилизатор эмульсий; «французская приправа» ¹
Пуллулан (остатки мальтотриозы, соединенные с помощью β -1,6-гликозидных связей)	<i>Aureobasidium</i> (синонимы: <i>Pullularia</i> , <i>Dematium pullulans</i>)	Покрывания для пищевых продуктов
Курдлан (β -1,3-глюкан)	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>typhogenes</i>	Желирующее средство для пудингов (низкокалорийно, так как не подвергается расщеплению в кишечнике)

¹ Смесь прованского масла с уксусом и горчицей.—Прим. перев.

(как и в целлюлозе) с помощью β -1,4-гликозидных связей и несущие боковые цепочки из трисахаридов. Ксантаны применяются как наполнители в пищевой и косметической промышленности, как эмульгаторы для типографских красок и даже в качестве добавок к промывным водам в месторождениях нефти. Для приготовления пудингов и низкокалорийных супов используют курдланы, которые не подвергаются расщеплению в кишечнике человека. В главе 2.2.4 уже говорилось о применении декстрана как заменителя плазмы крови, а также как основы для адсорбентов, известных под коммерческим названием «сефадекс».

На смену ферментным препаратам, получаемым из животных и растений, тоже постепенно приходят микробные ферменты (табл. 10.2). Наряду с пепсином, трипсином и папаином применяют протеазы, выделяемые аэробными спорообразующими бактериями и грибами. Вместо применявшегося ранее для створаживания молока сычужного фермента, который получали из желудков телят, в настоящее время используют

Таблица 10.2. Ферменты, синтезируемые микроорганизмами, и их применение

Ферменты (и катализируемые ими реакции)	Микроорганизмы-продуценты	Применение
Инвертаза (гидролиз сахарозы)	<i>Aspergillus oryzae</i> , дрожжи и другие грибы	Приготовление инвертированного сахара для кондитерских изделий
Протеазы (гидролиз белков)	<i>Bacillus subtilis</i> и другие бактерии, а также грибы	Добавки к моющим средствам; дубление
Пектинолитические ферменты (гидролиз пектина)	Грибы и <i>Erwinia</i>	Освещение фруктовых соков
Липазы (гидролиз липидов)	Грибы и <i>Pseudomonas</i>	Дубление; добавки к моющим средствам
Глюкозооксидаза (окисление глюкозы до глюконата)	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Gluconobacter oxidans</i>	Получение глюконовой кислоты
Гексозоизомеразы (изомеризация фруктозы)	<i>Streptomyces</i>	Получение фруктозы из глюкозы
Амилаза (гидролиз крахмала)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus spec.</i> , другие грибы	Приготовление сиропа из глюкозы; удаление аппретирующего крахмала
Целлюлазы (гидролиз целлюлозы)	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Penicillium</i>	Получение глюкозы из целлюлозы

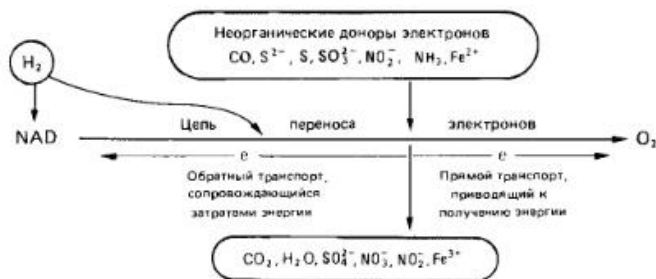
фермент реннин, выделяемый грибом *Mucor rouxii* и некоторыми другими грибами.

Для превращения крахмала в сахар с целью получения спирта уже давно не пользуются проросшим зерном; вместо этого к крахмалу добавляют амилазы грибов. Инвертированный сахар, используемый в кондитерских изделиях, получают из сахарозы с помощью инвертазы из *Aspergillus oryzae* и других грибов. Фруктозу, необходимую для производства искусственного меда и сиропов, получают путем превращения глюкозы при участии гексозоизомеразы, источником которой служат некоторые виды *Streptomyces* или *Lactobacillus brevis*. Идут поиски путей использования дешевой целлюлозы, получаемой из древесины и соломы, для производства этанола с помощью микробных целлюлаз (источники — *Trichoderma viride*, *Penicillium*). В последнее время интенсивно разрабатываются также методы получения многих других ферментов; для повышения их стабильности, а также удобства обращения с ними ферменты применяют в иммобилизованной форме, т. е. фиксируют на материале-носителе (целлюлозе, агарозе, стеклянных шариках и др.).

Для более углубленного изучения представленных здесь проблем можно рекомендовать учебные пособия по промышленной микробиологии или биотехнологии. Генная инженерия (техника молекулярного клонирования, разд. 15.3.6) открыла и в этой области новые возможности для биотехнологии.

11. Использование неорганических доноров водорода: аэробные хемолитотрофные бактерии

Многие группы почвенных и водных бактерий могут использовать в качестве доноров водорода или электронов неорганические соединения или ионы (ионы аммония, нитрита, сульфида, тиосульфата, сульфита и двухвалентного железа), а также элементарную серу, молекулярный водород и CO, т.е. способны получать в результате их окисления восстановительные эквиваленты и энергию для синтетических процессов. Получение энергии происходит, как правило, в результате дыхания с O₂ как конечным акцептором водорода. Лишь немногие из относящихся к этой группе бактерий способны расти за счет «анаэробного дыхания», используя в качестве акцепторов водорода нитрат, нитрит, закись азота и т.п. Такой образ жизни с использованием неорганического донора водорода называют **хемолитотрофным**.



Большинство бактерий с таким типом метаболизма используют CO₂ в качестве единственного или главного источника клеточного углерода. Они являются поэтому **автотрофами** (хемолитоавтотрофами). Почти все аэробные хемолитоавтотрофные бактерии, до сих пор изученные в этом отношении, ассимилируют углерод CO₂ через рибулозобисфосфатный цикл¹. Механизм такого типа фиксации CO₂ будет рассмотрен в конце этой главы (разд. 11.5).

Для некоторых хемолитотрофных бактерий такой образ жизни является облигатным, другие же – факультативные хемолитотрофы, т.е.

¹ Исключение составляет аэробная водородокисляющая бактерия *Hydrogenobacter thermophilus*. – Прим. ред.

способны также и к хемоорганогетеротрофному росту. Многие хемолитоавтотрофные бактерии благодаря своей высокой специализации занимают монопольное положение. Окисление аммиака, нитрита и неорганических соединений серы в природе в первую очередь связано с деятельностью нитрифицирующих и сероокисляющих бактерий.

11.1 Окисление аммиака и нитрита (нитрификация)

При аэробном или анаэробном разложении азотсодержащих органических веществ происходит выделение азота в форме аммиака. Давний опыт учит, что при компостировании навоза образуется **селитра**. Селитряные выцветы, появляющиеся на каменной облицовке навозных ям, в средние века использовали для приготовления пороха. Согласно старым руководствам, на селитряных заводах из смеси земли, известняка и азотсодержащих органических веществ закладывали специальные гряды. Эти гряды поливали мочой и кровью, следя за тем, чтобы они хорошо аэрировались. Аммиак, освобожденный при микробном разложении органического материала, диффундировал в верхний земляной покров и окислялся там под воздействием кислорода воздуха до нитрата. Этот покрывающий верхний слой земли служил исходным материалом для получения селитры; его вымачивали в воде, а полученный раствор затем выпаривали.

Превращение аммиака (аммония) в нитрат – **нитрификация** – как в почве, так и в воде осуществляется нитрифицирующими бактериями. Однако нет такой бактерии, которая бы прямо превращала аммиак в нитрат. В его окислении всегда участвуют две группы бактерий: одни окисляют аммиак, образуя нитрит, а другие окисляют нитрит в нитрат.

Наиболее известные виды нитрифицирующих бактерий – это *Nitrosomonas europaea* и *Nitrobacter winogradskyi* (табл. 11.1). Проведенные недавно исследования показали, что важнейшими нитрификаторами в почвах сельскохозяйственных угодий являются виды рода *Nitrosolobus*, а не *Nitrosomonas*, как считалось ранее. Обе группы родов строго специализированы в отношении приведенных в табл. 11.1 реакций. Бактерии, окисляющие аммиак, поставляют субстрат для бактерий, окисляющих нитрит. Поскольку высокие концентрации аммиака в ще-

Таблица 11.1. Нитрифицирующие бактерии

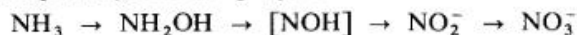
Бактерии, окисляющие аммиак (<i>Nitroso</i> -)	Бактерии, окисляющие нитрит (<i>Nitro</i> -)
$NH_4^+ + 1\frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O$	$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow NO_3^-$
<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
<i>Nitrosococcus oceanus</i>	<i>Nitrobacter agilis</i>
<i>Nitrospira briensis</i>	<i>Nitrospina gracilis</i>
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>

лочных почвах оказывают на *Nitrobacter* токсическое действие, *Nitrosomonas*, используя аммиак и образуя кислоту (т. е. переводя катион в анион), тем самым улучшает и условия существования для *Nitrobacter*.

Нитрификаторы – это грам-отрицательные бактерии, принадлежащие к семейству Nitrobacteraceae. У *Nitrosomonas europaea* клетки овальные с полярно расположенными жгутиками. В морях за окисление аммиака ответствен, по-видимому, *Nitrosococcus oceanus* (рис. 2.22). Нитрифицирующие бактерии можно выращивать на чисто минеральных средах, однако в таких условиях они растут медленно (время генерации 10–20 ч). До последнего времени нитрификаторов считали облигатными хемолитоавтотрофами, поскольку они не используют добавляемые к питательным средам органические субстраты. Однако сейчас на этот счет высказывается все больше сомнений, и вопрос детально изучается.

Оказалось, например, что *Nitrobacter winogradskyi* способен использовать добавленный к минеральной среде ацетат для синтеза некоторых веществ клетки (белков, поли-β-гидроксимасляной кислоты).

Этапы окисления аммиака. При окислении, по-видимому, образуется ряд промежуточных продуктов:



Первый этап окисления является эндергонической реакцией, которую катализирует монооксигеназа. Атом кислорода в NH_2OH доставляется молекулярным кислородом. Второй этап идет при участии гидроксиламин-оксидоредуктазы. При окислении нитрита электроны переносятся на цитохром a_1 . Только стадии окисления гидроксилamina в нитрит и нитрита в нитрат являются энергетически полезными.

Роль процессов нитрификации в почве. В хорошо аэрируемой почве ионы NH_4^+ , освобождающиеся при минерализации азотсодержащих веществ, подвергаются быстрому окислению. Перевод катиона в анион ведет к подкислению почвы и тем самым к повышению растворимости минералов (солей калия, магния, кальция и фосфорной кислоты). Поэтому в нитрифицирующих микроорганизмах видели ранее важный фактор плодородия почв. Однако теперь эти представления изменились. Выяснилось, что ионы аммония задерживаются в почве гораздо лучше нитрата, особенно если они адсорбируются на глинистых минералах и более или менее прочно связываются с частицами гумуса; нитрат же легко вымывается. В связи с этим появилась тенденция к ограничению нитрификации в почвах сельскохозяйственных угодий. Ведутся поиски веществ, способных специфически подавлять рост нитрифицирующих бактерий и служить своего рода «стабилизаторами» почвенного азота [к таким веществам относится, например, 2-хлор-6-(трихлорметил)-пирдин].

Следует учесть, что рост и метаболизм автотрофных нитрифицирующих бактерий протекает оптимально лишь в области pH от 7 до 8. Диапазон pH, в котором происходит полная нитрификация от аммиака до нитрата, очень узок, поскольку и свободный аммиак (при высоких зна-

чениях pH), и азотная кислота (при низких значениях pH) оказывают токсическое действие на *Nitrobacter*. Известно, что концентрации свободного NH_3 и свободной HNO_2 зависят от pH среды.

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

Гетеротрофная нитрификация. Пока не установлено точно, действительно ли автотрофные нитрификаторы занимают монопольное положение в природе или же превращение аммиака в нитрат происходит также при участии гетеротрофных бактерий и грибов. В чистой культуре лишь некоторые штаммы *Arthrobacter* способны к образованию нитрита из азотсодержащих веществ. Некоторые грибы обладают способностью окислять аминный азот или аммиак до нитрата. Однако гетеротрофный процесс в отличие от автотрофной нитрификации не связан с ростом клеток и продукцией биомассы. Речь при этом идет, вероятно, о каком-то рода соокислении аммиака и органических субстратов. Кроме того, скорость нитрификации у гетеротрофных бактерий в 10^3 – 10^4 раз меньше, чем у автотрофных. Поэтому нельзя считать, что гетеротрофные нитрификаторы серьезно «подрывают» монопольное положение автотрофных нитрифицирующих организмов. Однако даже незначительная нитрификация, осуществляемая гетеротрофами, позволяет объяснить, например, тот факт, что и на кислых почвах (чайные плантации, хвойные леса), где у автотрофных нитрифицирующих микроорганизмов нет шансов выжить, все же происходит образование нитрата.

Обратный транспорт электронов и урожай клеток. Автотрофные бактерии, окисляющие аммиак, нитрит, соединения серы или железо, находятся в энергетическом отношении в крайне невыгодных условиях. Их субстраты обладают сильно положительным окислительно-восстановительным потенциалом. Нормальные потенциалы E'_0 составляют для $\text{NH}_4^+/\text{NH}_2\text{OH} + 899$ мВ, для $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^- + 420$ мВ, для $\text{NO}_2^-/\text{NH}_2\text{OH} + 66$ мВ, для $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} + 770$ мВ, в то время как для пары NAD/NADH_2 окислительно-восстановительный потенциал равен -320 мВ. Окисление названных выше неорганических субстратов не может быть прямо связано с восстановлением NAD. Однако NADH_2 необходим для восстановления CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле. Судя по некоторым экспериментальным данным, электроны, освобождающиеся при окислении упомянутых неорганических субстратов, поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома c или цитохрома a . Поскольку фосфорилирование при этом может происходить лишь на одном-единственном этапе окисления, выигрыш в энергии соответственно невелик. Часть этой энергии затрачивается на то, чтобы «оттеснить» электроны, поступающие на участок цитохромов, по дыхательной цепи назад, на уровень пиридиннуклеотидов, и восстановить последние. Та-

Таблица 11.2. Сравнение количеств первичного источника энергии, необходимых различным автотрофным и органотрофным микроорганизмам для образования 1 г сухой клеточной массы

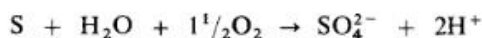
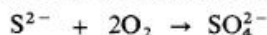
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	156 г Fe ²⁺	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	0,5 г H ₂
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	30 г S ₂ O ₃ ²⁻	<i>Escherichia coli</i>	2 г глюкозы
<i>Nitrosomonas</i>	30 г NH ₃	Дрожжи	1 г нефти

ким образом, обратный перенос электронов является для перечисленных выше бактерий обязательным механизмом, необходимым для получения восстановительных эквивалентов, используемых затем в процессах синтеза (см. стр. 246).

Низкий выход клеток у бактерий, окисляющих упомянутые выше неорганические субстраты, обусловлен тем, что они получают таким способом мало энергии. Для синтеза одного грамма сухой клеточной массы им приходится использовать гораздо большие количества различных веществ, чем другим организмам (табл. 11.2). Кроме того, большинство названных бактерий катализирует так называемое «холодное окисление», т.е. окисление субстратов без одновременного синтеза клеточного вещества. Не удивительно поэтому, что различные превращения в почве и воде осуществляются сравнительно малым количеством бактерий.

11.2 Окисление восстановленных соединений серы

Способностью получать энергию в результате окисления восстановленных соединений серы обладают грам-отрицательные бактерии с полярно расположенными жгутиками, объединяемые в род *Thiobacillus*. Недавно была открыта спиралла с полярными жгутиками (*Thiomicrospira*), а также неподвижная термофильная бактерия *Sulfolobus* (табл. 11.3). Большинство тиобацилл может окислять различные соединения серы, образуя в качестве конечного продукта сульфат:



Многие тиобациллы (*T. thiooxidans*, *T. thioparus*, *T. denitrificans*)—облигатные хемолитоавтотрофы, фиксирующие CO₂. Другие (*T. novellus*, *T. intermedius*) способны также использовать в качестве источников энергии и углерода органические соединения.

T. thiooxidans образует большие количества серной кислоты и хорошо переносит низкие значения pH среды (клетки не теряют жизнеспособности даже в 1 н. растворе серной кислоты). Такое подкисление среды во многих случаях полезно для нас. Чтобы уменьшить щелоч-

Таблица 11.3. Бактерии, окисляющие серу и ее соединения

Вид	Пределы pH для роста	Доноры электронов	Автотрофия: облигатная (о) или факультативная (ф)
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	2–5	S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S	о
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	2–6	Fe ²⁺ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S	ф
<i>Thiobacillus thioparus</i>	6–8	CNS ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S	о
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	6–8	CNS ⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S	о
<i>Thiobacillus intermedius</i>	2–6	S ₂ O ₃ ²⁻ , S, глутамат	ф
<i>Thiobacillus novellus</i>	6–8	S ₂ O ₃ ²⁻ , S, глутамат	ф
<i>Thiomicrospira pelophila</i>	6–8	S ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S	о
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	2–3	S, глутамат, пептон	ф

ность, в известковые почвы вносят элементарную серу; в результате образуемая тиобациллами серная кислота переводит карбонат кальция в более растворимый сульфат кальция, который вымывается из почвы. Аналогичным путем можно бороться с ацидофобным возбудителем парши картофеля.

В то время как названные выше тиобациллы живут в аэробных условиях, *T. denitrificans* наряду с O₂ может использовать в качестве акцептора водорода также и нитрат (анаэробное дыхание). Эта бактерия денитрифицирует нитрат, но не способна к ассимиляционному восстановлению его до аммиака. Поэтому в качестве источника азота ей необходимы соли аммония.

Sulfolobus acidocaldarius и *Caldariella acidophila*¹ живут в экстремальных экосистемах. Места их обитания—горячие кислые источники, где окисляется главным образом сероводород магматического (вулканического) происхождения. *S. acidocaldarius*—это термофил, факультативный хемолитотроф, окисляющий элементарную серу до серной кислоты; он лучше всего растет при pH от 2 до 3 и при температурах от 70 до 75°C, однако сохраняет жизнеспособность и при 90°C.

Этапы окисления соединений серы. Трудность изучения отдельных стадий этого процесса связана с тем, что в водных растворах сероводород и сера окисляются и небиологическим путем, хотя и медленно. На рис. 11.1 представлены наиболее важные реакции. Желтая элементарная сера (серный цвет) представляет собой кольцо из восьми атомов (S₈); она плохо растворима в воде (0,176 мг/л).

Как полагают, электроны, освобождающиеся при окислении сульфита до сульфата, поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома *c*. По крайней мере некоторые тиобациллы (*Thiobacillus thioparus*, *T. denitrificans*) способны использовать выделяющуюся при этом окислении энергию для фосфорилирования на уровне субстрата (рис. 11.1, 5 и 6).

¹ *Caldariella* сейчас относят к роду *Sulfolobus*.—Прим. ред.

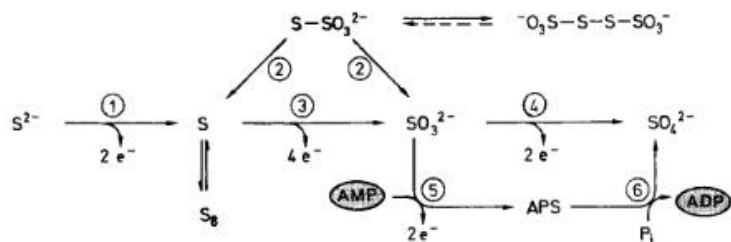
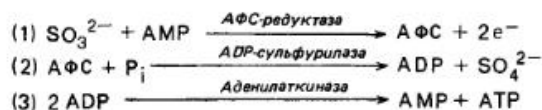


Рис. 11.1. Важнейшие этапы окисления серусодержащих соединений бактериями, окисляющими серу. Ферменты, участвующие в реакциях (цифры в кружках): 1 – сульфидоксидаза; 2 – фермент, расщепляющий тиосульфат (роданеза); 3 – фермент, окисляющий серу; 4 – сульфитоксидаза; 5 – АФС-редуктаза; 6 – ADP-сульфуриллаза (сульфат-аденилилтрансфераза).



[АФС – аденозин-5'-фосфосульфат]

Реакции (1) и (2) противоположны реакциям диссимиляционного восстановления сульфата (рис. 9.3).

Нитчатые и другие серобактерии. В местах, где в осадках стоячих и медленно текущих вод образуется H_2S , часто можно обнаружить на черной поверхности ила бесцветные нитчатые серобактерии *Beggiatoa*, *Thiothrix* и *Thioploca* (см. рис. 2.44 и 3.17), а также крупные одноклеточные формы *Achromatium oxaliferum* и *Thiovulum* (см. рис. 2.44). На *Beggiatoa* С.Н. Виноградский проводил свои эксперименты, которые легли в основу представления о хемолитоавтотрофии. Однако получить хотя бы одну из этих «классических серобактерий» в чистой культуре и подробно изучить их физиологические и биохимические особенности до сих пор не удалось¹. Неудача попыток выращивать их в чистой лабораторной культуре связана, очевидно, с особыми требованиями этих бактерий. Наряду с сероводородом им нужен молекулярный кислород, но они переносят его присутствие только в самых малых концентрациях (т.е. являются микроаэрофилами). Для создания таких оптимальных условий необходимы особые экспериментальные приемы и много терпения.

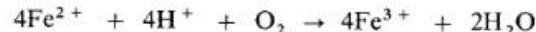
Сероводород как основа бесцветной экосистемы. Для жизни всех вышних гетеротрофных организмов необходима биомасса, создаваемая

¹ В последнее время некоторые виды этих микроорганизмов, в том числе *Beggiatoa*, выделены в виде чистых культур. По-видимому, для их роста необходимы органические вещества. – Прим. ред.

с помощью фотосинтеза. Однако несколько лет назад было найдено исключение из этого правила. На больших морских глубинах, в тех местах, где расходятся континенты, из морского дна бьют горячие источники с температурой воды около 350°C . В воде этих источников растворено много различных минеральных веществ, в том числе H_2S . Там, где такая вода приходит в соприкосновение с холодной, содержащей кислород морской водой, могут расти бактерии, окисляющие серу или сероводород. Они служат пищей для моллюсков, ракообразных и червей. Один из представителей погонофор – *Riftia pachyptila* – прекрасно приспособился к существованию в таких местах. У этого животного нет ни ротового, ни анального отверстия, зато оно обладает особым органом (трофосомой), в котором в качестве эндосимбионтов растут бактерии, окисляющие H_2S ; кровь снабжает этот орган сероводородом и кислородом. Таким образом, на больших морских глубинах, куда не проникает свет, в непосредственной близости от горячих источников существует экосистема, в которой продукция биомассы основана не на фотосинтезе, а на хемолитоавтотрофии.

11.3 Окисление двухвалентного железа

Железобактерия *Thiobacillus ferrooxidans* окисляет двухвалентное железо до трехвалентного:



Эта бактерия очень похожа на *T. thiooxidans*, жизнеспособна при pH среды до 2,5, однако энергию она получает не только за счет окисления восстановленных соединений серы, но и за счет окисления ионов Fe^{2+} . Эта железобактерия обитает в кислых рудничных водах, содержащих сульфиды различных металлов, в том числе пирит (FeS_2). С несомненностью установлено, что ацидофильные железобактерии способны к хемоавтотрофному образу жизни.

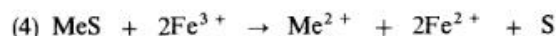
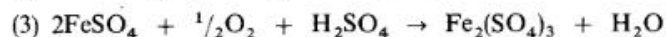
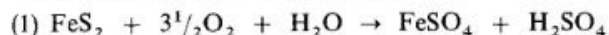
Недавно были также открыты термофильные штаммы тиобацилл, окисляющих железо и серу. Штаммы термофила *Sulfolobus acidocaldarius* тоже могут окислять двухвалентное железо¹. Из почв, содержащих антимонит, удалось выделить автотрофную бактерию *Stibiobacter senarmonitii*, способную окислять Sb^{3+} до Sb^{5+} .

Выщелачивание металлов из руд. Способность некоторых ацидофильных бактерий, окисляющих железо и серу, превращать сульфиды и элементарную серу в водорастворимые сульфаты тяжелых металлов используется для выщелачивания бедных руд с целью получения меди, цинка, никеля, молибдена и урана. Метод выщелачивания уже применяют в широком масштабе для получения металлов из отвалов породы, однако область его применения, возможно, удастся распространить и на

¹ Двухвалентное железо окисляет также облигатно-автотрофная бактерия *Leptospirillum ferrooxidans*. – Прим. ред.

подземный горный промысел. В наиболее простом случае пропускают воду через толстый слой измельченного камня, содержащего руду [например, пирит (FeS_2)] с сопутствующими сульфидами различных металлов, таких как Cu_2S (халькозин), CuS , ZnS , NiS , MoS_2 , Sb_2S_3 , CoS и PbS , а затем собирают раствор, содержащий сульфаты. После концентрирования такого раствора из него осаждают соответствующие металлы.

Растворение сульфидов тяжелых металлов происходит благодаря совместному действию многих процессов: бактериального окисления восстановленных соединений серы (1) или элементарной серы (2) до серной кислоты, бактериального окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} (3), и, наконец, химического окисления нерастворимых солей тяжелых металлов до растворимых сульфатов и серы (4):



Таким образом, бактерии поставляют серную кислоту, а также регенерируют Fe^{3+} ; оба этих компонента расходуются при растворении руд.

Эти превращения осуществляют *Thiobacillus thiooxidans* и *T. ferrooxidans*. Соответствующие штаммы бактерий отличаются необычной устойчивостью к довольно высоким концентрациям Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} и других ионов тяжелых металлов. В процессе выщелачивания участвуют также штаммы *Sulfolobus*, окисляющие серу и железо.

Другие железобактерии. К наиболее известным и легко распознаваемым железобактериям относятся также *Gallionella ferruginea* (см. рис. 3.16) и *Leptothrix ochracea*. Их можно найти, например, в дренажных трубах и горных ручьях среди хлопьев и толстых налетов оксидов железа. До последних лет оставалось неясным, способны ли эти бактерии использовать энергию, освобождающуюся при окислении Fe^{2+} в Fe^{3+} , и расти как автотрофы. Недавно у представителей рода *Gallionella* была обнаружена рибулозобисфосфат-карбоксилаза; поэтому их относят сейчас к литоавтотрофным бактериям.

Бактерии окисляют не только железо, но и марганец. Хламидобактерия *Leptothrix discophorus* способна окислять Mn^{2+} до Mn^{4+} . Однако еще не установлено точно, используется ли энергия, получаемая в результате такого окисления, для метаболических целей.

Облигатная хемолитоавтотрофия. Облигатная хемолитоавтотрофия — это выражение крайней степени приспособления и специализации организмов, окисляющих неорганические субстраты. Для того чтобы объяснить этот феномен, было предложено и проверено несколько гипотез:

1. Можно исходить из предположения, что цикл трикарбоновых кислот не является необходимым для окисления неорганического субстрата (подобно тому как он не нужен для брожения). В самом деле, восстановительные эквиваленты, получающиеся благодаря окислению неорганического субстрата, поступают

в дыхательную цепь. Должны быть обеспечены лишь синтетические функции цикла трикарбоновых кислот (образование 2-оксоглутарата и сукцината). Но для этого фермент 2-оксоглутаратдегидрогеназа не нужен. Проверка показала, что у ряда облигатно-автотрофных бактерий его действительно нет. 2-Оксоглутаратдегидрогеназа не обнаруживалась и у многих факультативно-автотрофных бактерий, если клетки росли на среде с неорганическим источником энергии. Таким образом, мутант факультативно-автотрофной бактерии, потерявший способность к синтезу 2-оксоглутаратдегидрогеназы, вел бы себя как облигатно-автотрофный микроорганизм.

2. Поскольку нитрифицирующие бактерии, а также бактерии, окисляющие серу, сульфит и железо, обладают «разделенной» дыхательной цепью, вполне возможно, что у некоторых облигатных автотрофов в первом участке этой цепи имеется необратимый этап, который делает невозможной ее нормальную функцию, а именно окисление NADH_2 (этот отрезок используется только для обратного переноса электронов). Такое нарушение обратимости цепи, возможно связанное с регуляцией ферментов, могло бы служить для сохранения восстановительной силы (NADH_2), полученной с большими затратами энергии.

Пока еще не удалось дать единое объяснение облигатной автотрофии. Возможно, что у разных физиологических групп бактерий этот феномен имеет разные причины.

11.4 Окисление молекулярного водорода

Молекулярный водород образуется в процессе анаэробного распада органических веществ в осадках водоемов и в анаэробных участках почвы. Многие бактерии способны к использованию этого водорода. Значительная часть его подвергается окислению теми бактериями, которые живут в сообществе с выделяющими H_2 организмами, осуществляющими брожение. Окисление H_2 такими бактериями сопровождается восстановлением сульфата до сульфида или CO_2 до метана (см. разд. 9.4). Почти во всех группах бактерий, синтезирующих АТФ путем окислительного фосфорилирования в анаэробных условиях («анаэробное дыхание»), есть формы, способные использовать молекулярный водород в качестве донора электронов (см. гл. 9, а также табл. 11.4).

Водород образуется также в хорошо аэрируемых экосистемах, например в почвах, на которых растут бобовые растения (соя, фасоль, кле-

Таблица 11.4. Использование водорода бактериями, способными регенерировать АТФ путем окислительного фосфорилирования в анаэробных условиях

Процесс восстановления	Типичные роды и виды
$2\text{NO}_3^- + 5\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	<i>Paracoccus denitrificans</i>
$\text{SO}_4^{2-} + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{S}^{2-} + 4\text{H}_2\text{O}$	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
$\text{S} + \text{H}_2 \rightarrow \text{S}^{2-} + 2\text{H}^+$	<i>Campylobacter</i>
$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Methanobacterium</i>
$2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{—COOH} + 2\text{H}_2\text{O}$	<i>Acetobacterium</i>
Фумарат + H_2	→ Сукцинат <i>Vibrio succinogenes</i>

вер). Он освобождается в результате реакции, катализируемой нитрогеназой (разд. 13.3), и диффундирует из бактериоидов корневых клубеньков (многие из которых не образуют гидрогеназу) в окружающую среду.

11.4.1 Аэробные бактерии, окисляющие водород

Бактерии, окисляющие в аэробных условиях молекулярный водород с использованием кислорода как конечного акцептора электронов, объединяют в группу аэробных *водородокисляющих (водородных) бактерий*. Все они способны как к автотрофной фиксации CO₂, так и к использованию органических субстратов. Таким образом, водородные бактерии являются факультативными хемолитоавтотрофами.

Некоторые аэробные водородные бактерии могут окислять и CO, используя этот газ как единственный донор электронов и единственный источник углерода.

Выделение и рост. Аэробные водородные бактерии растут на простых питательных средах, содержащих только неорганические соли, под газовой смесью, состоящей из 70% H₂, 20% O₂ и 10% CO₂ (по объему). Они вызывают превращения, приблизительно соответствующие уравнению



При соблюдении указанных выше условий легко поддаются выделению и накоплению водородные бактерии из почвенных и водных проб. К ним относятся наиболее быстро растущие автотрофные организмы. Мезофильные штаммы способны к автотрофному росту с временем удвоения 3 ч, а термофильные – с временем удвоения 2 ч. При гетеротрофии некоторые штаммы растут с еще большей скоростью. При благоприятных условиях роста выход сухого вещества клеток может достигать около 20 г на 1 л среды.

Систематика. С таксономической точки зрения аэробные водородные бактерии представляют собой чрезвычайно гетерогенную группу. Большинство видов относится к грам-отрицательным родам *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Paracoccus* и *Xanthobacter*, некоторые виды – к грам-положительным родам *Nocardia*, *Mycobacterium* и *Bacillus* (табл. 11.5). Недавно способность к аэробному автотрофному росту с использованием H₂ была обнаружена и у ряда других бактерий (в частности, у *Rhizobium*, *Derxia*). Таким образом, ферменты, необходимые для активации H₂ и фиксации CO₂, есть у представителей многих таксономических групп бактерий.

Использование водорода и энергетический обмен. Молекулярный водород включается в метаболические процессы с помощью гидрогеназ.

¹ <CH₂O> соответствует примерному соотношению C, H и O в веществе клеток.

Таблица 11.5. Некоторые виды аэробных бактерий, окисляющих водород

Вид	Гидрогеназа		Фиксация N ₂	Окраска по Граму
	растворимая	мембраносвязанная		
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	+	+	–	–
<i>Pseudomonas facilis</i>	–	+	–	–
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	–	+	+	–
<i>Pseudomonas carboxidovorans</i>	–	+	–	–
<i>Pseudomonas pseudoflava</i>	–	+	–	–
<i>Pseudomonas carboxidoflava</i>	–	+	–	–
<i>Aquaspirillum autotrophicum</i>	–	+	–	–
<i>Paracoccus denitrificans</i>	–	+	–	–
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	–	+	+	–
<i>Nocardia opaca</i>	+	–	–	+
<i>Mycobacterium gordonae</i>	–	+	–	+
<i>Bacillus</i> sp.	–	+	–	+

У аэробных водородных бактерий встречаются гидрогеназы двух типов: 1) растворимые, находящиеся в цитоплазме и восстанавливающие NAD (H₂:NAD-оксидоредуктазы), и 2) мембраносвязанные. Лишь у немногих бактерий (*Alcaligenes eutrophus*, *A. ruhlandii*) имеются оба типа гидрогеназ. *Nocardia* содержит только растворимый фермент, а большинство водородных бактерий – только мембраносвязанный. Оба фермента могут поставлять водород в дыхательную цепь. Процесс регенерации АТФ идет с высокой эффективностью. В отношении компонентов дыхательной цепи *Alcaligenes eutrophus* и *Paracoccus denitrificans* очень сходны с митохондриями.

Гетеротрофное и миксотрофное питание. Многие водородные бактерии разлагают гексозы и глюконат по пути Энтнера–Дудорова и окисляют их до CO₂ и H₂O. Они способны также использовать множество других органических веществ, в том числе разветвленные органические кислоты, соединения с ароматическими и гетероциклическими кольцами и даже тестостерон. В клетках могут накапливаться поли-β-гидроксимасляная кислота и гликоген.

Если в распоряжении водородных бактерий имеются наряду с неорганическими субстратами (CO₂ и H₂) также и органические, то бактерии могут вести себя как *миксотрофы*, т.е. могут ассимилировать органические молекулы, синтезируя из них клеточные вещества, а необходимую для этого энергию получать путем окисления H₂. При таких условиях нет надобности в полном окислении даже части органических питательных веществ. Способность к миксотрофному существованию присуща многим факультативным автотрофам; нужную для синтетических процессов энергию они могут получать за счет окисления восстановленных неорганических субстратов (например, сероводорода или

серы – у серных бактерий) или в результате фотосинтеза (зеленые водоросли и высшие растения).

Регуляция использования субстратов. У некоторых водородных бактерий использование субстратов строго регулируется. Например, при автотрофном росте клетки *Alcaligenes eutrophus* не содержат ферментов для расщепления фруктозы. Если такие клетки поместить в среду с фруктозой и инкубировать в аэробных условиях, то образуются ферменты пути Энтнера–Дудорова и клетки растут. Если, однако, инкубация происходит под газовой смесью, содержащей 80% H_2 и 20% O_2 , то не наблюдается ни синтеза ферментов, ни роста клеток. Таким образом, молекулярный водород подавляет (репрессирует) образование ферментов, необходимых для катаболизма фруктозы.

Клетки, имеющие как ферменты для расщепления фруктозы, так и гидрогеназу, при инкубации в атмосфере $H_2 + O_2$ будут использовать фруктозу очень медленно: H_2 будет ингибировать использование фруктозы (мишенью для водорода служит фермент глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа). В присутствии H_2 и O_2 клетки способны к образованию АТФ и $NADH_2$. Оба этих метаболита ингибируют глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу. Резкое замедление катаболизма глюкозы *in vivo* объясняется торможением активности этого фермента под действием $NADH_2$. В описанных опытах глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа выступает как регулируемый фермент пути Энтнера–Дудорова: функция этого фермента аналогична функции фосфофруктокиназы в фруктозобисфосфатном пути.

Бактерии, использующие СО. Окись углерода образуется в природе как в анаэробных, так и в аэробных условиях. Пути ее биохимических превращений и участвующие в них микроорганизмы пока недостаточно изучены. Известно, однако, что СО окисляется многими видами бактерий до CO_2 . Только аэробные бактерии способны расти, используя СО как единственный донор электронов и единственный источник углерода. Окисление СО в процессе роста *Pseudomonas carboxidovorans* протекает согласно уравнению



Углерод ассимилируется путем фиксации CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле. Бактерии, использующие СО (карбоксидобактерии), обычно обладают мембраносвязанной гидрогеназой и могут вести себя как водородные бактерии.

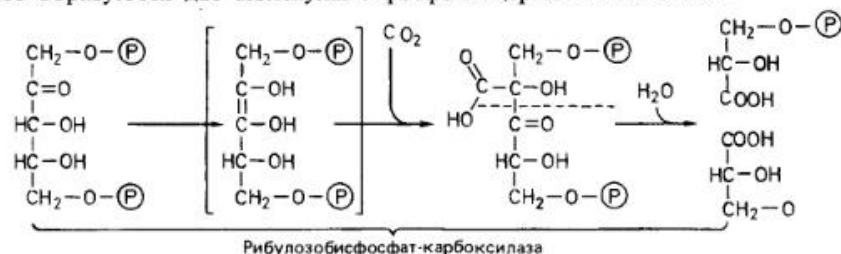
11.5 Фиксация CO_2

Большинство организмов, способных расти в условиях, когда единственным источником углерода служит углекислота, фиксируют ее через рибулозобисфосфатный цикл (цикл-Кальвина–Бассама). К таким организмам относятся аэробные хемолитоавтотрофные бактерии, почти все фототрофные бактерии, цианобактерии и зеленые растения. Цикл

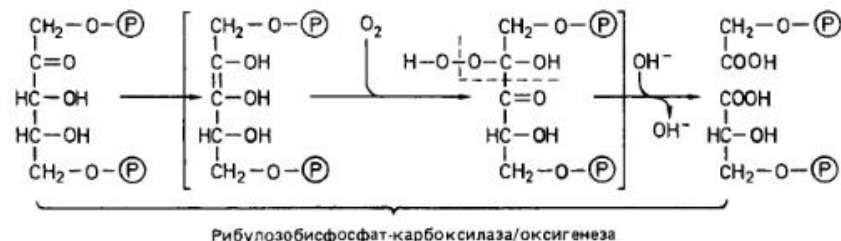
Кальвина–Бассама определенно не участвует в ассимиляции CO_2 у метанобразующих и ацетогенных бактерий, хотя они тоже относятся к хемолитоавтотрофным организмам.

Для рибулозобисфосфатного цикла характерны два фермента, не участвующие в других метаболических путях, – фосфорилбулокиназа и рибулозобисфосфат-карбоксилаза. Последний фермент представляет собой белок, в количественном отношении преобладающий над всеми другими белками на нашей планете. Рибулозобисфосфатный цикл – это восстановительный процесс, в котором CO_2 восстанавливается до уровня углеводов. В цикле могут быть выделены три участка: 1) реакция карбоксилирования, 2) восстановление и 3) регенерация молекул, служащих акцепторами CO_2 .

Реакция карбоксилирования. При участии рибулозобисфосфат-карбоксилазы к рибулозо-1,5-бисфосфату присоединяется CO_2 , и в результате образуются две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты:



Этот же фермент может катализировать и другую реакцию. В отсутствие CO_2 и в присутствии O_2 он проявляет оксигеназную активность, окисляя рибулозобисфосфат до фосфогликолата и 3-фосфоглицерата. Эта реакция участвует в образовании гликолевой кислоты у автотрофных бактерий и у зеленых растений, а следовательно – в фотодыхании.



Реакция восстановления. За реакцией карбоксилирования следует восстановление карбоксильной группы 3-фосфоглицерата до альдегидной группы. В нем участвуют реакции, известные для фруктозобисфосфатного пути (разд. 7.2.1), т.е. фосфорилирование под действием 3-фосфоглицераткиназы за счет АТФ и восстановление при участии глицеральде-

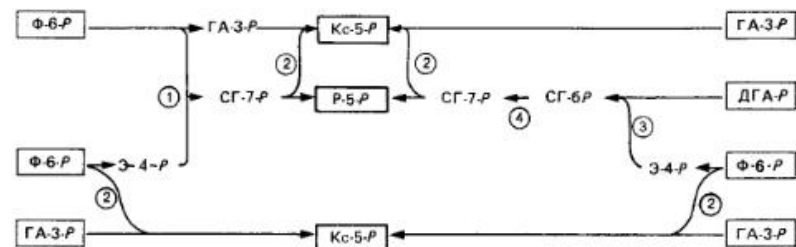


Рис. 11.2. Схема двух возможных путей регенерации пентозофосфатов из триозофосфатов и фруктозо-6-фосфата. Слева — этапы синтеза пентозофосфатов (рибозы, дезоксирибозы), протекающие при участии трансальдолазы. Справа — этапы регенерации акцептора CO_2 при фиксации CO_2 (рибулозо-1,5-бисфосфата), в которых участвуют седогептулозо-1,7-бисфосфат и альдолаза, но уже не участвует трансальдолаза. Ф-6-Р — фруктозо-6-фосфат; ГА-3-Р — глицеральдегид-3-фосфат; ДГА-Р — дигидроксиацетонфосфат; Э-4-Р — эритрозо-4-фосфат; СГ-7-Р — седогептулозо-7-фосфат; СГ-6-Р — седогептулозо-1,7-бисфосфат; Кс-5-Р — ксилулозо-5-фосфат; Р-5-Р — рибозо-5-фосфат. Ферменты (цифры в кружках): 1 — трансальдолаза; 2 — транскетолаза; 3 — фруктозобисфосфат-альдолаза; 4 — фруктозобисфосфатаза.

гид-3-фосфатдегидрогеназы за счет NAD(P)H_2 . У бактерий эта реакция зависит от NAD , а у растений — от NADP^+ .

Восстановление 3-фосфоглицерата — это, собственно, и есть тот этап ассимиляции CO_2 , который требует затраты энергии и восстановительной силы. Последующие стадии происходят на примерно одинаковом энергетическом уровне.

Регенерация акцепторов CO_2 . Глицеральдегид-3-фосфат находится в равновесии с дигидроксиацетонфосфатом (триозофосфатизомеразная реакция), а оба триозофосфата — в равновесии с фруктозо-1,6-бисфосфатом (альдолазная реакция).

Фруктозобисфосфат дефосфорилируется под действием *фруктозобисфосфатазы* с образованием фруктозо-6-фосфата. Затем из одной молекулы фруктозо-6-фосфата и трех молекул триозофосфата образуются три молекулы рибозо-5-фосфата. Некоторые из ферментов, катализирующих эти превращения, участвуют и в окислительном пентозофосфатном цикле. Первое из этих превращений — *транскетолазная* реакция (рис. 11.2, справа). Транскетолаза катализирует перенос гликольной группы от кетозомонофосфата на альдозофосфат. Гликолевый альдегид при этом временно связывается с тиаминдифосфатом (тиаминпирофосфатом), играющим роль кофермента: получается «активный гликолевый альдегид».

Образующийся в ходе транскетолазной реакции тетрозозофосфат (эритрозо-4-фосфат) превращается в *альдолазной* реакции с дигидроксиаце-

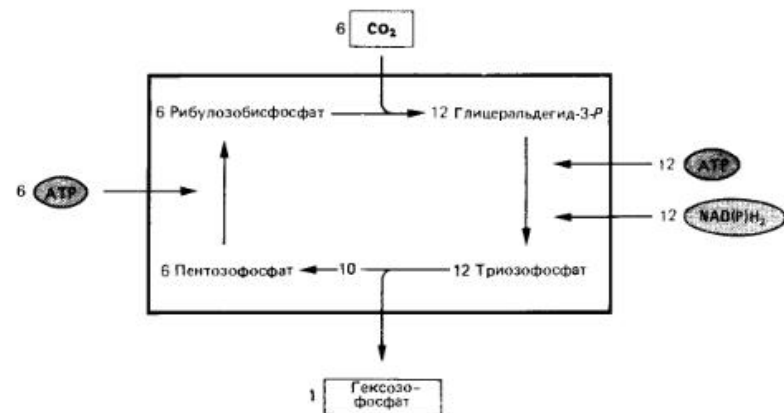
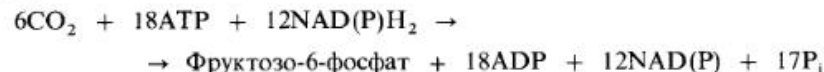
¹ У цианобактерий в этой реакции восстановления тоже участвует NADPH_2 . Прим. ред.

тонфосфатом в седогептулозо-1,7-бисфосфат. Последний подвергается при участии *фруктозобисфосфатазы* дефосфорилированию в положении 1 с образованием седогептулозо-7-фосфата. Эта реакция гидролиза фосфорного эфира необратима и дает возможность регулировать метаболизм в данном пункте.

Для высших растений точно установлено, что в ходе фотосинтеза регенерация рибулозо-5-фосфата происходит через седогептулозо-1,7-бисфосфат (рис. 11.2, справа); однако в темноте синтез пентозофосфатов идет через трансальдолазную реакцию прямо к седогептулозо-7-фосфату (рис. 11.2, слева).

Гликольная группа седогептулозо-7-фосфата переносится с помощью *транскетолазы* на глицеральдегид-3-фосфат, что ведет к образованию двух пентозофосфатов. Эти пентозофосфаты (рибулозо-5-фосфат и ксилулозо-5-фосфат) находятся в равновесии с рибулозо-5-фосфатом. Последней реакцией рибулозобисфосфатного цикла является фосфорилирование рибулозо-5-фосфата за счет ATP при участии *фосфорилирующей киназы* до рибулозо-1,5-бисфосфата.

Баланс рибулозобисфосфатного цикла. Для синтеза 1 моля гексозы из 6 молей CO_2 необходимы шесть оборотов. Баланс фиксации CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле можно представить следующим уравнением:



Хотя цикл и изображают замкнутым, многие его промежуточные продукты служат важными исходными веществами для синтеза клеточных компонентов: из 3-фосфоглицерата образуются пируват и ацетил- CoA , из эритрозо-4-фосфата — ароматические аминокислоты; рибозо-5-фосфат используется для синтеза нуклеотидов, а гексозофосфаты — для построения полимеров. **Регуляция** активности некоторых участвую-

щих в цикле ферментов преследует, видимо, две цели: с одной стороны, на фиксацию CO_2 (связанную с большой затратой энергии) не должно расходоваться слишком много АТР; с другой стороны, цикл не должен прерываться (что могло бы произойти, если бы его промежуточные продукты оказались использованными; стр. 496–497).

Другие пути автотрофной фиксации CO_2 . Фиксация CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле является ныне хотя и важнейшей для биосферы, но далеко не единственной целью реакций, ведущей к синтезу органических веществ. Анаэробные автотрофные бактерии располагают двумя другими механизмами ассимиляции CO_2 . Метанобразующие, ацетогенные и сульфатредуцирующие (сульфидогенные) бактерии, способные использовать в качестве донора электронов H_2 или CO , восстанавливают CO_2 по **анаэробному ацетил-СоА-пути** до ацетил-СоА и пирувата (разд. 9.4). Последний вступает в результате известных реакций на центральные пути биосинтеза.

Зеленые серобактерии (*Chlorobium limicola*, форма *thiosulfatophilum*) фиксируют CO_2 исключительно с помощью реакций восстановительного цикла трикарбоновых кислот; CO_2 фиксируется благодаря восстановительному карбоксилированию сукцинил-СоА.

Сравнение всех трех типов автотрофной фиксации CO_2 позволяет заключить, что анаэробные процессы более экономны, чем аэробные. Синтез 1 моля триозофосфата из 3 молей CO_2 по анаэробному ацетил-СоА-пути требует затраты всего лишь 3 молей АТР, в восстановительном цикле трикарбоновых кислот – затраты 5 молей АТР, а в рибулозобисфосфатном цикле – 9 молей АТР.

Общие реакции фиксации CO_2 . Мы уже не раз упоминали о том, что и гетеротрофные организмы нуждаются в двуокиси углерода и вовле-

кают ее в свой метаболизм. Отмечалась роль карбоксилирования пирувата и фосфоенолпирувата в функционировании цикла трикарбоновых кислот. В какие промежуточные продукты обмена может включиться CO_2 , показано на рис. 11.3.

Упомянутые реакции фиксации CO_2 играют различную роль у разных организмов. Некоторые из них служат для активации метаболитов или для пополнения центральных биохимических путей метаболитами. Реакции восстановительного карбоксилирования, зависящие от ферредоксина, встречаются лишь у некоторых анаэробных и фототрофных бактерий.



Рис. 11.3. Включение CO_2 в различные промежуточные продукты метаболизма.

12. Фототрофные бактерии и фотосинтез

Способность использовать свет как источник энергии, необходимой для роста, присуща двум группам бактерий, принципиально отличающимся друг от друга.

Пурпурные и зеленые бактерии, объединяемые в порядок Rhodospirillales¹, можно рассматривать как реликтовые организмы, дошедшие до нас из времен начальной эволюции фотосинтеза. Они не в состоянии использовать в качестве донора водорода воду (как это делают зеленые растения); им требуются доноры с более высокой степенью восстановления (H_2S , H_2 или органические вещества). Поэтому фотосинтез у этих бактерий протекает без выделения O_2 . В таких случаях говорят об **аноксигенном** фотосинтезе. Бактерии этой группы – типичные водные организмы, распространенные как в пресной, так и в морской воде. Их красная, оранжевая или зеленая окраска обусловлена присутствием бактериохлорофиллов и каротиноидов.

Цианобактерии используют в качестве донора водорода воду и выделяют на свету кислород. Таким образом, они осуществляют **оксигенный** фотосинтез. Пигментная система этих бактерий включает хлорофилл *a*, каротиноиды и фикобилины. Поскольку процесс фотосинтеза у цианобактерий принципиально не отличается от фотосинтеза зеленых растений, эту группу бактерий до недавнего времени рассматривали совместно с фотосинтезирующими эукариотами и называли сине-зелеными водорослями. Однако по строению своих клеток это типичные прокариоты. Цианобактерии уже были подробно описаны в разделе 3.21 и здесь рассматриваться не будут².

12.1 Пурпурные и зеленые бактерии

Фототрофные бактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез, делятся на две большие группы: пурпурные бактерии (Rhodospirillales) и зеленые бактерии (Chlorobiales). Представители этих двух порядков значительно различаются по своим цитологическим и физиологическим признакам, а также по характерным для них пигментам (табл. 12.1; рис. 12.1, 12.6 и 12.10).

¹ В настоящее время зеленые бактерии относят к особому порядку Chlorobiales, а вместе с пурпурными бактериями их объединяют в класс Anoxyphotobacteria. – Прим. ред.

² Кроме цианобактерий к оксигенному фотосинтезу способны прокариотические организмы, составляющие порядок Prochlorales. Вместе с цианобактериями их относят к классу Oxyphotobacteria. – Прим. ред.

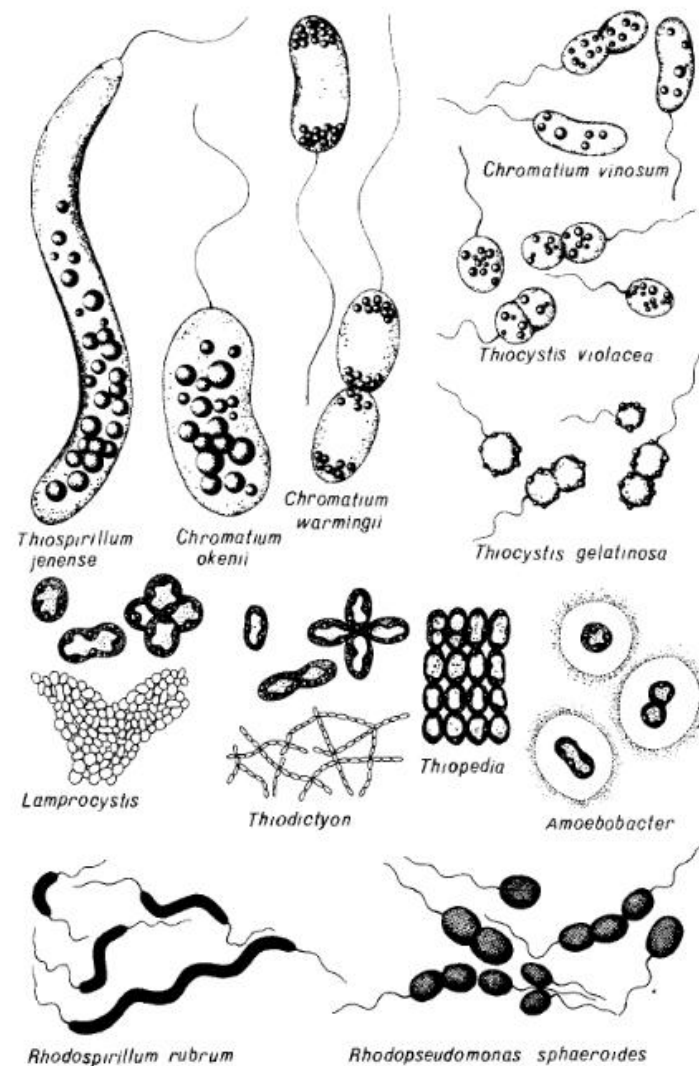


Рис. 12.1. Некоторые представители серных пурпурных бактерий (Chromatiaceae) и несерных пурпурных бактерий (Rhodospirillaceae).

Пурпурные бактерии (Rhodospirillales)

Общим для всех представителей Rhodospirillales является то, что их фотосинтетический аппарат (светособирающие системы и реакционные центры) находится на внутренних мембранах (тилакоидах), образующихся из впячиваний плазматической мембраны (см. рис. 2.23 и 2.24).

Таблица 12.1. Семейства анаэробных фототрофных бактерий

Порядок	Семейство	Типовой вид	Рост	
			аэроб- ный в темноте	анаэроб- ный на свету
Rhodospirillales (пурпурные бак- терии)	Chromatiaceae (пурпурные серные бакте- рии)	<i>Chromatium vino- sum</i>	- ⁴	+
	Rhodospirillaceae (пурпурные не- серные бакте- рии)	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	(+) ⁵	+
Chlorobiales (зеленые бакте- рии)	Chlorobiaceae (зеленые сер- ные бактерии)	<i>Chlorobium limi- cola</i>	-	+
	Chloroflexaceae (зеленые несер- ные бактерии)	<i>Chloroflexus auran- tiacus</i>	+	+

¹ Бхл – бактериохлорофилл.

² л-АБК – л-аминобензойная кислота.

³ ПМ – плазматическая мембрана.

⁴ Отдельные виды растут в темноте в аэробных или микроаэробных условиях. – Прим. ред.

⁵ Почти все виды растут в темноте в аэробных или микроаэробных условиях. – Прим. ред.

Морфология тилакоидных структур может сильно варьировать у разных видов. Различают везикулярные, трубчатые и пластинчатые формы (см. рис. 2.24). Типичным для данной группы бактерий хлорофиллом является (за немногими исключениями) бактериохлорофилл *a*. Все эти бактерии способны фиксировать CO₂ в рибулозобисфосфатном цикле и использовать органические соединения как доноры водорода и (или) источники углерода.

По способности использовать в качестве донора электронов элементарную серу в группе пурпурных бактерий выделяют два семейства: *пурпурные серные бактерии*, или Chromatiaceae (прежнее название – Thiochondraceae), и *пурпурные несерные бактерии*, или Rhodospirillaceae (прежнее название – Athiorhodaceae)¹.

Пурпурные серные бактерии (Chromatiaceae). Большинство пурпурных серных бактерий (пурпурных серобактерий) можно легко распознать по внутриклеточным включениям серы в виде сильно преломляющих свет

¹ В настоящее время выделяют еще одно семейство – Ectothiorhodaceae; раньше соответствующие виды включали в семейство Chromatiaceae. – Прим. ред.

Характерные признаки семейства				
Окисление H ₂ S	Отложение серы	Пигменты ^{1,6}	Фотосинтетический аппарат	Потребность в витаминах
+	Внутриклеточное	Бхл <i>a</i> (Бхл <i>b</i>)	Тилакоиды	Нет или B ₁₂
– (+)	(Внеклеточное)	Бхл <i>a</i> (Бхл <i>b</i>)	Тилакоиды	л-АБК ² , тиамин, биотин, никотиновая кислота
+	Внеклеточное	Бхл <i>a</i> Бхл <i>c</i> Бхл <i>d</i> Бхл <i>e</i>	ПМ ³ Хлоросомы » »	Нет или B ₁₂
(+)		Бхл <i>a</i> Бхл <i>c</i>	ПМ ³ Хлоросомы	

⁶ Недавно выделена анаэробная фототрофная бактерия *Hellobacterium chlorum*, осуществляющая аноксигенный фотосинтез. Она содержит особый хлорофилл (бактериохлорофилл *g*) и в отличие от других фототрофных бактерий является грам-положительной. Предполагают, что это наиболее древняя форма фототрофов. – Прим. ред.

шариков (см. рис. 2.43, 12.2 и 12.3). *Chromatium okenii* (толщиной 5 мкм и длиной 20 мкм) и *Thiospirillum jenense* (толщиной 3,5 мкм и длиной 50 мкм) – гиганты среди бактерий (рис. 12.1, 12.2 и 12.3). Они давно уже привлекали к себе внимание микробиологов; на них изучают движение с помощью жгутиков, а также двигательные реакции на различные раздражители. *Chromatium warmingii* отличается от *C. okenii* несколько меньшими размерами клеток и полярным расположением включений серы. Крупные представители этого рода имеют форму почки, а мелкие – коротких палочек. К ним относится и *Chromatium vinosum*, штамм D, на котором были проведены важные исследования по бактериальному фотосинтезу. Для *Thiocystis* (*T. violacea*, *T. gelatinosa*) характерны сферические подвижные клетки. У *Thiocapsa roseopersicina* и *T. pfennigii* клетки тоже имеют сферическую форму, но они неподвижны. Многие виды пурпурных серобактерий обладают газовыми вакуолями. Таковы сферические подвижные бактерии *Lamprocystis roseopersicina*, а также неподвижные формы – *Amoebobacter* (сферические клетки), *Thiopedia* (эллипсоидные клетки), *Thiodictyon* (палочковидные клетки).

Характерная особенность Chromatiaceae – то, что во время окисления

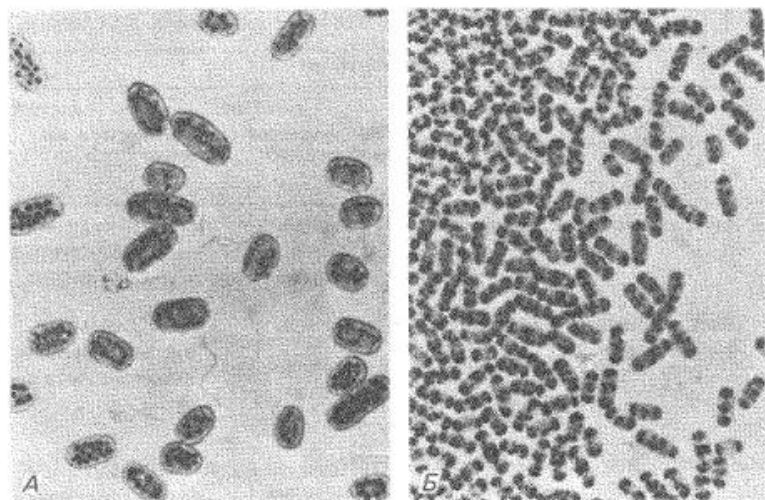


Рис. 12.2. *Chromatium okenii* (А) и *Ch. warmingii* (Б). Снимки в светлом поле; $\times \sim 800$. (Фото N. Pfennig.)

H_2S в их клетках в качестве промежуточного продукта откладывается сера. Представители *Ectothiorhodospira* (*E. mobilis*, *E. halophila*) откладывают серу не в цитоплазме, а вне клеток и там же окисляют ее далее до сульфата.

Chromatiaceae обладают везикулярными тилакоидами (хроматофорами), которые обычно заполняют всю клетку. В настоящее время известны лишь два исключения: у видов *Ectothiorhodospira* тилакоиды образуют стопки ламелл, а у *Thiocapsa pfennigii* они имеют трубчатую форму.

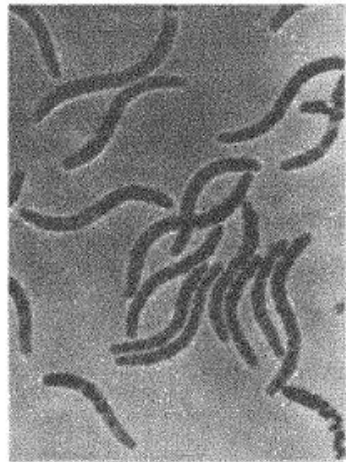


Рис. 12.3. *Thiospirillum jenense* с монополярными политрихальными жгутиками и включениями серы. Снимок в светлом поле; $\times \sim 700$. (Фото N. Pfennig.)

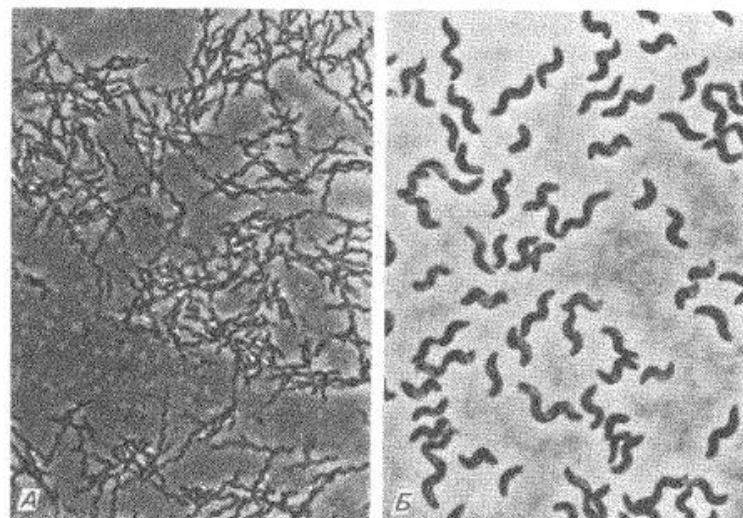


Рис. 12.4. *Rhodospirillum rubrum* (А) и *Rh. fulvum* (Б). Снимки в светлом поле; $\times \sim 1200$ и ~ 1800 соответственно.

Пурпурные несерные бактерии (Rhodospirillaceae). Большинство известных бактерий этой группы можно отнести к двум родам. Палочкообразные виды объединяют в род *Rhodopseudomonas*; названия видов связаны главным образом с их физиологическими признаками: *R. palustris*, *R. viridis*, *R. acidophila*, *R. blastica* и *R. sulfidophila*. Спиралловидные формы относят к роду *Rhodospirillum*; по величине и окраске различают виды *R. rubrum* (рис. 12.4), *R. salexigenes*, *R. fulvum*, *R. molischianum* и *R. photometricum*. Тилакоидные структуры у пурпурных несерных бактерий весьма разнообразны по форме.

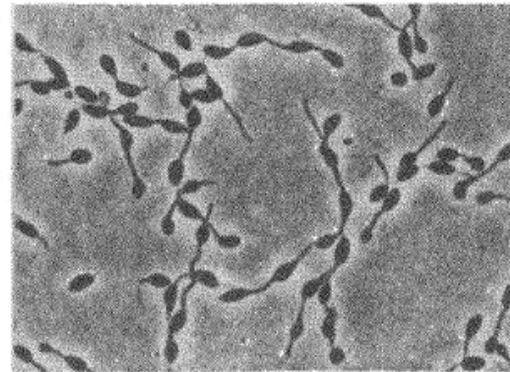


Рис. 12.5. *Rhodomicrobium vannielii* — несерная пурпурная бактерия, размножающаяся почкованием и образующая гифоподобные нити. Снимок в светлом поле; $\times \sim 1200$. (Фото N. Pfennig.)

Особое положение среди Rhodospirillaceae занимают *Rhodomicrobium vannielii* и *Rhodocyclus purpureus*. Первый из этих видов (рис. 12.5) размножается почкованием; дочерние клетки остаются связанными с материнской клеткой при помощи гиноподобных нитей или же отделяются от нее, образуя клетки с перитрихально расположенными жгутиками. *Rhodocyclus purpureus*—единственная неподвижная форма в этом семействе; клетки имеют форму полукольца; аппарат фотосинтеза, вероятно, находится в плазматической мембране, у которой можно обнаружить лишь очень небольшие и малочисленные впячивания.

Сероводород подавляет рост многих пурпурных несерных бактерий; однако некоторые виды устойчивы к H_2S или даже используют его в качестве донора водорода в процессе фиксации CO_2 . *Rhodospseudomonas sulfidophila* и *R. palustris* окисляют сероводород до сульфата, не образуя в качестве промежуточного продукта серу.

Зеленые бактерии (Chlorobiales)

Для представителей Chlorobiales характерно наличие хлоросом—органелл, содержащих пигмент и прилегающих к плазматической мембране. В хлоросомах находится характерный для данной группы бактерий бактериохлорофилл (Бхл *c*, *d* или *e*)—светособирающий пигмент. Кроме то-

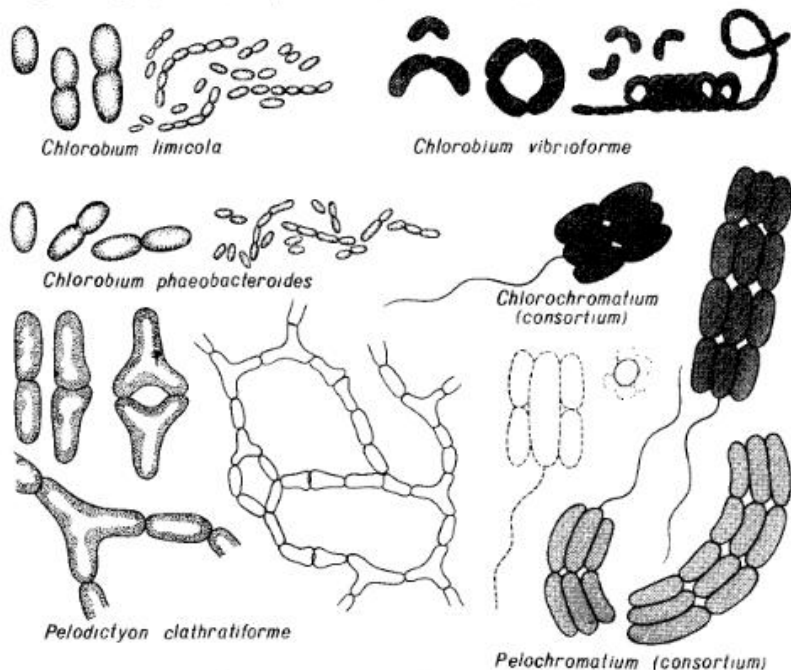


Рис. 12.6. Фототрофные зеленые серобактерии (Chlorobiaceae).

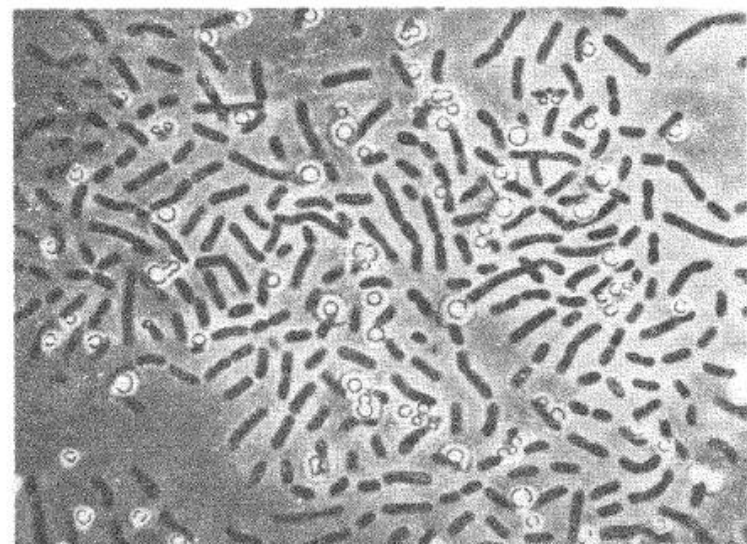


Рис. 12.7. *Chlorobium limicola*. Молодая культура с внеклеточными отложениями серы. Снимок в светлом поле; $\times \sim 1000$. (Фото N. Pfennig.)

го, эти бактерии имеют и небольшое количество бактериохлорофилла *a*, который прямо связан с фотосинтетическими реакционными центрами и локализован в плазматической мембране. Зеленые бактерии отличаются от пурпурных отсутствием рибулозобисфосфат-карбоксилазы; поэтому они не могут фиксировать CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле.

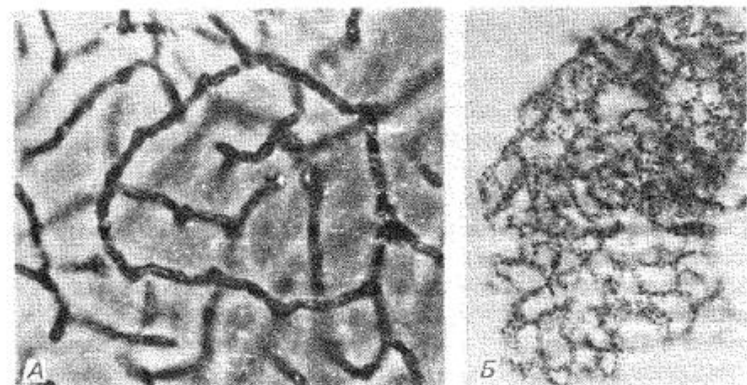


Рис. 12.8. Зеленая серная бактерия *Pelodictyon clathratiforme* (А), клетки которой соединены в сеть, и серная пурпурная бактерия *Thioldictyon elegans* (Б), образующая более рыхлую сеть. Снимки в светлом поле; $\times 1500$ и 400 соответственно. (Фото N. Pfennig.)

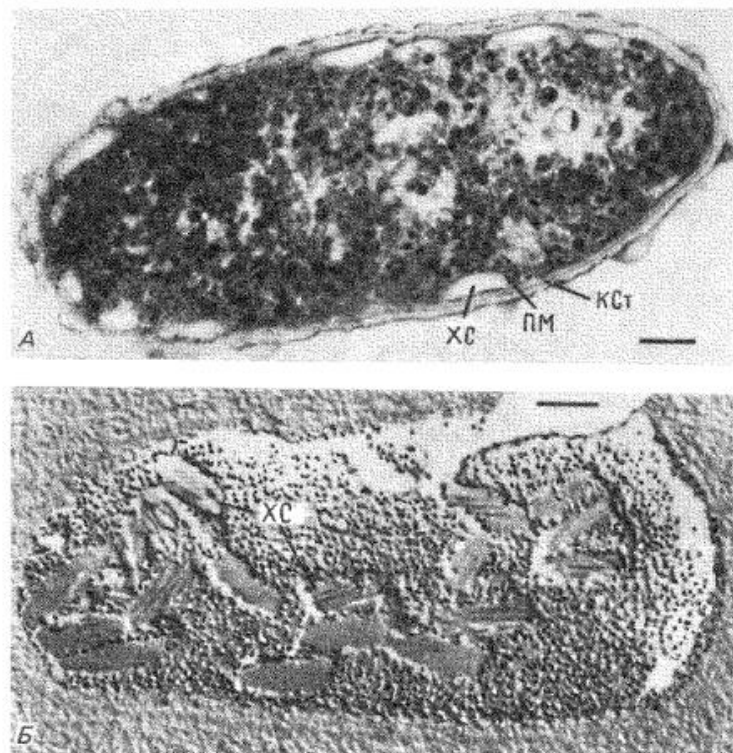


Рис. 12.9. Электронные микрофотографии *Chlorobium limicola*. А. Ультратонкий срез. Б. Хлоросомы, видимые благодаря технике замораживания-травления. ХС — хлоросомы; ПМ — плазматическая мембрана; КСт — клеточная стенка. Длина балок около 100 нм. (Stachelin L. A. et al., Biochim. Biophys. Acta, 589 [1980], 30.)

К семейству Chlorobiaceae (рис. 12.6–12.9) относятся зеленые (*Chlorobium vibrioforme* и *Ch. limicola*) и окрашенные в коричневый цвет (*Ch. phaeobacteroides*) виды, а также формы, образующие звездчатые агрегаты (*Prosthecochloris*) или сети (*Pelodictyon clathratiforme*). *Chlorochromatium aggregatum* представляет собой симбиотическую ассоциацию двух видов бактерий: бесцветных хемоорганотрофных палочек, передвигающихся с помощью длинных полярных жгутиков, и их эктосимбионтов — зеленых фототрофных бактерий. Сходную организацию имеет и *Pelochromatium roseum* с тем отличием, что эктосимбионт окрашен здесь в коричневый цвет. Морская бактерия *Chloroherpeton thalassium* отличается от видов *Chlorobium* нитевидной формой клеток и скользящим движением.

Chloroflexaceae. Фототрофная зеленая бактерия *Chloroflexus* по своей форме и способу передвижения относится к нитчатым скользящим бак-

териям, однако содержит бактериохлорофиллы *c* и *a* и обладает хлоросомами такого же типа, как у зеленых серобактерий (Chlorobiaceae). В то же время *Chloroflexus* отличается от видов *Chlorobium* своей способностью к аэробному гетеротрофному росту на сложных средах как на свету, так и в темноте. Chloroflexaceae в отличие от Chlorobiaceae практически неспособны к фотоавтотрофному росту на CO_2 и H_2 . Таким образом, эти бактерии являются скорее фотогетеротрофами. *C. aurantiacus* — бактерия, широко распространенная во всем мире; это главный компонент зеленого или оранжевого мата на дне ручьев, берущих начало от горячих источников.

12.1.1 Пигменты фотосинтетического аппарата

Благодаря фотосинтетическим пигментам достаточно густые суспензии фототрофных бактерий имеют зеленую, сине-зеленую, пурпурно-фиолетовую, красную, коричневую или розовую окраску. Цвет зависит от природы и количественного соотношения пигментов. Отдельные пигменты можно распознать даже по спектрам поглощения интактных клеток (рис. 12.10). Хлорофиллы, например, ответственные за максимумы поглощения в синей (<450 нм) и в красной и инфракрасной (650–1100 нм) областях спектра. Поглощение в области 400–550 нм обусловлено главным образом каротиноидами, а у цианобактерий в области 550–650 нм — фикобилипротеинами.

Различные хлорофиллы фототрофных микроорганизмов отличаются друг от друга в основном наличием или отсутствием двойной связи между углеродными атомами 3 и 4 и заместителями в порфириновом скелете (рис. 12.11). От этих модификаций зависит максимумы поглощения в ближней инфракрасной области. Различия отчетливо видны и в спектрах интактных клеток или изолированных фотосинтетических мембран, в которых пигменты образуют специфические комплексы с белками (рис. 12.10). Главный максимум хлорофилла *a* зеленых водорослей и цианобактерий лежит в области 680–685 нм, бактериохлорофиллов *c*, *d* и *e* зеленых серобактерий и *Chloroflexus* — в области 715–755 нм, а бактериохлорофилла *a* большинства пурпурных бактерий — при 850–890 нм. В области от 1020 до 1035 нм поглощает бактериохлорофилл *b*, найденный пока лишь в клетках *Rhodospseudomonas viridis*, *Ectothiorhodospira halochloris*, *Thiocapsa pfennigii* и некоторых других пурпурных бактерий. Бактериохлорофилл *a* у пурпурных бактерий представлен четырьмя спектральными формами: В800, В820, В850 и В870–890. Различия в поглощении зависят в данном случае от характера связи и положения молекулы Бхл в пигментно-белковом комплексе фотосинтетического аппарата. Число пиков и их относительная высота изменяются от вида к виду, а у многих организмов на них влияют и условия культивирования.

Chlorobiaceae содержат наряду с характерными для них бактериохлорофиллами *c*, *d* или *e* также небольшое количество Бхл *a* лишь с

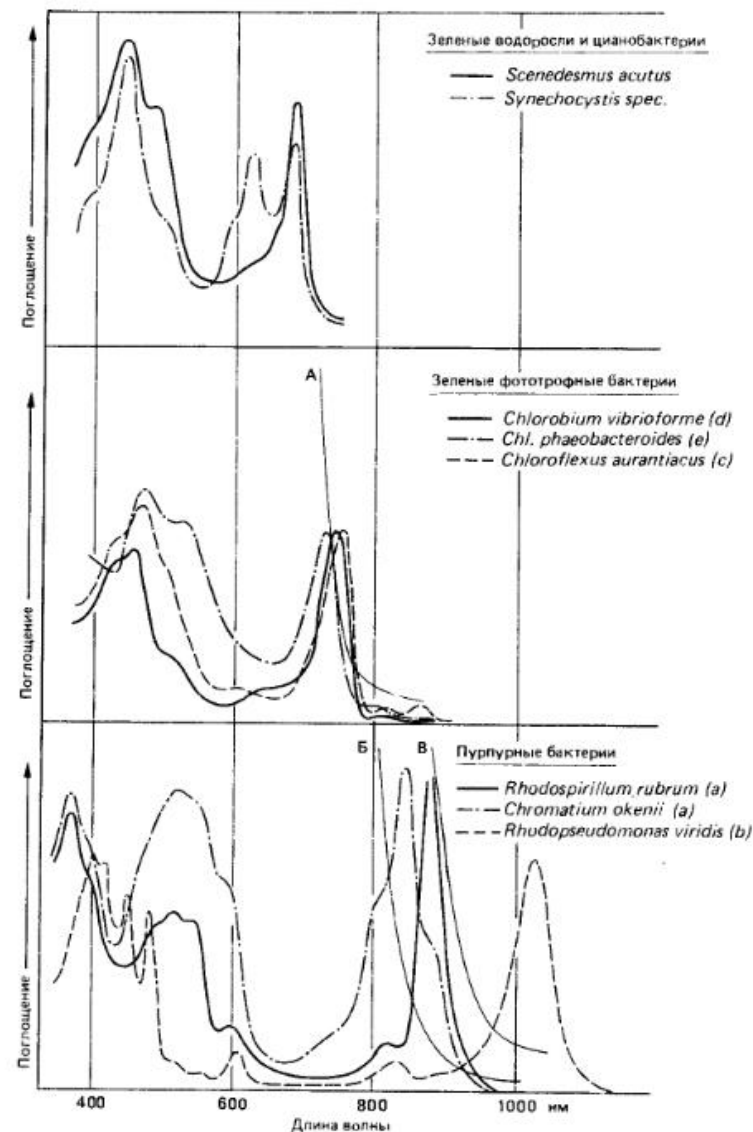


Рис. 12.10. Спектры поглощения интактных клеток фототрофных бактерий, цианобактерий и зеленых водорослей. В скобках указаны типы бактериохлорофиллов. Приведены также кривые, характеризующие способность к поглощению инфракрасных лучей у фильтров, используемых для получения селективных накопительных культур зеленых и пурпурных бактерий (А), пурпурных бактерий, содержащих бактериохлорофилл *a* (Б) и пурпурных бактерий, содержащих бактериохлорофилл *b* (В). (Pfenning N., Annu. Rev. Microbiol., 21 [1967], 285.)

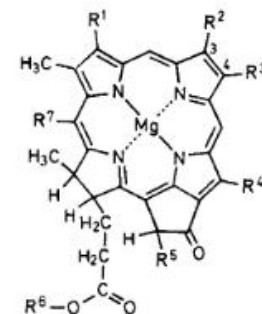


Рис. 12.11. Различия в структуре хлорофилла *a* и бактериохлорофиллов *a*, *b*, *c*, *d* и *e*.

Пигмент	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
Хлорофилл <i>a</i>	-CH=CH ₂	-CH ₃	-CH ₂ -CH ₃	-CH ₃	O=C-OCH ₃	Фитол	-H
Бактериохлорофилл <i>a</i>	O=C-CH ₃	-CH ₃ *	-CH ₂ -CH ₃ *	-CH ₃	O=C-OCH ₃	Фитол или геранилгераниол	-H
Бактериохлорофилл <i>b</i>	O=C-CH ₃	-CH ₃ *	=C(CH ₃)* H	-CH ₃	O=C-OCH ₃	Фитол	-H
Бактериохлорофилл <i>c</i>	-CH-CH ₃ OH	-CH ₃	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -i-C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅ -CH ₃	-H	Фарнезол	-CH ₃
Бактериохлорофилл <i>d</i>	-CH-CH ₃ OH	-CH ₃	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -i-C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅ -CH ₃	-H	Фарнезол	-H
Бактериохлорофилл <i>e</i>	-CH-CH ₃ OH	-CHO	-C ₂ H ₅ -C ₃ H ₇ -i-C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅	-H	Фарнезол	-CH ₃

* Связь между C-3 и C-4 насыщенная

одним пиком поглощения при 810 нм, тогда как в клетках *Chloroflexus* Бхл *a* дает два отчетливых пика при 808 и 868 нм.

Каротиноиды являются так называемыми дополнительными пигментами фототрофных организмов. Они поглощают свет в спектральной области от 400 до 550 нм. У пурпурных бактерий это в основном алифатические C₄₀-соединения (тетратерпеноиды) с третичными гидроксильными и метоксигруппами (ликопин, родопин, спириллоксантин, сфероидин). Оксогруппы и альдегидные группы могут придавать им темно-красную окраску (сфероиденон, окенон, родопиналь). Обнаружены также каротиноиды с ароматическими кольцами (арилкаротиноиды) — производные γ- или β-каротина. Эти каротиноиды встречаются у представителей лишь немногих родов (окенон — у некоторых Chromatiaceae; хлоробактин является типичным каротиноидом зеленых, а изорениератин — коричневых видов *Chlorobium*).

Каротиноиды выполняют две функции: с одной стороны, они участвуют в фотосинтезе как светособирающие пигменты, т.е. поглощают световую энергию и передают ее хлорофиллу; с другой стороны, они предохраняют хлорофилл от фотоокисления. Сине-зеленые мутантные формы пурпурных бактерий, лишенные каротиноидов, способны расти только на слабом свете, а при высокой интенсивности света гибнут.

Из различий в спектрах поглощения зеленых водорослей, цианобактерий, пурпурных бактерий и зеленых бактерий можно заключить, что разные группы фототрофных организмов используют для фотосинтеза свет разных участков спектра. Это связано с условиями освещения в естественных местах обитания разных фототрофных организмов. Найденные различия используют при получении накопительных культур некоторых фототрофных бактерий (см. рис. 12.13).

Локализация пигментов. Фотосинтетические пигменты у пурпурных бактерий связаны с внутренними мембранами – везикулярными или трубчатыми выростами плазматической мембраны, которые сохраняют с ней связь, но проникают в толщу цитоплазмы. У разных видов бактерий такие мембраны имеют разную форму. Это могут быть трубочки, везикулы (пузырьки) или скопления ламелл (располагающихся концентрически или же в виде стопок); иногда они заполняют всю внутренность клетки (см. рис. 2.23). Фрагменты мембран, освобождаемые при разрушении клеток в виде везикул и отделяемые центрифугированием, называют «хроматофорами». В клетках зеленых бактерий пигменты связаны с различными структурами: светособирающие пигменты – главным образом с хлоросомами, а пигменты реакционных центров – с плазматической мембраной (см. рис. 2.4 и 12.9).

Регуляция синтеза пигментов и тилакоидов. Синтез фотопигментов зависит от условий роста организмов, прежде всего от освещенности и (у факультативных анаэробов) от присутствия кислорода. Содержание пигмента в клетках тем выше, чем ниже была освещенность во время их роста. Кислород тоже влияет на образование пигментов: так же как и яркий свет, он подавляет образование мембранных структур, содержащих пигменты, а тем самым и синтез бактериохлорофиллов и каротиноидов. Количество фотосинтетических пигментов изменяется параллельно с изменением числа везикул и трубочек (внутриклеточных мембран), выявляемых в клетках с помощью электронного микроскопа. Кислород, кроме того, ингибирует некоторые ферментативные этапы синтеза бактериохлорофилла. Наиболее высокое содержание фотопигментов, а также несущих пигмент везикул и трубочек можно обнаружить в клетках, выросших в анаэробных условиях при слабом освещении.

12.1.2 Метаболизм

Исследование обмена веществ у фототрофных бактерий сопряжено с рядом трудностей. Эти бактерии часто отличаются большой разносторонностью. Например, многие несерные пурпурные бактерии способны как

к анаэробному росту на свету, так и к аэробному росту в темноте; другие группы представлены строгими анаэробами и облигатными фототрофами. Многие виды используют в качестве донора электронов молекулярный водород, а некоторые – сероводород или серу. Наблюдается ассимиляция CO_2 и органических веществ. В анаэробных условиях в темноте за счет брожения может получаться небольшое количество энергии, недостаточное, однако, для роста большинства видов. Короче говоря, фототрофные бактерии относятся к организмам, наиболее разносторонним в отношении обмена веществ. Поэтому здесь мы можем лишь глобально охарактеризовать их физиологические возможности.

Фиксация CO_2 . Почти все до сих пор изученные фототрофные бактерии способны связывать CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле. При этом для восстановления 3-фосфоглицерата пурпурные и зеленые бактерии используют не NADPH_2 (как зеленые растения), а NADH_2 . Помимо этого в ассимиляции CO_2 участвуют реакции восстановительного карбоксилирования, зависящие от ферредоксина или NAD(P) . Фиксация CO_2 либо обеспечивает возможность полностью автотрофного роста, либо при одновременном усвоении каких-либо сильно восстановленных органических соединений (например, жирных кислот) служит для поддержания определенного окислительно-восстановительного уровня веществ клетки. Виды *Chlorobium* ассимилируют CO_2 через восстановительный цикл трикарбоновых кислот.

Доноры водорода. Анаэробные фототрофные бактерии нуждаются в экзогенном доноре водорода. Они способны использовать H_2 , сероводород, элементарную серу, тиосульфат, органические кислоты, спирты, сахара и даже некоторые ароматические соединения. Молекулярный водород используется очень многими, но отнюдь не всеми фототрофными бактериями. Мелкие виды *Chromatium*, некоторые виды *Rhodobacter* (например, *R. capsulata*), родоспириллы и *Chlorobium* растут на свету, используя H_2 и CO_2 . Квантовый выход при этом примерно так же высок, как и при окисленном фотосинтезе. Он составляет как у *Rhodospseudomonas acidophila*, так и у цианобактерии *Anabaena cylindrica* 8 молей квантов на 1 моль фиксированной двуокиси углерода.

Некоторые пурпурные несерные бактерии, пурпурные серные бактерии и зеленые серобактерии окисляют сероводород до сульфата. У большинства пурпурных серных бактерий в клетках в качестве промежуточного продукта временно откладывается сера. По-видимому, количественное преобладание крупных представителей *Chromatium* в естественных местообитаниях (прудах) связано с их способностью быстро окислять H_2S на свету и аккумулировать серу; при этом внутриклеточная сера служит резервом восстановительной силы и позволяет ассимилировать CO_2 на свету без поступления доноров водорода извне. В случае использования тиосульфата следует делать различие между сульфановой и сульфоновой серой; только сульфановая сера может откладываться в клетках, сульфоночная же поступает в окружающую среду в виде сульфата.

Некоторые виды *Chlorobium* в основном окисляют сероводород только до серы, которая выделяется в среду. Такие бактерии особенно хорошо растут в сообществе с *Desulfuromonas acetoxidans*; этот вид с «анаэробным дыханием» восстанавливает серу до H_2S и окисляет при этом этанол или ацетат. *Chlorobium* и *Desulfuromonas* представляют типичный пример функциональной ассоциации, или синтрофии, двух микроорганизмов (см. разд. 9.3).

Темновой метаболизм. Многие пурпурные несерные бактерии и *Chloroflexus* способны к аэробному росту в темноте, если в их распоряжении имеются органические субстраты. Следовательно, они обладают компонентами дыхательного обмена, включая цикл трикарбоновых кислот. Последний участвует в метаболических превращениях также и в анаэробных условиях на свету. Использование большого числа органических кислот и сахаров некоторыми представителями Chromatiaceae и Rhodospirillaceae указывает на то, что метаболизм этих фототрофных бактерий хотя и варьирует, однако протекает в принципе по общеизвестным путям (таким, как фруктозобисфосфатный путь, путь Энтнера–Дудорова, цикл трикарбоновых кислот и др.).

Поскольку фототрофные бактерии должны выживать и ночью, не удивительно, что и в анаэробных условиях в темноте все же происходят энергетические процессы. Источником энергии является брожение, при котором донорами водорода служат резервные вещества, а акцептором водорода – сера (там, где она имеется). Конечные продукты анаэробного темнового метаболизма – CO_2 , ацетат, пропионат и сероводород. Однако в анаэробных условиях в темноте могут расти лишь отдельные виды фототрофных бактерий.

Образование H_2 на свету. Некоторые представители пурпурных бактерий способны на свету в присутствии подходящих органических или неорганических доноров водорода выделять молекулярный водород. Образование H_2 зависит от отношения C/N в субстратах, содержащихся в среде, и ингибируется свободными ионами аммония. N_2 тоже обратимо подавляет выделение клетками молекулярного водорода. Фотообразование H_2 связано с побочной функцией нитрогеназы; этот фермент способен восстанавливать наряду с N_2 также и протоны, что ведет к образованию молекулярного водорода. Поэтому при избытке энергии и восстановительной силы происходит выделение H_2 .

Фиксация молекулярного азота. Подавляющее большинство исследованных пурпурных и зеленых бактерий способно фиксировать азот. Однако скорость их роста за счет использования N_2 , как правило, ниже, чем в присутствии ионов аммония.

Запасные вещества. Из запасных веществ для фототрофных бактерий характерны поли- β -гидроксимасляная кислота, полисахариды и полифосфаты. В зависимости от условий роста представители Chromatiaceae могут содержать также включения серы, которая находится в клетках в виде орторомбической серы.

12.1.3 Распространение фототрофных бактерий

Фототрофные пурпурные и зеленые бактерии обитают в анаэробных зонах многих водоемов, в мелководных прудах, медленно текущих водах, в озерах и морских бухтах. Пурпурные серобактерии нередко образуют налеты, окрашенные во всевозможные оттенки красного цвета, от нежно-розового до темно-красного, на поверхности ила или на каком-нибудь разлагающемся растительном материале. Иногда они роятся над поверхностью ила, образуя слой толщиной около дециметра. Такое «цветение» воды в мелких водоемах (рис. 12.12) вызывают в первую очередь крупные представители пурпурных бактерий – *Chromatium okenii*, *C. warmingii*, *C. weissii* и *Thiospirillum jenense*, однако встречаются и мелкие представители Chromatiaceae и Chlorobiaceae. Бурное размножение пурпурных серобактерий наблюдается и в таких мелководных прудах, поверхность которых покрыта плотным слоем ряски (*Lemna*) или же листьями водяных лилий. Этот своеобразный биологический фильтр поглощает те спектральные компоненты света, которые могли бы использоваться зелеными водорослями и цианобактериями, но пропускает свет, поглощаемый бактериохлорофиллами и темно-красными каротиноидами. Поэтому под покровом из ряски растут анаэробные фототрофные бактерии, но не развиваются зеленые водоросли и цианобактерии (рис. 12.12). Некоторые виды фототрофных серобактерий предста-

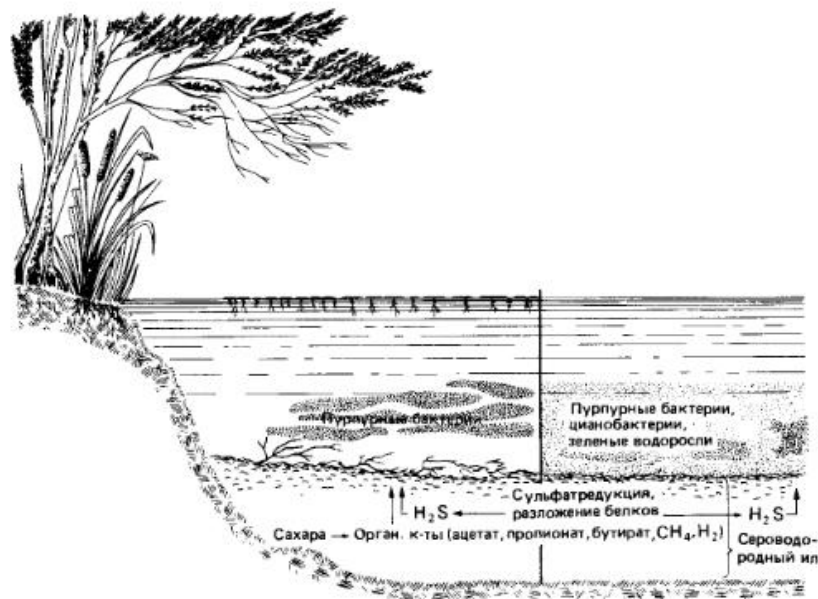


Рис. 12.12. Профиль неглубокого водоема, где наблюдается массовое развитие серных пурпурных бактерий.

влены в естественных местообитаниях почти чистой культурой. Всегда можно обнаружить и *Rhodospirillaceae*, но лишь редко в столь массовом количестве.

Сезонное массовое развитие пурпурных серных бактерий наблюдается также в анаэробных зонах озер ниже области температурного скачка (термоклина, см. рис. 17.1). Бактерии находят здесь необходимые им вещества — сероводород, CO_2 и органические соединения. Инфракрасное солнечное излучение, конечно, не проникает на глубину 10–30 м; на такой глубине максимум энергии приходится на синюю и сине-зеленую области спектра (450–500 нм), т.е. именно на ту область, где поглощают каротиноиды. Это делает понятным относительно высокое содержание каротиноидов у пурпурных бактерий, определяющее их окраску: каротиноиды (подобно фикозеритринам у красных водорослей и цианобактерий) делают возможным у пурпурных бактерий фотосинтетический метаболизм на больших глубинах. Соответственно на таких глубинах и среди зеленых серобактерий преобладают богатые каротиноидами коричневые формы (*Chlorobium phaeobacteroides*, *C. phaeovibrioides*, *Pelochromatium*).

12.1.4 Накопительные культуры

Метод отбора анаэробных фототрофных бактерий основан на том (описанном выше) наблюдении, что пурпурные серные бактерии достигают иногда массового развития и в мелких водоемах, если вся поверхность воды покрыта плотным слоем ряски. С помощью фильтров, поглощающих коротковолновую часть спектра и пропускающих инфракрасные лучи, используемые лишь отдельными группами фототрофных бактерий, можно создать селективные условия для роста как зеленых серобактерий, так и пурпурных бактерий, содержащих бактериохлорофилл *a* или *b*.

Будут ли в накопительной культуре («колонке Виноградского», рис. 12.13) развиваться преимущественно пурпурные или зеленые бактерии, зависит от имеющихся доноров водорода и от концентрации H_2S . Если цилиндр, в котором находятся песок, почва и яичный белок, заполнить водой, а затем внести в него инокулят из места обитания фототрофных бактерий, то на свету будут развиваться виды *Rhodospirillaceae*. Если же, добавив сульфат кальция, обеспечить постоянное образование H_2S в результате восстановления сульфата, то рост пурпурных несерных бактерий будет подавлен и доминировать будут серные бактерии. В синтетических питательных растворах, содержащих витамин B_{12} , можно получать накопительные культуры различных видов зеленых и пурпурных бактерий, более тонко варьируя такие факторы, как концентрация сероводорода и питательных солей, pH, температура и интенсивность света. Формы, отличающиеся особой чувствительностью к условиям среды, например бактерии, образующие газовые вакуоли, нуждаются обычно в более низких концентрациях H_2S , более

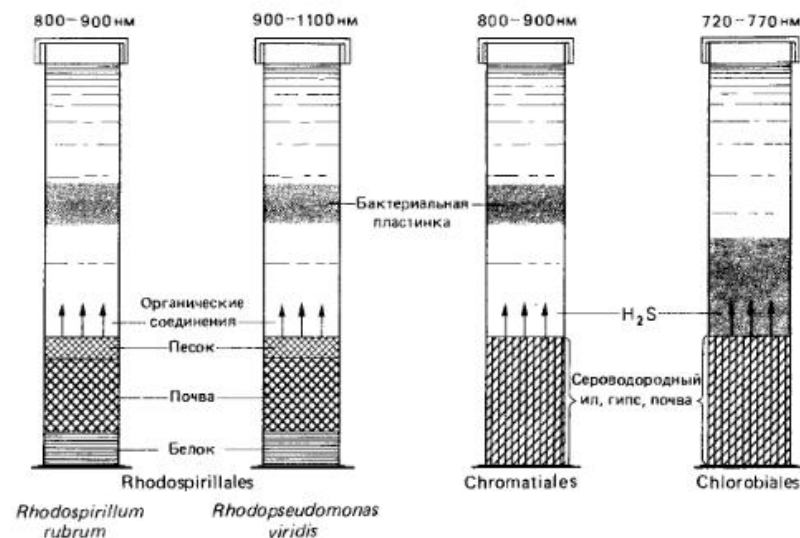


Рис. 12.13. Накопительные культуры фототрофных бактерий в «колонках Виноградского». Числа над колонками отражают спектральные характеристики светофильтров, под которыми наблюдается предпочтительное развитие указанных видов и групп бактерий. Через несколько дней после заполнения колонок и засева среды прудовым илом и водой в толще воды образуются красные или зеленые «бактериальные пластинки».

низких температурах и меньшей интенсивности света. При получении накопительных культур отдельных видов *Rhodospirillaceae* решающую роль играют выбор донора водорода и присутствие некоторых витаминов (биотина, *n*-аминобензойной кислоты, тиамина, никотиновой кислоты).

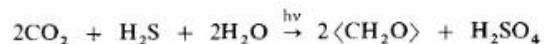
12.2 Первичные процессы фотосинтеза

Под фотосинтезом понимают происходящее в клетках фототрофных организмов преобразование световой энергии в биохимически доступную энергию (АТФ) и восстановительную силу [NAD(P)H_2], а также связанный с этим синтез клеточных компонентов. Фотосинтетическое фосфорилирование и фотосинтетическое восстановление пиридиннуклеотида — это процессы, ведущие к образованию первых стабильных продуктов фотосинтеза.

К такому пониманию пришли в результате экспериментальных и теоретических исследований, основанных главным образом на сравнении фотосинтеза у фототрофных бактерий и у зеленых растений. После того как Виноградский (1888) установил, что для некоторых бактерий источником энергии при ассимиляции CO_2 отнюдь не всегда служит свет, а Энгельман (1883–1888) на основании своих физиологических исследований отнес пурпурные бактерии к фототрофным

организмам. Будар (1919) показал, что эта группа бактерий обладает новым, не известным ранее типом метаболизма. Серные и несерные пурпурные бактерии ассимилируют CO_2 или органические вещества на свету. Однако такого рода фотосинтез существенно отличается от фотосинтеза высших растений: 1) вода здесь не может служить донором водорода, и поэтому такой фотосинтез не сопровождается выделением O_2 ; 2) бактерии используют в качестве доноров водорода не воду, а H_2S или органические вещества.

Количественные исследования, проведенные на пурпурных серобактериях (ван Ниль, 1931), позволили вывести уравнение ассимиляции:



Если сравнить первое из этих уравнений с уравнением, описывающим фотосинтез у зеленых растений, можно заметить удивительную аналогию:

У *Chromatium*



У зеленых растений



Эта аналогия позволяет заключить, что в бактериальном фотосинтезе роль воды выполняет сероводород. Выведенное отсюда общее уравнение фотосинтеза



позволило выдвинуть гипотезу, согласно которой в основе всякого фотосинтеза лежит один и тот же первичный процесс, а разные типы фотосинтеза отличаются друг от друга только природой донора водорода (вода, сероводород или органические вещества). Этот общий первичный процесс видели сначала в фотолизе воды ($\text{H}_2\text{O} + h\nu \rightarrow [\text{H}] + [\text{OH}]$) – в разложении ее на восстановительный и окислительный компоненты. Считали, что бактерии нуждаются в экзогенном доноре водорода H_2A , с помощью которого они восстанавливают окислительный компонент до воды, тогда как зеленые растения приобрели способность отщеплять от окислительного компонента кислород ($4[\text{OH}] \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Сейчас от этой концепции, рассматривающей разложение воды как первичный процесс фотосинтеза, пришлось отказаться, однако идея о переносе восстановительных эквивалентов с помощью энергии света сохраняется и в современной теории фотосинтеза.

Первыми стабильными продуктами фотосинтеза являются АТФ и восстановительная сила. Эти продукты можно обнаружить как в интактных клетках и выделенных из них хлоропластах (у зеленых растений), так и в суспензиях фотосинтетических мембранных везикул из пурпурных бактерий. Фиксация CO_2 не обязательно сопряжена со световой реакцией. Она может происходить и как «темновая реакция», не зависящая от пигментсодержащих структур, при наличии АТФ и NAD(P)H_2 . Эти два процесса разделены и в пространстве: фотосинтез

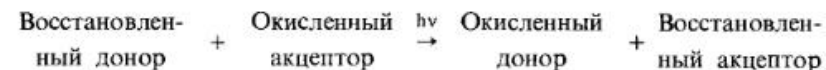
происходит в мембранах и на их поверхности, а фиксация CO_2 – в цитоплазме или в строме хлоропластов. Как уже говорилось, кислородный фотосинтез цианобактерий и растений отличается от анаэробного фотосинтеза анаэробных фототрофных бактерий используемым донором водорода. Для того чтобы донором могла служить вода, необходимо последовательное осуществление двух фотореакций. Для использования же доноров с более отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом достаточно одной-единственной фотореакции. Так как первичные процессы при кислородном фотосинтезе изучены лучше, чем при анаэробном, их мы и рассмотрим в первую очередь.

12.2.1 Кислородный фотосинтез

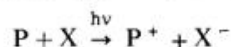
Первичные процессы фотосинтеза протекают в *тилакоидах* – плоских замкнутых мембранных пузырьках, содержащихся в клетках цианобактерий и в хлоропластах водорослей и высших растений.

Тилакоидные мембраны и светособирающие пигменты (пигменты антенны). Тилакоидная мембрана содержит в себе пигментные молекулы (хлорофилл *a*, хлорофилл *b* и каротиноиды), переносчики электронов и ферменты. Подавляющее большинство молекул хлорофилла ($\geq 99,5\%$), а также дополнительные пигменты (каротиноиды, фикобилипротеины) ответственны за поглощение света и распределение энергии; они образуют систему антенны. Лишь незначительная часть хлорофилла *a* выполняет роль фотохимического реакционного центра, в котором протекает собственно фотохимическая окислительно-восстановительная реакция. Пигменты антенн (светособирающие пигменты) улавливают свет и передают энергию хлорофиллу реакционного центра (Каротиноид \rightarrow Каротиноид*; Хлорофилл + Каротиноид* \rightarrow Хлорофилл* + Каротиноид). Каротиноиды выполняют также защитную функцию: при очень ярком солнечном освещении они отдают избыточную энергию в окружающую среду и тем самым защищают молекулы хлорофилла от фотоокисления. Система светособирающих пигментов и реакционный центр объединены в так называемую фотосинтетическую единицу.

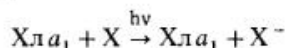
Фотореакции. Фотореакции относятся к первичным процессам любого фотосинтеза. Местом, где протекают эти фотохимические окислительно-восстановительные реакции, являются **реакционные центры**. Реакционный центр состоит из ряда компонентов, наиболее важные из которых – первичный донор электронов (особый комплекс из хлорофилла и белка) и первичный акцептор электронов. Эти два компонента представляют собой окислительно-восстановительные системы. Система донора (P/P^+) обладает положительным, а система акцептора (X/X^-) – отрицательным потенциалом. Под воздействием энергии света происходит перенос одного электрона:



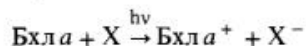
Вместо этого можно написать



Следовательно, первую фотореакцию можно представить следующим образом:



Аналогичным образом можно представить и фотореакцию у пурпурных бактерий:



Таким образом, в результате фотореакции донор теряет один электрон – возникает «дырка» (электронный дефект). Такие «дырки» должны заполняться электронами, которые могут поступать сюда по одному из двух путей – по пути **нециклического** или **циклического переноса электронов**. При нециклическом переносе электроны поступают от экзогенного внешнего донора: в случае второй фотореакции – от молекул воды, в случае первой реакции – из электрон-транспортной цепи, связывающей обе фотосистемы между собой. При циклическом переносе электроны возвращаются от восстановленного акцептора (X^-) к окисленному донору. Фотохимическая окислительно-восстановительная реакция, в ходе которой P окисляется, а X восстанавливается, представлена на следующей схеме:



Циклический перенос электронов приводит к изменению заряда мембраны, а нециклический перенос – кроме того, и к восстановлению NADP.

Две фотореакции в двух пигментных системах (фотосистемах). При окисленном фотосинтезе работают две пигментные системы, включенные последовательно (рис. 12.14). Пигментную систему, возбуждаемую более длинноволновым светом ($\lambda < 730$ нм), называют фотосисте-

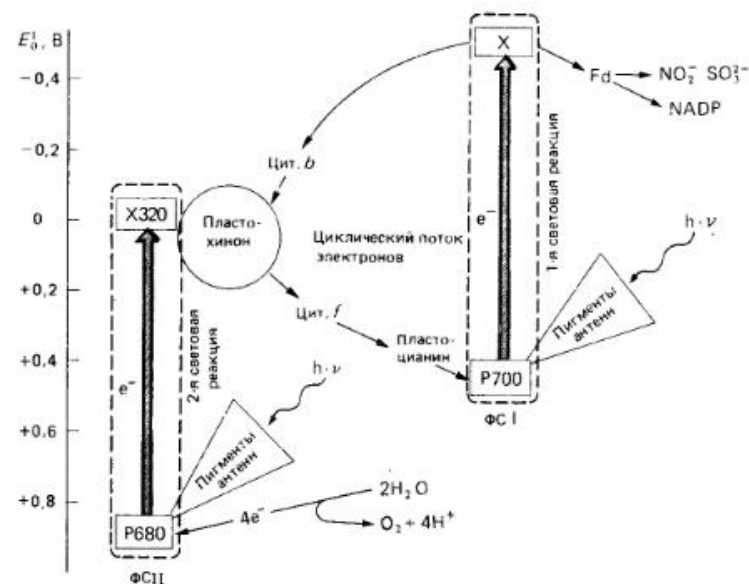


Рис. 12.14. Фотосинтетический перенос электронов («Z-схема»). По вертикали – окислительно-восстановительный потенциал. P700 – Хл a_1 , донор электронов фотосистемы I (ФС I); P680 – Хл a_{11} , донор электронов фотосистемы II (ФС II); X320 – акцептор электронов ФС II; X – акцептор электронов ФС I, белок, содержащий железо и серу; Fd – ферредоксин; Цит – дитохром. Фотохимические реакционные центры заключены в красные рамки. (Объяснение в тексте.)

мой I, а возбуждаемую более коротковолновым светом ($\lambda < 700$ нм) – фотосистемой II. Фотохимически активный реакционный центр фотосистемы I содержит Хл a_1 (P700), играющий роль первичного донора электронов в первой фотореакции. Световая энергия, поглощаемая светособирающими пигментами фотосистемы I, передается в реакционный центр и переводит в возбужденное состояние Хл a_1 . Это приводит к окислению Хл a_1 , т.е. к отдаче им одного электрона. Хл a_1 превращается при этом в Хл a_1^+ . Другими словами, в результате отдачи электрона в реакционном центре образуется «дырка», или «электронная вакансия». Эта «дырка» тотчас же заполняется другим электроном, поступающим по специальному электрон-транспортному пути. Акцептором отданного электрона, по-видимому, служит железосерный белок («X»). Он обладает еще более отрицательным окислительно-восстановительным потенциалом, чем – 420 мВ, возможно – 530 мВ. Этот акцептор в свою очередь отдает электрон ферредоксину, а с восстановленного ферредоксина восстановительная сила может передаваться на NADP или другие акцепторы. Наряду с этим возможен и циклический перенос электрона, при котором электрон от «X» передается через пластохинон,

цитохромы и пластоцианин обратно к хлорофиллу a_1^+ реакционного центра.

Реакционный центр фотосистемы II содержит Хл a_{11} (P680), который служит первичным донором электронов во второй фотореакции. Получив энергию, поглощенную светособирающими пигментами фотосистемы II, этот хлорофилл переходит в возбужденное состояние. Возбуждение Хл a_{11} ведет к эмиссии одного электрона, являющегося слабым восстановителем ($E'_0 \approx 0$ В). Этот электрон принимает молекула особого пластохинона (X320), который при этом восстанавливается до семихинона. Донором электронов для фотосистемы II служит вода. «Дырка», образовавшаяся в Хл a_{11} в результате потери электрона, заполняется одним из электронов, освобождающихся при образовании O_2 из воды ($2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$). Разложение воды происходит при участии марганца.

Две описанные выше пигментные системы связаны между собой электрон-транспортной цепью, важным звеном которой является пластохинон. Подобно убухинону в дыхательной цепи, пластохинон в фотосинтетической электрон-транспортной цепи находится в большом избытке и выполняет функцию накопителя (депо) электронов. Этот накопитель может вмещать не менее 10 электронов (на 1 молекулу Хл a_{11}), поступающих от X320. Окисление пластохинона осуществляет фотосистема I, т.е. электроны «накопителя» расходуются на заполнение «дырок» в Хл a_1^+ . От пластохинона электроны передаются цитохрому f (мембраносвязанному цитохрому типа c), затем пластоцианину (растворимый медьсодержащий белок) и, наконец, хлорофиллу a_1^+ . Таким образом, пластохинон выполняет важную функцию накопления и дальнейшей передачи электронов, поступающих из нескольких (как минимум десяти) электрон-транспортных цепей.

Основные пути транспорта электронов в ходе первичных процессов фотосинтеза показаны на рис. 12.14. Это известная *Z-схема* — результат исследований, в которых использовались методы импульсной спектроскопии, а также искусственные доноры и акцепторы электронов и специфические ингибиторы. Она дает представление об окислительно-восстановительных потенциалах пигментов и переносчиков электронов и о последовательности их окисления и восстановления, но ничего не говорит о локализации этих компонентов в мембране.

Локализация пигментов и переносчиков электронов в мембране. Некоторые сведения по этому вопросу были получены при исследовании функций тилакоидов в присутствии антител, а также липофильных или гидрофильных искусственных окислительно-восстановительных систем. Иммуные антитела, полученные против отдельных очищенных компонентов фотосинтетической электрон-транспортной системы, не в состоянии проникать сквозь мембрану и реагируют поэтому только с теми компонентами, которые расположены на наружной поверхности тилакоидов. Например, антитела к ферредоксину или к ферредоксин-NADP-редуктазе эффективно подавляют функцию фотосистемы I; значит, эти

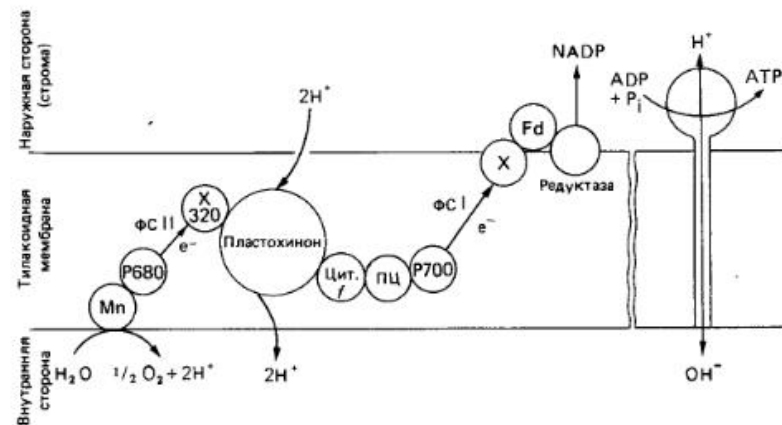
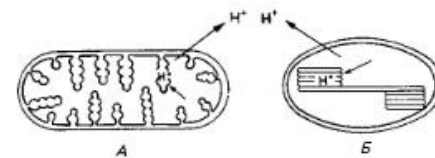


Рис. 12.15. Схема пространственной ориентации электрон-транспортной системы внутри тилакоидной мембраны. Компоненты расположены на мембране и в ее толще таким образом, что происходит направленный перенос электронов через мембрану. Mn — марганцевый комплекс; ПЦ — пластоцианин; Цит. f — цитохром f ; Fd — ферредоксин; X — белок, содержащий железо и серу. (См. также рис. 12.14.)

два компонента находятся на внешней поверхности тилакоидов. В то же время поверхность, на которой расположены доноры электронов, недоступна для антител. Хотя данные о структурной организации фотосистемы II еще весьма противоречивы, уже можно привести гипотетическую схему (рис. 12.15). Эту схему пространственной ориентации направленного фотосинтетического транспорта электронов внутри тилакоидной мембраны следует отличать от схемы на рис. 12.14, где компоненты расположены по вертикали в соответствии с их окислительно-восстановительными потенциалами. Схема на рис. 12.15 наглядно показывает, что электроны, освобождающиеся в результате расщепления воды, переносятся из внутреннего пространства тилакоидов в строму.

Направленный транспорт электронов и создание протонного градиента. Представления о локализации компонентов фотосинтетической электрон-транспортной цепи согласуются с данными физиологических наблюдений и измерений. Если суспензию тилакоидов или разрушенных хлоропластов подвергнуть воздействию света, то pH суспензионной среды возрастает, а после выключения света снова понижается. Свет вызывает передвижение протонов внутрь тилакоидов (рис. 12.16). Таким

Рис. 12.16. Перенос протонов в клетках и органеллах за счет энергии света. А. *Rhodobacter (Rhodospseudomonas) sphaeroides*. Б. Хлоропласт. (Объяснение в тексте.)



образом, световая энергия может использоваться для создания градиента протонов на тилакоидной мембране. Еще раньше было известно, что повышение рН в суспензии тилакоидов с 4 до 8 (в темноте) приводит к синтезу АТФ. Подобного рода эксперименты легли в основу гипотезы о хемиосмотическом механизме преобразования энергии. Более детальные исследования показали, что перенос одного электрона через обе фотосистемы сопровождается поступлением двух протонов во внутреннее пространство тилакоида. Как сейчас полагают, две фотосистемы вместе со связывающей их электрон-транспортной цепью обеспечивают направленный поток электронов от воды (с внутренней стороны тилакоидной мембраны) к NADP (с внешней стороны). Таким образом, фотореакции ведут к восстановлению NADP и образованию заряда на мембране. Иными словами, световые реакции выступают в роли *протонного насоса*, который работает за счет энергии света и создает положительный заряд внутри тилакоида; в результате мембрана аккумулирует энергию в форме протонного потенциала, и эта энергия используется для синтеза АТФ. Протонный потенциал связывает фотосинтетический транспорт электронов с фосфорилированием таким же образом, как он связывает с фосфорилированием транспорт электронов при дыхании (см. стр. 245).

12.2.2 Аноксигенный фотосинтез

Фотосинтетический транспорт электронов у анаэробных фототрофных бактерий во многих отношениях отличается от только что описанного. В аноксигенном фотосинтезе участвует только одна световая реакция; она поддерживает циклический транспорт электронов. Электроны, покидающие цикл для восстановления NAD, не являются продуктом разложения воды. Фотосинтез зависит от наличия в среде восстановленных субстратов и не сопровождается выделением O_2 . Собственно фотореакция хотя и аналогична первой фотореакции у зеленых растений, однако у некоторых бактерий она приводит, вероятно, лишь к созданию протонного потенциала и тем самым к запасанию энергии (АТФ), но не к восстановлению NAD. Таким образом, нециклический перенос электронов (от донора электронов к пиридиннуклеотиду) здесь отсутствует. По-видимому, $NADH_2$ образуется в результате какой-то темновой реакции в ходе обратного транспорта электронов, протекающего с затратой энергии.

Следует, однако, заметить, что у фототрофных бактерий между отдельными группами существуют гораздо большие различия в составе пигментов и механизмах фотосинтеза, чем у зеленых растений. В последующем изложении мы вначале не будем касаться зеленых бактерий.

Фотореакция у пурпурных бактерий. Как уже говорилось, у пурпурных бактерий пигменты и компоненты электрон-транспортной системы тоже находятся в мембранах. Пигментный комплекс фотохимического реакционного центра удается отделить от пигментов антенны.

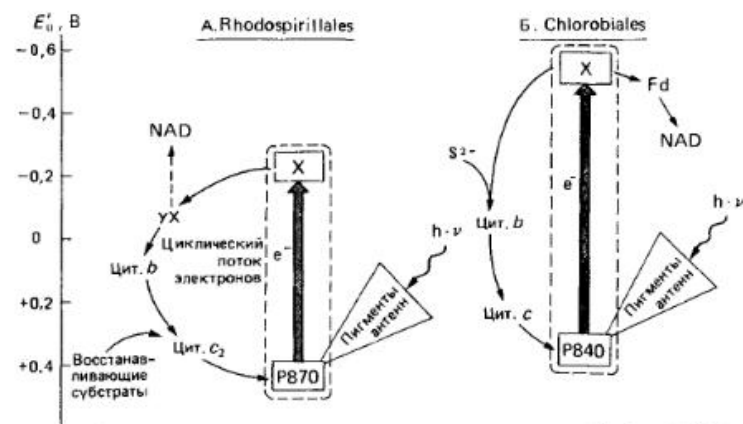


Рис. 12.17. Схема фотосинтетического переноса электронов у *Rhodospirillales* и *Chlorobiales* (по вертикали — окислительно-восстановительный потенциал.) Цит. — цитохром; Fd — ферредоксин; УХ — убихинон; P870 или P840 — Бхл *a* [донор электронов реакционного центра (РЦ)]; X — акцептор электронов РЦ. Фотохимический реакционный центр заключен в красную рамку. (Объяснение в тексте.)

Энергия, поглощенная пигментами антенны (бактериохлорофиллом и каротиноидами) передается реакционным центрам. Изолированные реакционные центры состоят из белкового комплекса, содержащего Бхл *a*, бактериофеофитин, каротиноиды, убихинон и железосерный белок (FeS-белок). Пигмент реакционного центра обозначают P870 — по длине волны, при которой максимально снижается поглощение под действием света. На свету P870 окисляется в $P870^+$. Окислительно-восстановительный потенциал этого донора электронов лежит между +450 и +490 мВ. Первичным акцептором электронов, вероятно, служит комплекс убихинона с FeS-белком. Окислительно-восстановительный потенциал этого комплекса должен быть близок к -100 мВ. Поэтому кажется маловероятным, что электроны, возбуждаемые при световой реакции у пурпурных бактерий, способны восстанавливать NAD. Скорее, они возвращаются через убихинон, цитохромы *b* и *c* и, возможно, FeS-белки назад к $P870^+$ (рис. 12.17). Необходимые же для восстановления NAD электроны, видимо, покидают путь циклического транспорта. Они переносятся на NAD в результате обратного транспорта, протекающего с затратой АТФ. Это существенное отличие от в остальном аналогичной первой фотореакции при оксигенном фотосинтезе. Для пополнения цикла электронами пурпурные бактерии нуждаются во внешних донорах электронов. Пурпурные серобактерии могут использовать с этой целью сероводород, серу или тиосульфат; органические соединения (малат, сукцинат и др.) и молекулярный водород служат донорами электронов для обеих групп пурпурных бактерий.

Как показали многочисленные эксперименты, и у пурпурных бактерий фотосинтетический перенос электронов приводит к созданию про-

тонного градиента. Интактные клетки реагируют на воздействие света выделением в среду протонов, приводящим к закислению среды. В суспензии пузырьков из фотосинтетических мембран (хроматофоров) свет вызывает перенос протонов, направленный внутрь. Таким образом, мембраны хроматофоров и тилакоидов имеют такую же полярность, как и субмитохондриальные пузырьки. Это будет понятно, если учесть, что все эти мембраны образуются путем впячивания внутрь и разрастания плазматической мембраны или же внутренней мембраны хлоропласта. Хотя точная локализация отдельных компонентов в мембране еще не установлена, можно думать, что переносчики водорода и электронов расположены и в мембране анаэробных фототрофных бактерий таким образом, что происходит разделение зарядов. В хроматофорах электроны транспортируются наружу, а протоны — внутрь. Создающийся протонный потенциал и служит движущей силой фотосинтетического фосфорилирования.

Фотореакция у зеленых бактерий. Механизмы фотореакции у зеленых бактерий еще не полностью выяснены. Есть указания на то, что первичный акцептор электронов, участвующий в световой реакции, у зеленых серобактерий обладает потенциалом около -500 мВ (у пурпурных бактерий — всего лишь -100 мВ!). При столь большом отрицательном потенциале становится возможным прямое использование электронов от первичного акцептора для восстановления ферредоксина и пиридиннуклеотида (рис. 12.17). Таким образом, восстанавлительную силу *Chlorobiaceae*, возможно, получают не путем обратного транспорта электронов, требующего затрат энергии. Такая независимость от обратного транспорта электронов была бы важной отличительной чертой фотосинтеза у зеленых бактерий по сравнению с пурпурными. Тогда фотореакция у *Chlorobiaceae* не уступала бы по своей эффективности первой фотореакции цианобактерий. С эволюционной точки зрения фотосинтез зеленых бактерий мог бы быть связующим звеном между фотосинтезом пурпурных бактерий и фотосинтезом цианобактерий и растений¹.

Заключение. В процессе фотосинтеза происходит превращение энергии света в биохимическую энергию. Первичное действие света состоит в том, что в фотохимических реакционных центрах электроны донора переносятся на акцептор в термодинамически невыгодном направлении. По крайней мере часть электронов возвращается по электрон-транспортной цепи к реакционным центрам. Благодаря особому расположению компонентов электрон-транспортной системы в мембране это сопровождается направленным переносом протонов и созданием протонного потенциала. Таким образом, аппарат фотосинтеза — это прежде всего протонный насос, приводимый в действие светом. Протонный потенциал обеспечивает возможность преобразования энергии путем фос-

¹ У *Chloroflexaceae* механизм первичных процессов фотосинтеза, видимо, такой же, как у пурпурных бактерий. — *Прим. ред.*

форилирования. Синтез АТФ происходит с помощью тех же в своей основе механизмов, что и в мембранах аэробных бактерий или митохондрий. Что же касается преобразования энергии света в биохимически полезную энергию (АТФ), то здесь нет принципиального различия между фототрофными бактериями и зелеными растениями. У пурпурных бактерий роль фотосинтеза, по-видимому, исчерпывается этим преобразованием. У цианобактерий и зеленых растений можно видеть дальнейший этап эволюции фотосинтеза. У них благодаря последовательному включению двух фотореакций энергетический уровень электронов в ходе первой реакции удается поднять настолько, что становится возможным восстановление ферредоксина и NADP. Вторая фотореакция позволяет использовать в качестве источника электронов воду. В результате такой комбинации наряду с запасанием энергии происходит восстановление NADP и выделение O_2 .

Процесс фотосинтеза представляет собой химическую реакцию, наиболее часто совершающуюся на нашей планете. Ему мы обязаны как непрерывным синтезом нового органического материала, так и существованием таких видов ископаемого топлива, как уголь, нефть и природный газ. Поэтому те огромные усилия, которые потребовались для раскрытия тайны фотосинтеза, можно считать вполне оправданными. Однако многие проблемы еще не решены. Поэтому наряду с экспериментально доказанными фактами в описанную выше модель фотосинтеза был включен ряд гипотез, для проверки которых нужны дальнейшие настойчивые исследования.

12.3 Использование световой энергии галобактериями

Виды, относящиеся к роду *Halobacterium* (*H. halobium*, *H. cutirubrum*), составляют высокоспециализированную в физиологическом отношении группу бактерий. Места их естественного обитания — высококонцентрированные или насыщенные растворы солей, такие как воды Большого соленого озера в США или растора, где добывают соль путем выпаривания морской воды. Приспособленность бактерий к существованию в столь экстремальных условиях связана с тем, что концентрация соли внутри клеток так же высока, как и в окружающей среде. Оптимальный рост таких бактерий наблюдается в 3,5–5,0 М растворе NaCl. Для нормального функционирования выделенных из клеток ферментов тоже необходимы более чем двухмолярные концентрации соли. Галобактерии относятся к архебактериям (разд. 3.13).

Палочковидные подвижные клетки *H. halobium* окрашены содержащимися в них каротиноидами в красный, оранжевый или желтый цвет. В их плазматической мембране выделяются темно-красные пятна диаметром около 0,5 мкм, занимающие в целом около половины поверхности клетки (рис. 12.18). Эти пятна образованы так называемой *пурпу-*

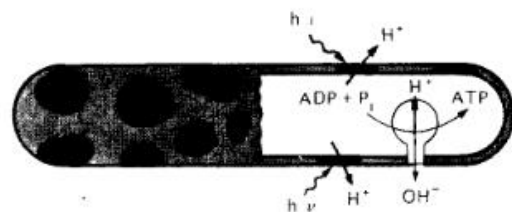


Рис. 12.18. Схематическое изображение *Halobacterium halobium*. Показана плазматическая мембрана (розовая с бляшками пурпурной мембраны); представлено функционирование пурпурной мембраны как протонного насоса, использующего энергию света.

ной мембраной. Ее цвет обусловлен наличием в ней бактериородопсина — пигмента, сходного с родопсином, который содержится в зрительных клетках животных. Благодаря этому пигменту на свету создается протонный градиент между наружной и внутренней сторонами мембраны. Пурпурная мембрана выполняет, таким образом, функцию протонного насоса, приводимого в действие светом, и это ведет к возникновению электрохимического мембранного потенциала. Уравнивание зарядов может сопровождаться синтезом АТФ: пурпурная мембрана делает возможным особый вид фосфорилирования. Преобразованная энергия света дополняет энергию, получаемую путем аэробного окисления субстрата¹.

¹ К галобактериям относится не только род *Halobacterium*, но и другие роды (*Halococcus*, *Haloarcula*, *Natrococcus*, *Natrobacterium*). У большинства этих организмов обнаружена способность к синтезу бактериородопсина при дефиците O_2 . Некоторые галобактерии могут расти, получая энергию только в результате фотосинтеза с участием бактериородопсина.—Прим. ред.

13. Фиксация молекулярного азота

Только прокариоты способны использовать запасы азота, содержащиеся в атмосфере, — фиксировать молекулярный азот. Частью самостоятельно, а частью в симбиозе с высшими растениями они переводят инертный N_2 в органические соединения и включают его (непосредственно или через растения) в белок, который в конечном счете попадает в почву. В результате связывания N_2 клубеньковыми бактериями в симбиозе с растениями семейства бобовых почва ежегодно обогащается азотом в количестве 100–300 кг на 1 га. Свободноживущие азотфиксирующие микроорганизмы вносят в почву 1–3 кг азота на 1 га в год. Кроме того, значительные количества связанного азота могут попадать в почву из атмосферы с осадками. Это дает (в зависимости от загрязненности воздуха) от 3 до 30 кг азота на 1 га в год (см. разд. 1.3).

По приблизительной оценке, в 1974 г. на всем земном шаре было связано $175 \cdot 10^6$ т азота, из них $90 \cdot 10^6$ т на сельскохозяйственных угодьях и $40 \cdot 10^6$ т — в промышленности по методу Габера и Боша. Большую часть азота связывают бактерии рода *Rhizobium* в корневых клубеньках.

13.1 Фиксация азота симбиотическими бактериями

В связи с заметным обогащением почвы связанным азотом его симбиотическая фиксация давно обратила на себя внимание при разных агротехнических приемах (пар, севооборот), и ее стали сознательно использовать в сельском хозяйстве.

На то, что клевер и другие бобовые растения обогащают почву азотом, впервые указал Буссенго. Установление связи между фиксацией азота и корневыми клубеньками бобовых явилось заслугой Хелльригеля и Вильфарта (1886–1888). Бобовые могут расти в отсутствие связанного азота лишь в том случае, если их корни усеяны клубеньками, которые образуются в результате заражения корневых волосков бактериями из почвы (рис. 13.1).

Корневые клубеньки бобовых растений. Бактерии, вызывающие образование клубеньков у бобовых растений (*клубеньковые бактерии*), относятся к роду *Rhizobium*. При свободном существовании в почве эти аэробные грам-отрицательные палочки растут как сапрофиты за счет

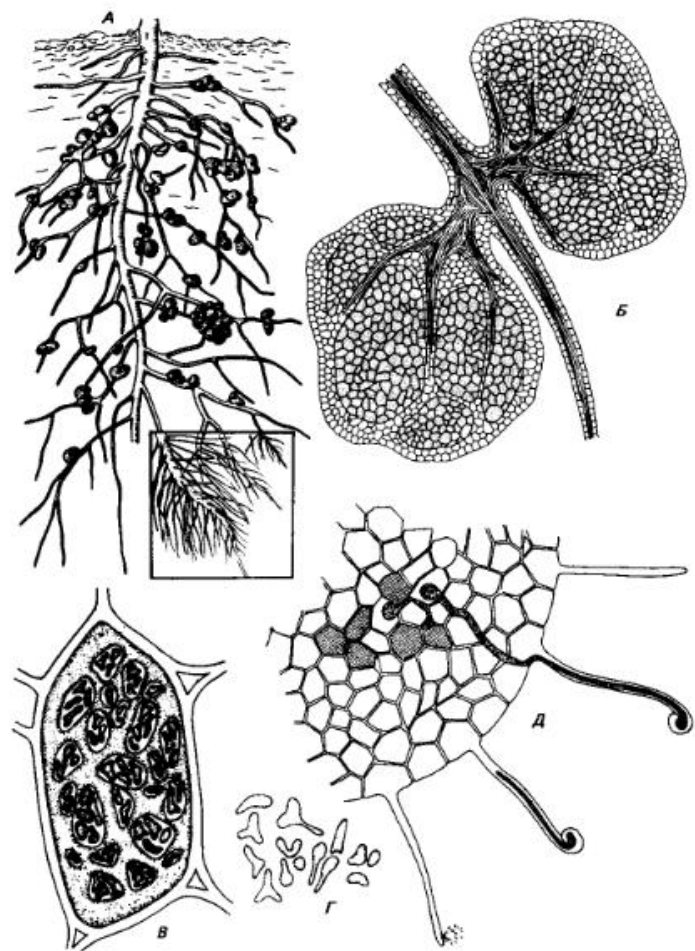


Рис. 13.1. Симбиотическая фиксация азота в корневых клубеньках бобовых. А. Корень гороха с клубеньками. Б. Клубеньки в разрезе. В. Растительная клетка, заполненная бактериями (*Rhizobium*), в разрезе. Г. Бактерии, находящиеся в клетках растения, приобретают необычную форму (бактериоды, инволюционные формы). Д. Внедрение бактерий через кончики корневых волосков и рост инфекционных нитей. Все рисунки сильно схематизированы.

органических соединений. По специфичности в отношении растения-хозяина, а также по некоторым другим признакам различают несколько видов клубеньковых бактерий (*Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini*, *R. japonicum* и др.).

Заражение растения происходит только через молодые корневые волоски (рис. 13.1). Бактерии внедряются на самом конце или около конца

волоска и растут в форме *инфекционной нити* до его основания. Затем такие нити, одетые целлюлозной оболочкой, проникают сквозь тонкие стенки молодых клеток эпидермиса в кору корня. Натолкнувшись здесь на одну из тетраплоидных клеток коры, нить стимулирует деление как самой этой клетки, так и соседних диплоидных клеток. Инфекционные нити разветвляются и распределяются по тетраплоидным клеткам. В результате такого разрастания тканей, вызванного *Rhizobium* при участии ростового вещества, происходит образование клубеньков. Бактерии в клубеньках размножаются очень быстро и образуют крупные клетки неправильной формы (*бактериоды*), объем которых может в 10–12 раз превышать объем свободноживущих *Rhizobium*; бактериоды располагаются по отдельности или группами, окруженные мембраной, в цитоплазме растительных клеток. Ткань, заполненная бактериями, имеет красноватую окраску — она содержит пигмент *леггемоглобин*, родственный гемоглобину. Молекулярный азот фиксируют только те клубеньки, в которых имеется леггемоглобин; «пустые», не содержащие пигмента клубеньки к фиксации азота не способны. Появление пигмента в ткани совпадает по времени с началом фиксации N_2 . При разрушении леггемоглобина с образованием зеленых желчных пигментов (биливердинов) прекращается и связывание азота. Леггемоглобин, по всей вероятности, находится в цитоплазме растительной клетки, а не в пространствах между бактериодами и окружающими их мембранами. Образование пигмента — это специфический результат симбиоза: простетическая группа (протогем) синтезируется бактериодами, а белковый компонент — при участии растения. Леггемоглобин сходен с миоглобином, в клубеньках он представлен в основном Fe(II)-содержащей формой. Этот пигмент обладает высоким сродством к кислороду. Можно предполагать, что леггемоглобин облегчает диффузию кислорода через клетку растения к бактериоду. Благодаря особым свойствам леггемоглобина бактериоды снабжаются кислородом в количестве, достаточном для их роста и для получения энергии, и в то же время не создается слишком высокого парциального давления O_2 , неблагоприятного для фиксации азота бактериодами.

Пока еще недостаточно выяснено, что лежит в основе специфичности симбиоза *Rhizobium* с растением-хозяином. Согласно новой гипотезе, которую сейчас пытаются проверить, уже при первом контакте бактерий с корневым волоском определяется, подходят ли партнеры друг к другу. Бобовые растения содержат лектины — гликопротеины, способные специфически связывать полисахариды. Лектины широко распространены в природе и выполняют, по-видимому, функцию распознавания. Предполагают, что лектины находятся на наружной поверхности корневых волосков; в то же время наружный слой клеточной стенки *Rhizobium* содержит видоспецифичные полисахаридные цепи. Возможно, что именно взаимодействие лектинов корневого волоска с поверхностными полисахаридами *Rhizobium* определяет, будет ли волосок инфицирован.

В том случае, если партнеры совместимы, возникает истинный симбиоз между растением и *Rhizobium*. Растение обеспечивает бактерий пи-

тательными веществами (главным образом сахарами) и создает для них оптимальные условия. Когда растение отмирает, в почву попадает больше жизнеспособных бактерий, чем там могло бы расти без симбиотической ассоциации. Фиксация N_2 происходит только в бактериоидах, причем около 95% фиксированного азота переходит в виде ионов аммония в цитоплазму растения-хозяина.

Помимо корневых клубеньков встречаются также клубеньки на стеблях, содержащие бактериоиды *Rhizobium*; такие стеблевые клубеньки образуются, например, у влаголюбивого бобового растения центральной Африки *Sesbania rostrata*.

Маловероятно, что и свободно живущие в почве ризобии способны фиксировать N_2 . Лишь у немногих штаммов удалось обнаружить в колониях на агаризованной питательной среде нитрогеназу. Образование нитрогеназы в колониях зависело от парциального давления O_2 .

Корневые клубеньки у небобовых растений. У некоторых растений, не относящихся к бобовым, тоже имеются корневые клубеньки, способные фиксировать N_2 . Фиксация азота и здесь основана на симбиозе с прокариотами. В случае эндосимбионтов речь идет в большинстве случаев об актиномицетах, принадлежащих к роду *Frankia*.

Хозяевами актиномицетов-симбионтов могут быть как древесные, так и травянистые растения. Они распространены по всему свету и первыми появляются в местах, где почва бедна азотом. Накопление азота в почве при участии таких растений может достигать 150–300 кг на 1 га в год и имеет поэтому большое хозяйственное значение. К растениям, наиболее эффективно связывающим азот, относятся *Casuarina equisetifolia*, ольха (*Alnus*), облепиха (*Hippophaë*) и *Ceanothus*; менее эффективны в этом отношении восковница (*Myrica*), куропаточья трава (*Dryas*), лох (*Elaeagnus*) и *Shepherdia*.

Корневые клубеньки древесных растений могут достигать размеров теннисного мяча. Они представляют собой густые сплетения корней, разветвленных наподобие кораллов и прекративших рост. У казуарины клубеньки состоят из рыхлого пучка утолщенных корней с отрицательно геотропным ростом. Бактерии-симбионты инфицируют только паренхимные клетки в коре корня. Так же как и у бобовых, инфекция проникает в корни из почвы через корневые волоски; в клубеньках тоже образуется леггемоглобин. Лишь недавно у одного из растений, не относящихся к бобовым, — *Parasponia parviflora* (ильмовые) — был обнаружен в качестве эндосимбионта штамм *Rhizobium*. Удалось даже перенести этот штамм на бобовые растения. Клубеньки древесных растений активно фиксируют N_2 .

Симбиозы с азотфиксирующими цианобактериями. Цианобактерии тоже могут быть фиксирующими азот партнерами в симбиозе с высшими растениями. У водного папоротника *Azolla*, растущего на поверхности стоячих тропических водоемов, цианобактерии содержатся в полости листьев. Симбиотический партнер этого растения — *Anabaena azollae*. В то время как свободноживущие виды *Anabaena* содержат лишь немно-

го (5%) гетероцист, в трихомах симбиотических видов 15–20% клеток составляют гетероцисты. Такое соотношение само по себе указывает на активное связывание азота. Измерения активности нитрогеназы подтверждают это предположение. *Azolla* растет на поверхности затопленных рисовых полей и может при надлежащей агротехнике полностью удовлетворить потребность риса в азоте. Накопление азота в почве в результате симбиоза *Anabaena* с *Azolla* составляет около 300 кг/га в год. Сходный симбиоз наблюдается между печеночниками (*Blasia pusilla*, *Anthoceros punctatus*, *Peltigera*) и *Nostoc*.

У тропического кустарника *Gunnera macrophylla* симбиотические цианобактерии *Nostoc punctiforme* находятся в нижней части ствола, а именно в специальных железах в местах отхождения листовых черешков. Этот вид *Nostoc* тоже образует гетероцисты и нитрогеназу.

13.2 Фиксация азота свободноживущими бактериями

До 1949 г. способность к фиксации молекулярного азота рассматривалась как свойство, присущее лишь немногим бактериям, относящимся в основном к родам *Clostridium* и *Azotobacter*. Положение изменилось, когда начали применять метод изотопных индикаторов ($^{15}N_2$), а также реакцию с восстановлением ацетилена, выявляющую нитрогеназу — ферментный комплекс, связывающий N_2 ; тогда выяснилось, что такой способностью обладают и многие другие бактерии, в том числе большинство аноксигенных фототрофных бактерий, многие цианобактерии, факультативные анаэробы (*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa*), хемолитоавтотрофные бактерии (*Xanthobacter autotrophicus*, *Alcaligenes latus*), метилотрофные, сульфатредуцирующие и метанобразующие бактерии.

Особенно эффективно связывают азот виды *Azotobacter* (около 20 мг азота на 1 г использованного сахара). Различают несколько видов *Azotobacter*, распространенных в разных местообитаниях (табл. 13.1). Все они грам-отрицательные, относительно крупные, в определенных условиях передвигаются с помощью жгутиков; все — строгие аэробы, способные окислять многие органические соединения. У *A. chroococcum* клетки соединены попарно. Обильное образование слизи и наличие темных пигментов (меланинов) придают колониям характерный вид. При недостатке питательных веществ образуются цисты с толстыми клеточными стенками («артроспоры», «микроцисты»).

Азотфиксирующие бактерии были найдены в области корневой системы многих культурных растений; *Azotobacter paspali* растет на поверхности корней *Paspalum notatum*, а в ризосфере *Digitaria decumbens* обнаружена бактерия *Azospirillum lipoferum*.

Фиксация азота свободноживущими цианобактериями имеет существенное значение, во всяком случае на рисовых полях (где они связывают 30–50 кг азота на 1 га в год). В чистых культурах способность связывать азот установлена примерно у 40 видов цианобактерий. Эти

Таблица 13.1. Представители группы *Azotobacter* и их распространение

Вид	Размеры и форма клеток	Особенности колоний	Места обитания
<i>Azotobacter chroococcum</i>	3,1 × 2 мкм; чаще парами	Слизистые, темноокрашенные; могут содержать цисты	Почва
<i>Azotobacter vinelandii</i>	3,4 × 1,5 мкм; чаще парами	Крупные, слизистые; выделяют желтый пигмент с зеленой флуоресценцией; могут содержать цисты	Почва и вода
<i>Azotobacter paspali</i>	2 мкм, сильно плеоморфные	Пигмент как у предыдущего вида; могут содержать цисты	Почва, поверхность корней <i>Paspalum notatum</i>
<i>Azotomonas agilis</i>	3,3 × 2,8 мкм; поодиночке или парами	Выделяют желтый пигмент с белой флуоресценцией	Почва и вода
<i>Beijerinckia indica</i>	2 мкм	Крупные, слизистые, бесцветные	Кислые почвы тропиков (pH 4,5)

организмы одни из первых заселяют бедные (например, вулканические) почвы. Их можно встретить в самых экстремальных местообитаниях — и в Антарктиде при температурах, близких к точке замерзания, и в горячих источниках. Живут они либо изолированно, либо в симбиозе с грибами (лишайники). Во внутренних водоемах и в некоторых областях океана ежегодно наблюдается массовое развитие цианобактерий, так называемое «цветение воды». Пока еще не выяснено, в какой мере цианобактерии участвуют в накоплении азота и продукции биомассы в морях.

Микроэлементы, необходимые для фиксации азота. Для фиксации молекулярного азота необходим молибден (табл. 13.2). Этот тяжелый металл входит в состав нитрогеназы.

Для связывания N_2 бобовыми растениями необходим, кроме того, кобальт. Он содержится в коферменте $V_{1,2}$, который действует как кофактор ферментов метилмалонил-СoА-мутазы и нуклеотидредуктазы. Подобно *Lactobacillus*

Таблица 13.2. Потребность в молибдене при фиксации молекулярного азота клетками *Azotobacter vinelandii*

Источник азота	Наличие или отсутствие Mo в среде	Клеточный азот, мкг на 1 мл клеточной суспензии
N_2	+	205
	—	50
NH_4^+	+	240
	—	250

leichmanii, ризобии тоже нуждаются в этом кофакторе. Для некоторых азотфиксирующих организмов молибден можно заменить ванадием.

13.3 Биохимия азотфиксации

Связывание N_2 — это восстановительный процесс, и первым его продуктом, который можно обнаружить, является аммиак. Процесс восстановления происходит на ферментном комплексе — нитрогеназе. Нитрогеназа состоит из двух компонентов: белка, в состав которого входят молибден, железо и сера, и белка, содержащего железо и серу¹. Как сам фермент, так и процесс фиксации N_2 отличаются крайней чувствительностью к молекулярному кислороду. Это позволяет понять, почему как у свободноживущих азотфиксирующих бактерий, так и в ткани клубеньков есть особые механизмы, защищающие нитрогеназу от высокого парциального давления кислорода.

Для связывания молекулярного азота необходимы восстановительная сила и энергия (рис. 13.2), которые могут быть получены в процессе фотосинтеза, брожения или дыхания. В модельных экспериментах с очищенными компонентами нитрогеназной системы (in vitro) можно доставлять энергию в виде АТФ и восстановительную силу в форме восстановленных пиридиннуклеотидов и ферредоксинов, используя переносчики, содержащие флаводоксин. Затраты АТФ при этом очень высоки.

Нитрогеназная система восстанавливает не только молекулярный азот ($N \equiv N$), но и ацетилен ($HC \equiv CH$), азид, закись азота, цианид, нитриты, изонитрилы и протоны. На восстановлении ацетилена основан наиболее простой метод, позволяющий выявить нитрогеназу. Ацетилен восстанавливается только до этилена, который легко поддается количественному определению с помощью газовой хроматографии. Все до сих пор исследованные азотфиксирующие микроорганизмы и симбиотические системы способны восстанавливать ацетилен.

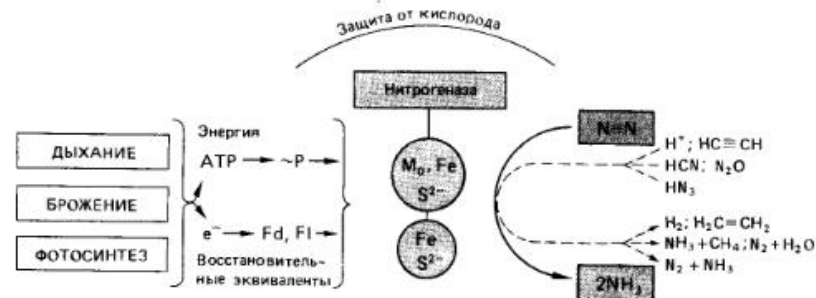
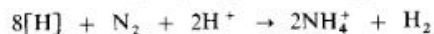


Рис. 13.2. Общая схема фиксации азота. Fd — ферредоксин; Fl — флаводоксин.

¹ Их называют «компонент I» (или Mo-Fe-белок) и «компонент II» (или Fe-S-белок). — Прим. ред.

Если нет молекулярного азота, нитрогеназная система восстанавливает протоны до молекулярного водорода. Таким образом, нитрогеназная система обладает также свойствами АТР-зависимой H_2 -образующей гидрогеназы. Поскольку молекулярный водород образуется и в присутствии N_2 , можно включить соответствующую реакцию в уравнение, описывающее фиксацию азота:



Большинство азотфиксирующих бактерий содержит наряду с нитрогеназой и (классическую) гидрогеназу, активирующую H_2 . Функция этой гидрогеназы заключается, по-видимому, в использовании водорода, образующегося при фиксации молекулярного азота.

Регуляция связывания азота. У многих бактерий нитрогеназа образуется только тогда, когда она необходима, т. е. в отсутствие подходящего источника связанного азота. Ионы аммония подавляют синтез нитрогеназы. У пурпурных и зеленых бактерий под влиянием этих ионов уменьшается также активность уже синтезированного фермента. В регуляции образования нитрогеназы большую роль, очевидно, играет *глутаминсинтетаза*. Глутаминсинтетаза и глутаматсинтаза нужны бактериям для включения ионов аммония в органические соединения в том случае, если эти ионы присутствуют лишь в низкой концентрации. Эта система обладает высоким сродством к ионам аммония и поддерживает их концентрацию в клетке на низком уровне. Повышение концентрации ионов аммония в окружении клетки (а тем самым и внутри клетки) подавляет образование глутаминсинтетазы, а в результате — и нитрогеназы.

Перенос генов азотфиксации (*nif*-генов). Способность к азотфиксации удается передавать путем прямого межклеточного контакта от одной бактерии к другой. Возможность передачи *nif*-генов от *Klebsiella pneumoniae* к *Escherichia coli* путем конъюгации, а также факт локализации этих генов в плазмиде позволяют надеяться, что в близком будущем удастся осуществить передачу их другим видам бактерий¹, а может быть, даже эукариотическим организмам. Но поскольку для фиксации азота кроме нитрогеназы нужен еще специфический белок, содержащий железо и серу, а также требуется защита этого фермента от O_2 , подобные эксперименты сопряжены с большими трудностями.

¹ Сейчас такой перенос уже осуществлен.—Прим. ред.

14. Разложение природных веществ

Хотя зеленые растения на протяжении многих миллионов лет синтезируют из двуокиси углерода органические соединения, сколько-нибудь заметного накопления органических веществ за это время не произошло. Лишь небольшая их часть в условиях без доступа воздуха сохранилась в форме сильно восстановленных соединений углерода; это нефть, природный газ и каменный уголь. В аэробных условиях все вещества биологического происхождения подвергаются распаду. Каким бы сложным ни было то или иное вещество, в природе всегда найдется микроорганизм, способный полностью или частично его расщепить, а продукты этого расщепления будут использованы другими микроорганизмами. Таким образом, в совокупности микроорганизмы в биохимическом смысле «всемогуши», и это дает основание говорить об «универсальности» микробов. В настоящее время, однако, нужно внести в это утверждение некоторые коррективы. Многие из созданных человеком низкомолекулярных веществ (ядохимикаты, детергенты и т. п.) и высокомолекулярных полимеров оказались устойчивыми и не разлагаются микроорганизмами (насколько позволяют судить многолетние наблюдения и результаты экспериментов).

Сведения о микроорганизмах, которые воздействуют на отдельные природные вещества, разлагая и перерабатывая их, получены главным образом в опытах с накопительными культурами. Простые питательные среды, содержащие в качестве источника энергии исследуемое природное вещество, обеспечивают рост только тех микроорганизмов, у которых потребности в питательных веществах не слишком сложны; кроме того, в жидких накопительных культурах выживают лишь наиболее быстро растущие в данных условиях организмы. Поэтому возникает сомнение, можно ли подобные формы считать типичными представителями организмов, осуществляющих те же процессы разложения в природе. При такой постановке опытов многие виды, для роста которых нужны иные условия, остаются невыявленными. В наших знаниях о разложении природных веществ еще много пробелов, а биохимический анализ путей этого разложения только начинается.

14.1 Целлюлоза

Целлюлоза является главной составной частью всякого растительного материала, и синтез ее по своим масштабам превосходит синтез всех

других природных соединений. Сохраняющиеся в почве и возвращающиеся в нее растительные остатки на 40–70% состоят из целлюлозы. Столь большое количество целлюлозы в природе обуславливает важную роль разлагающих ее микроорганизмов в процессах минерализации и в круговороте углерода (разд. 1.3).

Целлюлоза состоит из цепочек β -D-глюкозы со степенью полимеризации около 14 000 (разд. 2.2.3). Физические свойства целлюлозных фибрилл (особенно их механическая прочность и нерастворимость) зависят не от структуры отдельных цепочек. Цепочки должны быть связаны между собой таким образом, чтобы гидрофильные группы были скрыты (это повышает стабильность). По данным рентгеноструктурного анализа, участки, имеющие кристаллическое строение, чередуются в целлюлозе с некристаллическими участками. Целлюлозные волокна представляют собой пучки фибрилл, одетые общей оболочкой, которая содержит воск и пектин.

Ферментативное расщепление целлюлозы осуществляется под воздействием целлюлазы. В экспериментах на грибах было показано, что в систему целлюлазы входят по меньшей мере три фермента: 1) эндо- β -1,4-глюканаза одновременно разрывает различные β -1,4-связи внутри макромолекулы, что ведет к образованию больших фрагментов со свободными концами; 2) экзо- β -1,4-глюканаза отщепляет от конца цепочки дисахарид целлобиозу; 3) β -глюкозидаза осуществляет гидролиз целлобиозы с образованием глюкозы.

В условиях лабораторной культуры микроорганизмы обычно синтезируют эти ферменты лишь в том случае, если целлюлоза – единственный имеющийся субстрат. Их синтез подавляют как другие субстраты, так и продукт расщепления целлюлозы – целлобиоза.

Разложение целлюлозы в аэробных условиях. В хорошо аэрируемых почвах целлюлозу разлагают и используют аэробные микроорганизмы (грибы, миксобактерии и другие эубактерии), а в анаэробных условиях – в основном клостридии.

В аэробных условиях значительная роль в разложении целлюлозы принадлежит грибам. Они в этом отношении эффективнее бактерий, особенно в кислых почвах и при разложении целлюлозы, инкрустированной лигнином (древесины). Большую роль играют в этом процессе представители двух родов – *Fusarium* и *Chaetomium*. Целлюлозу расщепляют также *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma viride*, *Chaetomium globosum* и *Myrothecium verrucaria*. Три последних вида служат тест-организмами для выявления распада целлюлозы, а также при испытании средств, применяемых для пропитки различных материалов с целью предохранить их от действия микроорганизмов, разлагающих целлюлозу. Грибы образуют целлюлазы, которые можно выделить из мицелия и из питательной среды.

Cytophaga и *Sporocytophaga* – аэробные бактерии, разлагающие целлюлозу. Их легче всего выделить обычным методом накопительной культуры в жидких средах. Эти два рода, близкие к миксобактериям, включают много видов. Об использовании целлюлозы миксобактерия-

ми и об их первичном воздействии на нее мало что известно. У них не удалось обнаружить ни внеклеточной целлюлазы, ни каких-либо продуктов расщепления целлюлозы. Клетки этих бактерий тесно прилегают к волокнам целлюлозы, располагаясь параллельно оси волокон. По-видимому, они гидролизуют целлюлозу лишь при тесном контакте с волокном, и продукты гидролиза тотчас же поглощаются. На агаре с целлюлозой колонии *Cytophaga* никогда не бывают окружены прозрачной зоной, в которой находились бы продукты ферментативного расщепления целлюлозы.

Кроме видов *Cytophaga* на целлюлозе могут расти миксобактерии родов *Polyangium*, *Sporangium* и *Archangium*, образующие плодовые тела.

Использовать целлюлозу как субстрат для роста могут и многие из тех аэробных бактерий, которые можно было бы назвать «всеядными». Некоторые из них используют целлюлозу, видимо, только в тех случаях, когда нет других источников углерода; синтез и выделение целлюлаз у таких бактерий регулируются по типу катаболитной репрессии. Некоторые формы, сходные с *Pseudomonas*, раньше объединяли в группу *Cellvibrio*. Сейчас их описывают как *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. Из коринеформных бактерий следует упомянуть *Cellulomonas*; эту бактерию предполагали даже использовать для получения белка из целлюлозы.

Среди актиномицетов описано лишь немного целлюлозоразлагающих видов: *Micromonospora chalcea*, *Streptomyces cellulosa*, *Streptosporangium*.

Разложение целлюлозы в анаэробных условиях. В анаэробных условиях целлюлозу расщепляют чаще всего мезофильные и термофильные клостридии. Термофильный вид *Clostridium thermocellum* растет на простых синтетических средах, используя в качестве субстрата целлюлозу или целлобиозу, а в качестве источника азота – соли аммония; глюкозу и многие другие сахара эта бактерия не утилизирует. Продуктами сбраживания целлюлозы являются этанол, уксусная, муравьиная и молочная кислоты, молекулярный водород и CO_2 . Вне клеток целлюлоза расщепляется, вероятно, только до целлобиозы. К сходным продуктам приводит сбраживание целлюлозы мезофильным видом *Clostridium cellobioparum*. Длинная палочка *Bacillus dissolvens* ведет себя подобно упомянутым выше видам *Cytophaga*: клетки этой бактерии тесно прилегают к волокнам целлюлозы и не выделяют в среду целлюлазы.

Микробиологические процессы в рубце жвачных животных. В рубце жвачных целлюлозу тоже расщепляют главным образом бактерии. Основными источниками углеводов для жвачных служат сено, солома и трава. В сухой траве примерно половину углеводов составляют фруктозаны и ксиланы и приблизительно столько же приходится на долю целлюлозы. Целлюлозные компоненты кормов были бы недоступны для использования, если бы у жвачных в процессе эволюции не возникли симбиотические отношения с микробами, способными расщеплять целлюлозу (рис. 14.1).

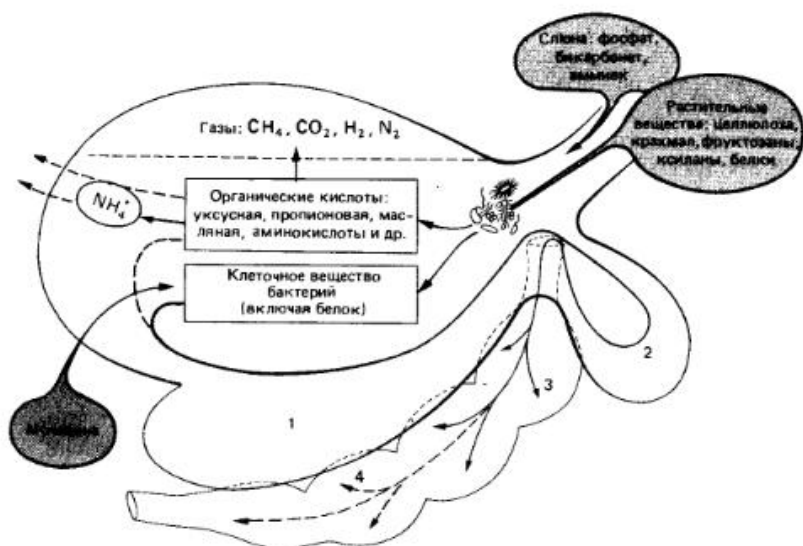


Рис. 14.1. Схема превращений, которым подвергаются питательные вещества под действием микроорганизмов в желудке жвачных. 1—рубец; 2—сетка; 3—книжка; 4—сычуг. Объяснение см. в тексте.

Два первых отдела желудка жвачных—рубец и сетка—это как бы большая бродильная камера (емкостью от 100 до 250 л), в которой существуют идеальные условия для роста многочисленных микроорганизмов; им обеспечены здесь постоянная температура (37–39°С), непрерывная подача минерального раствора (около 100–200 л слюны в сутки), хорошо забуференного бикарбонатом и фосфатом (рН 5,8–7,3), периодическое поступление питательных веществ в виде хорошо размельченного, богатого целлюлозой корма и, наконец, механическое перемешивание в результате движений рубца. Таким образом, рубец напоминает систему для **полунепрерывного культивирования** микроорганизмов.

Среди обитателей рубца преобладают **простейшие и бактерии**. В 1 мл содержимого рубца находится несколько миллионов простейших—главным образом инфузорий, относящихся к родам *Diplodinium* и *Entodinium*. Это специфические для рубца, мало распространенные в других местах виды. По массе они составляют от 6 до 10% содержимого рубца, причем часть этой массы приходится на долю запасенных ими полисахаридов. Однако простейшие, возможно, не играют в рубце жизненно важной роли. Неясно, участвуют ли они в разложении целлюлозы.

С функциональной точки зрения наиболее важными обитателями рубца являются бактерии. В 1 мл рубцовой жидкости содержится от 10^9 до 10^{10} бактериальных клеток. На их долю приходится 5–10% сухой массы содержимого рубца. Специфические для рубца бактерии—строгие

анаэробы. Дрожжи и другие грибы присутствуют здесь лишь в небольшом количестве.

Бактерии перерабатывают полимерные углеводы кормов в простые соединения, такие как жирные кислоты и спирты. Из целлюлозы, крахмала, фруктозы и сахара образуются в основном **жирные кислоты**. По имеющимся данным, разложению подвергается около 90% (по весу) всей поступающей с кормом целлюлозы. При этом образуются большие количества кислот, главным образом уксусной (50–70 об. %), пропионовой (17–21 об. %) и масляной (14–20 об. %), а также немного валериановой и муравьиной. Кроме того, ежедневно образуется до 900 л газа примерно следующего состава (по объему): 65% CO_2 , 27% метана, 7% N_2 , 0,18% H_2 и следовые количества сероводорода. Сравнительно недавно из содержимого рубца были выделены бактерии, которые и в лабораторных условиях сбраживали целлюлозу до тех же кислот и в тех же соотношениях, что и в рубце. Поэтому можно предполагать, что органические кислоты в рубце образуются в результате разложения целлюлозы бактериями.

Расщеплять целлюлозу в рубце способны *Ruminococcus albus* и *R. flavofaciens*—грам-отрицательные кокки; *Bacteroides succinogenes*—грам-отрицательная неподвижная палочка, образующая главным образом уксусную и янтарную кислоты; *Butyrivibrio fibrisolvens*; *Clostridium cellobioparum*.

Отсутствие в рубце молочной кислоты следует приписать активности бактерии *Veillonella alcalescens* (*Micrococcus lactilyticus*), сбраживающей лактат с образованием пропионата, ацетата, молекулярного водорода и CO_2 . Метан не является прямым продуктом разложения целлюлозы: он имеет вторичное происхождение и образуется из жирных кислот, а также молекулярного водорода и CO_2 (разд. 9.4). Образование сероводорода в рубце связано с восстановлением сульфата бактерией *Desulfotomaculum ruminis*. *Selenomonas ruminantium* (рис. 2.36, Б) сбраживает глюкозу в молочную, уксусную и пропионовую кислоты.

В местах естественного обитания жвачных—в саваннах и степях—их корм очень беден азотом и белками. Синтез белка обеспечивает симбиотическая микрофлора рубца. Дело в том, что у жвачных сформировался весьма эффективный «желудочно-печеночный цикл». Мочевина, образующаяся в печени в процессе обезвреживания аммиака, лишь частично выводится с мочой; вся остальная мочевина поступает через слюнные железы и стенку рубца в первые отделы желудка и может использоваться микроорганизмами рубца для синтеза белка (рис. 14.1). Благодаря симбиотическим взаимоотношениям с микроорганизмами рубца жвачные не зависят от экзогенных источников белка. Было неоднократно показано, что коров можно держать на безбелковом корме.

Бактерии играют в питании жвачных двойную роль. Кислоты, образующиеся при распаде полисахаридов, всасываются здесь же в рубце. Сами бактерии при переходе содержимого рубца в кишечник перевариваются, так что вещество их клеток тоже подвергается разложению и усваивается животным. Поскольку бактерии рубца используют и не-

органические источники азота, это существенно увеличивает количество белка, получаемое организмом.

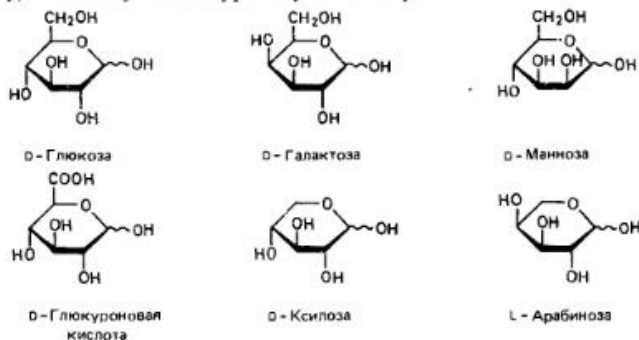
Бактерии рубца подвергают растительные жиры гидрированию. Образующиеся насыщенные жирные кислоты всасываются в кишечнике, а затем включаются в собственные жиры крупного рогатого скота, входящие в состав мяса, молока и масла. У животных, не имеющих рубца, подобного повышения тугоплавкости жира не происходит. Жиры, накапливаемые в организме свиньи или грызунов, имеют поэтому более мягкую консистенцию (более низкую температуру плавления), чем жиры жвачных; они содержат ненасыщенные жирные кислоты и кислоты с более короткой цепью, т.е. те, которые поступают с растительным кормом. Если учесть, что не только жиры изменяются под влиянием бактерий рубца, но и 60–90% (по весу) белков крупного рогатого скота имеет бактериальное происхождение, то можно, поедая говяжий бифштекс, поистине чувствовать себя в гостях у бактерий, а наслаждаясь свиным шницелем – в гостях у кормовых растений!

14.2 Ксилан

Второе место после целлюлозы по распространенности в природе занимает среди углеводов ксилан; солома и луб содержат до 30% ксилана, жмых сахарного тростника (багасса) – до 30%, древесина хвойных 7–12%, а лиственных пород 20–25% (по весу).

Ксилан относится к углеводам, называемым также *гемипеллюлозами*. Они не родственны целлюлозе ни по своему строению, ни по природе структурных компонентов и растворимы (по крайней мере частично) в воде и щелочах. Гемипеллюлозы состоят из пентоз (ксилозы, арабинозы) или гексоз (глюкозы, маннозы, галактозы), а также урановых кислот. В растениях они играют роль запасных или опорных веществ. Название «гемипеллюлозы» предпочитают теперь не употреблять, так как много аналогичных полисахаридов было найдено у грибов и бактерий.

Молекулы ксилана состоят из остатков β-D-ксилозы, соединенных 1,4-гликозидными связями. Таким образом, они отличаются от молекул целлюлозы заменой групп —CH₂OH на атомы H. Однако степень полимеризации у ксиланов значительно ниже (30–100). Некоторые ксиланы содержат также арабинозу, глюкозу, галактозу и глюкуроновую кислоту.



Ксилан расщепляется быстрее и большим числом микроорганизмов, чем целлюлоза. Многие микроорганизмы, разлагающие целлюлозу, наряду с целлюлазой образуют и ксиланазу. Ее выделяет даже *Sporocystophaga tuhococcoides*, способная разлагать целлюлозу только при непосредственном контакте с целлюлозными волокнами. Какие организмы будут в первую очередь воздействовать на попавший в почву ксилан, зависит от условий среды. В кислых почвах преобладают грибы, а в нейтральных и щелочных – бактерии, *Sporocystophaga* и другие бактерии. У грибов способность к использованию ксилана – скорее правило, нежели исключение. Даже для искусственно разводимых шампиньонов ксилан служит отличным субстратом.

У некоторых бактерий (*Clostridium*) ксиланазы – конститутивный фермент, у других она образуется в результате индукции ксиланом. При воздействии на ксилан внеклеточной ксиланазы наряду с ксилозой образуются также ксилобиоза и более длинные фрагменты. Очевидно, этот фермент воздействует одновременно на многие участки молекулы ксилана.

14.3 Крахмал и другие глюканы

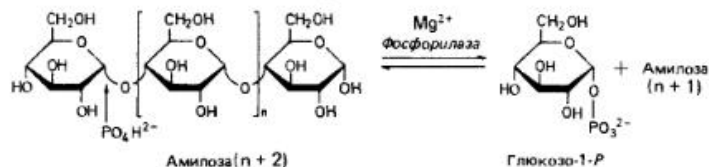
Крахмал – это главное запасное вещество растений. Обычно он откладывается в виде зерен шарообразной, чечевицеобразной или яйцевидной формы. Для крахмальных зерен характерна отчетливая слоистая структура. Растительный крахмал состоит из двух глюканов – **амилозы** (15–27%) и **амилопектина**. Амилоза растворяется в горячей воде без набухания; именно она ответственна за появление характерной синей окраски при взаимодействии крахмала с иодом. Неразветвленные винтообразно закрученные цепи амилозы состоят из остатков D-глюкозы, соединенных α-гликозидными связями между углеродными атомами 1 и 4. Степень полимеризации варьирует в пределах от 200 до 5000. Амилопектин в воде набухает и при нагревании образует крахмальный клейстер, а иодом окрашивается в пурпурный или коричневый цвет.

Амилопектин тоже представляет собой поли-α-1,4-D-глюкозу, но его молекула, подобно молекуле гликогена, разветвлена благодаря наличию 1,6-связей. Амилопектин содержит, кроме того, остатки фосфорной кислоты, а также ионы магния и кальция. Крахмалы разного происхождения значительно различаются по разветвленности цепей, степени полимеризации и некоторым другим свойствам.

При кислотном гидролизе или под действием ферментов крахмал расщепляется до глюкозы. Известны три типа ферментативного расщепления глюканов: 1) фосфоролит, 2) гидролиз и 3) трансгликозилирование.

Фосфоролит. Превращение крахмала, гликогена и аналогичных полисахаридов в глюкозо-1-фосфат катализируют α-1,4-глюканфосфорилазы (называемые также просто *фосфорилазами*). Хотя эта реакция обратима, она, видимо, происходит только при *внутриклеточном распаде* полисахаридов, но не при их синтезе. Фосфоролит начинается со свободного нередуцирующего конца цепи ами-

лозы, причем при разрыве каждой связи освобождается одна молекула глюкозо-1-фосфата. В молекуле амилопектина фосфорилиз останавливается в точках ветвления (1,6-связи) и может продолжаться только после воздействия амило-1,6-глюкозидазы. Фосфориллазы играют решающую роль при мобилизации накопленных в клетках полисахаридов (глюканов):



Гидролиз. Вне клетки крахмал подвергается гидролитическому расщеплению амилазами. α -Амилаза имеется у растений, животных и многих микроорганизмов. Она очень быстро разжижает крахмал, действуя одновременно на многие α -1,4-связи во всех частях молекулы (поэтому ее называют также «эндоамилазой»). Продуктами расщепления оказываются, помимо мальтозы, также олигомеры, содержащие от 3 до 7 остатков глюкозы. Вследствие быстрого разрушения макромолекулярной структуры крахмала быстро уменьшается и вязкость раствора, и окрашиваемость иодом; постепенно появляются сбраживаемые сахара (глюкоза, мальтоза, мальтотриоза). Если совместно с α -амилазой действует амило-1,6-глюкозидаза (амилодекстриназа), то расщепляются и декстрины (рис. 14.2).

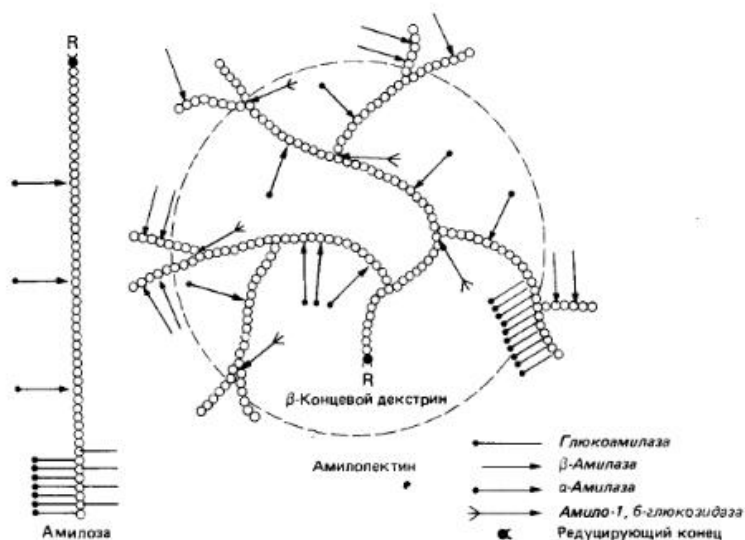


Рис. 14.2. Места воздействия ферментов, участвующих в разложении амилозы и амилопектина. (Windish W. W., Adv. appl. Microbiol., 7 [1965], 273.)

β -Амилазы встречаются только у растений (ячменя, пшеницы и др.). В отличие от α -амилаз они не воздействуют на внутренние участки молекулы (это только «экзоамилазы»), а расщепляют ее, начиная с нередуцирующего свободного конца — отделяют мальтозу с редуцирующей группой. При воздействии β -амилазы крахмал долгое время сохраняет способность окрашиваться иодом, но быстро осахаривается. Гидролиз приостанавливается лишь после того, как будет расщеплена примерно половина амилопектина. Образовавшийся остаток называют β -концевым декстрином. Если амило-1,6-глюкозидаза со своей стороны обеспечивает разрыв цепей в точках ветвления молекулы, то происходит полное расщепление полисахарида до мальтозы. Мальтоза может гидролизоваться вне клетки под действием мальтазы. При наличии соответствующих пермеаз мальтоза и низшие олигомеры поступают в клетку и подвергаются здесь фосфоролитическому расщеплению.

Трансгликозилирование. В содержащих крахмал средах, на которых выращивали *Bacillus macerans*, Шардингер обнаружил кристаллические вещества. Оказалось, что это замкнутые в кольцо цепи, состоящие из остатков глюкозы, соединенных α -1,4-гликозидными связями. Эти α -, β - или γ -циклодекстрины, содержащие по 6, 7 или 8 остатков глюкозы в кольце, образуются из крахмала под действием трансгликозилаз.

Грибы и бактерии синтезируют α -амилазы. Способность к расщеплению крахмала при помощи амилолитических экзоферментов распространена у микроорганизмов очень широко; поэтому не приходится говорить о существовании специфических микробов, расщепляющих крахмал. Многие почвенные грибы — активные продуценты амилазы. Для получения промышленных препаратов амилазы используют *Aspergillus oryzae*, *A. niger* и *A. wentii*. Например, така-амилаза, или така-диастаза, — это коммерческий препарат, получаемый из культур *A. oryzae*, который расщепляет крахмал до глюкозы. Среди бактерий к активным продуцентам амилаз относятся некоторые бациллы (*Bacillus macerans*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*), псевдомонады и различные виды стрептомицетов. Фермент, выделяемый из культуры *B. stearothermophilus*, не утрачивает своей активности даже при кратковременном нагревании до 100°C. Поскольку дрожжи, используемые для получения спирта, не выделяют амилаз, для осахаривания крахмала приходится применять амилазы солода или *Aspergillus oryzae*.

В анаэробных условиях в насыщенной водой почве, удобренной углеводами, крахмал разлагают в основном сахаролитические клостридии. Поскольку они связывают молекулярный азот, это анаэробное разложение растительных остатков, богатых полисахаридами, может вести к значительному обогащению почвы азотом.

Другие глюканы. Бактерии и грибы содержат большое число глюканов, из которых одни выполняют опорную функцию, другие же представляют собой запасные вещества. К глюканам следует отнести также многие из слизей, выделяемых микроорганизмами. Наиболее известен среди глюканов декстран, образуемый, например, в большом количе-

стве бактериями *Leuconostoc mesenteroides* и *L. dextransicum* с помощью экзофермента декстрансахаразы при росте на средах, содержащих сахарозу (разд. 2.2.4).

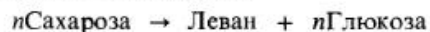
Опорный скелет клеточной стенки дрожжей содержит β -1,6-глюкан. Точное строение этой нерастворимой опорной структуры, скрепленной β -1,3-связями, пока еще не известно. Подобно многим другим глюканам, материал клеточной стенки дрожжей разлагается пищеварительным соком, который выделяет гепатопанкреас улитки. Этот сок содержит не менее 30 различных ферментов, в том числе целлюлазу, манназу, глюканазу, хитиназу и липазу. Его можно использовать для получения протопластов из дрожжевых клеток, а также из клеток других грибов и водорослей.

Дрожжеподобный гриб *Pullularia (Dematium) pullulans* в процессе роста на средах, содержащих глюкозу или сахарозу, выделяет пуллулан. Этот глюкан состоит из остатков мальтотриозы, соединенных α -1,6-гликозидными связями (поли- α -1,6-мальтотриоза). Пуллулан не расщепляется амилазами, поэтому на нем можно было бы получать накопительные культуры бактерий, выделяющих специфически действующий гидролитический фермент. Полисахарид нигеран накапливается в значительных количествах (до 40% сухой биомассы) в мицелиях некоторых видов *Aspergillus* и *Penicillium*; его можно экстрагировать горячей водой. По-видимому, это неразветвленный глюкан с чередующимися α -1,3- и α -1,4-связями.

14.4 Фруктаны

Растения некоторых семейств запасают вместо или помимо крахмала (глюканов) фруктаны (называемые также полифруктозанами). В клубнях сложноцветных (например, георгин) содержится фруктан инулин, хотя количество его невелико. Детального рассмотрения заслуживают фруктаны типа флейна, которые в луговых травах составляют 12–15% сухой массы. Ферменты, расщепляющие фруктаны, были выделены из *Aspergillus niger* и из бактерий; по-видимому, они широко распространены. О самом процессе расщепления фруктанов мало что известно.

Фруктаны, называемые также леванами, образует целый ряд бактерий, если питательная среда содержит сахарозу. Процесс образования леванов аналогичен образованию декстранов и катализируется внеклеточной левансахаразой:



На средах, содержащих сахарозу, такое экзоферментативное образование левана можно обнаружить по появлению рядом с колониями небольших капелек этого полисахарида (что часто наблюдается в культурах *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Azotobacter chroococcum*). К его образованию способны *Streptococcus salivarius*, *S. mutans*, многие штаммы флуоресцирующих и фитопатогенных псевдомонад, бациллы *Enterobacter* и другие бактерии. Некоторые штаммы леванообразующих бактерий, израсходовав всю имевшуюся в среде сахарозу, гидролизуют и снова используют синтезированный ранее леван.

14.5 Маннаны

Маннаны содержатся в древесине некоторых хвойных пород (где составляют до 11% сухой массы). В растворимой форме они присутствуют также в дрожжевых клетках и могут быть экстрагированы из суспензии дрожжей водными растворами щелочей или путем автоклавирования. Дрожжи *Hansenula holstii* во время роста на среде с глюкозой выделяют растворимый маннан, частично (на 20%) этерифицированный фосфорной кислотой.

14.6 Пектины

В качестве межклеточных веществ пектины играют важную роль в тканях молодых растений; особенно богаты пектинами ягоды и косточковые плоды. Значение пектинов обусловлено главным образом их способностью придавать растительным тканям необходимую прочность. Вещества эти входят в состав срединных пластинок, образующихся между стенками соседних растительных клеток.

Пектины представляют собой полигалактурониды – неразветвленные цепи, состоящие из остатков D-галактуроновых кислот, соединенных α -1,4-гликозидными связями. Карбоксильные группы кислот полностью или частично этерифицированы метанолом. В нерастворимых пектинах цепи большей частью связаны между собой и образуют сплошную сеть. Микроорганизмы расщепляют пектины с помощью пектолитических ферментов – эстераз и деполимераз. Пектинэстеразы разрывают эфирные связи, в результате чего высвобождаются метанол и полигалактуроновые кислоты. Последние в свою очередь расщепляются специальными гидролазами до олигомеров и мономеров D-галактуроновой кислоты. Кальциевые соли полигалактуроновых кислот используются для приготовления фруктовых желе.

Способность расщеплять пектин присуща многим грибам и бактериям. Патогенность различных микроорганизмов (*Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*) для растений зависит от выделения ими ферментов, растворяющих пектины. *Erwinia carotovora* вызывает распад тканей у салата, моркови, сельдерея и т.п. В почве численность микроорганизмов, разлагающих пектины, чрезвычайно велика (10^5 клеток на 1 г почвы). К наиболее активным из них относятся спорообразующие бактерии *Bacillus macerans* и *B. polymyxa*. Пектины расщепляются также и представителями различных групп грибов.

Организмы, разлагающие пектины, играют важную роль при мочке льна и конопли. Цель этого процесса – отделение пучков целлюлозных волокон от остальных растительных тканей. В аэробной росной мочке участвуют грибы, а в анаэробной водяной – главным образом бактерии. Среди последних, видимо, наибольшее значение имеют *Clostridium pectinovorum* и *C. felsineum*. Пектолитические ферменты, используемые для различных технических целей (например, для осветления фруктовых соков), получают в основном из грибов, выращиваемых на средах с пектинами.

14.7 Агар

Агар представляет собой смесь агарозы и агаропектина. Главный полисахарид состоит из чередующихся остатков D-галактозы и 3,6-ангидрогалактозы, соединенных в линейную цепь β -1,4- и 1,3-связями. Агаропектин имеет более сложное строение: в состав его входят D-галактоза, 3,6-ангидрогалактоза, соответствующие уроновые кислоты и сульфат. Агар содержится в красных водорослях, но для его промышленного получения используют виды *Gelidium*.

Подавляющее большинство микроорганизмов не способно расщеплять агар. Лишь из морской воды и водорослей было выделено несколько видов бактерий, которые его гидролизуют. Признаком расщепления агара такими бактериями служит погружение их колоний в слой агара (рис. 14.3). Разлагающие агар бактерии чаще всего встречаются в морских биотопах. В приливной зоне число их на 1 г ила составляет около 10^7 (2–4% от общего числа аэробных бактерий, имеющих в этих местах). Виды, способные расщеплять агар, есть в родах *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Alcaligenes*.

14.8 Хитин

Хитин формально можно рассматривать как целлюлозу, в которой гидроксильные группы при 2-м углеродном атоме остатков глюкозы замещены ацетилированными аминогруппами (разд. 2.2.3). Большую стабильность хитина мож-

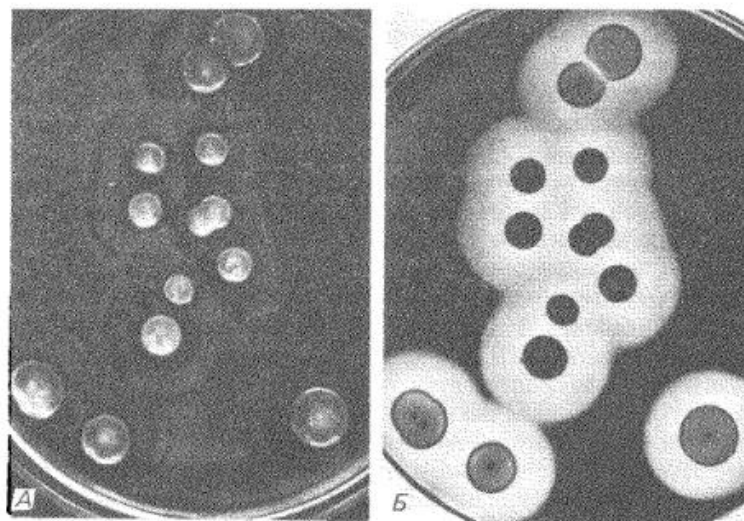


Рис. 14.3. Колонии *Cytophaga fermentans* var. *agarovorans* в чашках с агаризованной питательной средой. Разрушение агара заметно по погружению колоний (А). Если среду в чашке залить раствором йода с иодистым калием, становятся видными зоны диффузии экзоферментов, гидролизующих агар (Б). (Veldkamp H., J. gen. Microbiol., 26 [1961], 33.)

но объяснить наличием водородных связей, в образовании которых участвуют N-ацетильные боковые группы. В качестве опорного вещества хитин широко распространен в животном и растительном мире. Из хитина состоит наружный скелет многих беспозвоночных животных. Планктонные веслоногие рачки ежегодно производят много миллионов тонн хитина. Непрерывно образуется хитин и в почве, это главный компонент клеточной стенки у многих грибов, особенно у базидиомицетов и аскомицетов.

Не удивительно поэтому, что многие почвенные и водные бактерии способны использовать хитин. Из полевых почв было выделено около 50 видов бактерий, разлагающих хитин, среди них виды *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Cytophaga*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia* и *Micromonospora*. Среди грибов способностью разлагать хитин обладают виды *Aspergillus* и *Mortierella*. В 1 г почвы содержится до 10^6 клеток микроорганизмов, использующих хитин. Такое обилие их указывает на то, что хитин представляет собой субстрат, постоянно присутствующий в почве.

Если добавить к почве тонко измельченный хитин, то в первую очередь реагируют на это быстрым размножением актиномицеты. Поэтому агаризованные среды, в которых хитин служит единственным источником углерода и азота, служат превосходными селективными средами для стрептомицетов.

Микроорганизмы воздействуют на хитин с помощью экзоферментов. *Streptomyces griseus* выделяет два фермента – хитиназу и хитобиазу. Расщепление хитина происходит, очевидно, в результате одновременного воздействия хитиназы на многие участки полимерной цепи; при этом образуются в основном хитобиазы и хитотриозы и лишь небольшое количество N-ацетилглюкозамина. Хитотриозы и хитобиазы расщепляются затем хитобиазой до мономеров.

14.9 Лигнин

Лигнин – в количественном отношении один из главных компонентов растительных тканей, уступающий только целлюлозе и стоящий наравне с гемицеллюлозами. Содержание лигнина в древесных тканях составляет от 18 до 30% сухой массы. Растительная ткань инкрустирована лигнином, он находится во вторичных слоях клеточной стенки. Этот растительный продукт, образующийся в довольно больших количествах, наиболее медленно подвергается биологическому разложению. Поэтому он служит главным источником медленно распадающегося органического вещества почвы, в особенности гуминовых кислот.

В химическом отношении лигнин неоднороден. Он представляет собой весьма сложное соединение, но эта сложность не определяется большим числом различных мономерных блоков; все мономерные блоки в молекуле лигнина – это производные фенилпропана, главным образом кониферилловый спирт. Сложность строения лигнина обусловлена разнообразием связей, при помощи которых мономерные блоки соединены друг с другом. Такое нерегулярное строение согласуется с представлением о том, что при синтезе лигнина ферменты участвуют лишь в образовании радикалов конифериллового спирта; эти ради-

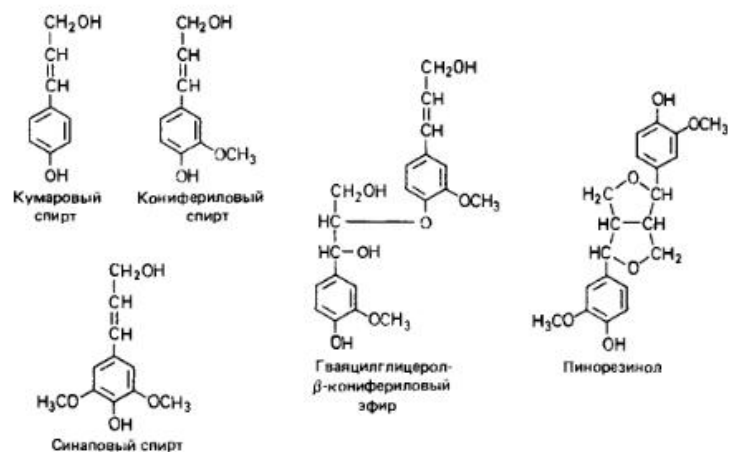


Рис. 14.4. Исходные вещества для биосинтеза лигнина (слева) и димеры кониферолового спирта, образующиеся как промежуточные продукты при образовании и распаде лигнина.

калы уже спонтанно вступают затем в различные связи, причем характер возникающих связей определяется мезомерным состоянием радикалов.

В качестве промежуточных продуктов синтеза лигнина удалось выделить ряд димеров и олигомеров кониферолового спирта (рис. 14.4). В то время как лигнин хвойных состоит в основном из кониферолового спирта, лигнин лиственных пород содержит конифероловый и синаповый спирты, а лигнин злаков — еще и кумаровый спирт. Эти различия отражаются прежде всего в содержании метоксильных групп: в лигнине лиственных пород оно варьирует в пределах от 20,5 до 21,5%, в лигнине хвойных — от 15 до 16%, а в лигнине злаков — от 14 до 15%.

Фенилпропаноидные единицы в молекуле лигнина различным образом соединены между собой при помощи эфирных и углерод-углеродных связей (рис. 14.4). Эти связи чрезвычайно устойчивы к действию ферментов. Лигнин в растениях представляет собой инертный конечный продукт, который уже не вовлекается в метаболизм и выполняет лишь механические функции. Только микроорганизмы могут разрушать его. Однако грибы, разрушающие древесину, а также почвенные грибы и бактерии разлагают лигнин гораздо медленнее, чем целлюлозу и гемицеллюлозы.

Разложение лигнина. Некоторые грибы могут разрушать лигнин даже в живых растениях. Разрушающие древесину базидиомицеты можно разделить на две группы. Возбудители **бурой гнили** превращают древесину в красновато-коричневую массу; они разрушают главным образом целлюлозные и гемицеллюлозные компоненты древесины и не действуют на фенилпропановые полимеры. Возбудители **белой гнили** разрушают древесину с образованием почти белой массы; они действуют

в первую очередь на лигнин и почти не затрагивают целлюлозу. К грибам, разрушающим прежде всего лигнин, относятся *Polystictus versicolor* и некоторые другие (например, *Stereum hirsutum*). Есть также грибы, действующие одновременно на лигнин и целлюлозу; таковы *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Polyporus adustus*, *Armillaria mellea*. Разрушение древесины чистыми культурами грибов происходит так медленно, что эксперименты растягиваются на месяцы и даже годы. С помощью различных методов удалось выявить способность к разложению лигнина также у представителей некоторых других родов (*Pholiotia*, *Clitocybe*, *Lenzites*, *Panus*, *Poria*, *Trametes* и др.).

Можно предположить, что первичное воздействие при разрушении лигнина осуществляют экзоферменты. Поскольку грибы, разрушающие лигнин, обычно выделяют фенолоксидазы, считают, что именно эти ферменты ответственны за отщепление ароматических соединений. До сих пор, однако, не удалось доказать эту функцию фенолоксидаз при разрушении лигнина; в особенности это касается разрыва углерод-углеродных или эфирных связей.

Для получения накопительных культур и выделения микроорганизмов, разлагающих лигнин, лучше всего использовать очищенный лигнин из растительных тканей. При этом следует избегать методов выделения, основанных на действии сильных кислот, щелочей или высоких температур. Лигнин, близкий к нативному, удается получить с помощью метода Бьоркмана (1954). Для этого еловую древесину сначала растирают с толуолом до образования суспензии, а затем отделяют от толуола, высушивают и из полученной древесной муки экстрагируют лигнин диоксаном; при этом в раствор переходит около половины всего содержавшегося в древесине лигнина. Выделенный таким способом лигнин содержит (по весу) 63,5% С, 6,4% Н, 30,4% О и 14,8% метоксильных групп. Выделенный лигнин или его производные (феноллигнин или лигнинсульфонаты) могут служить единственным источником углерода не только для грибов, перечисленных выше, но и для многих аскомицетов и несовершенных грибов. Можно получать также накопительные культуры некоторых штаммов бактерий (*Flavobacterium*, *Agrobacterium* и *Pseudomonas*) на частично переваренных препаратах лигнина. В смешанных культурах разложение лигнина происходит быстрее и полнее, чем в чистых.

Нет никакого сомнения в том, что лигнин могут разрушать не только грибы, но и бактерии. Однако разложение его происходит настолько медленно, что представляется совершенно ничтожным в сравнении с другими метаболическими процессами бактерий. Ведутся дальнейшие поиски микроорганизмов, способных разлагать лигнин или хотя бы так изменять его, чтобы другие организмы могли его затем окислять.

14.10 Образование гумуса

Распад большей части растительных и животных остатков происходит в почве (рис. 14.5). При этом легко разлагающиеся материалы подвергаются быстрому и достаточно полному окислению, тогда как вещества, с трудом расщепляемые микроорганизмами, длительное время

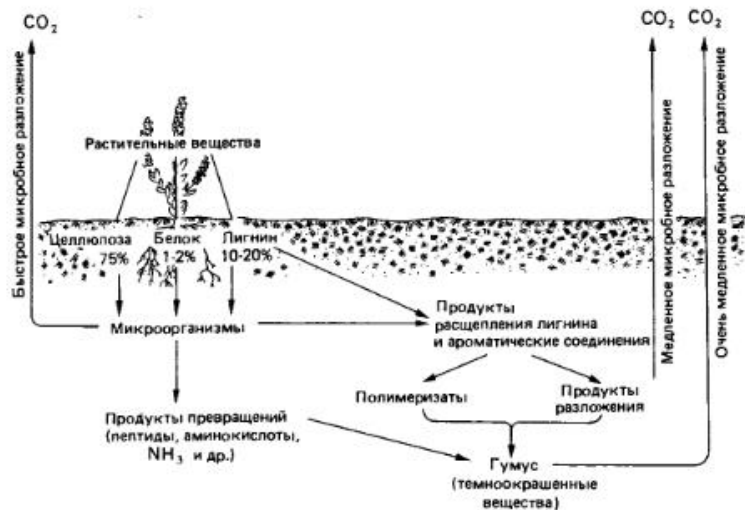


Рис. 14.5. Превращения растительных веществ в почве и образование гумуса. (Flaig W., Landw. Forschung, 21 [1968], 103, с некоторыми изменениями.)

остаются в почве как ее органические компоненты. Органическое вещество почвы частично состоит из не вполне распавшихся остатков растений и частично из гумуса. Гумусом называют содержащийся в почве аморфный, обычно темноокрашенный материал биологического происхождения. В состав гумуса входят соединения, с трудом разлагающиеся микроорганизмами, — прежде всего лигнин, а также жиры, воски, углеводы и белковые компоненты. Они превращаются в полимерные вещества, не поддающиеся точной химической характеристике. В образовании гумуса участвуют наряду с бактериями и грибами также простейшие и разного рода черви.

Одновременно с гумификацией растительного материала происходит обогащение его азотом. Если соотношение углерода к азоту в растительных остатках составляет примерно 40:1, то в гумусе — около 10:1. Значительная часть азота переводится в органические соединения, т. е. в такую форму, в которой растения не могут его использовать. Особенно прочно связывает азот лигнин. Этот процесс служит источником лигнопептидов и гетероциклических соединений. Гумус находится как бы в состоянии динамического равновесия: с одной стороны, количество его все время пополняется за счет притока органических остатков, а с другой — убывает, так как часть гумуса подвергается полному окислению. Содержание гумуса в почве тем выше, чем в большей мере почвенные условия способствуют его образованию и чем они менее благоприятны для его распада. Малое количество гумуса в почве тропических районов связано с быстрым разложением любых органических веществ под действием микроорганизмов, развитию которых способ-

ствует тропический климат. Степной чернозем образуется в областях с продолжительной холодной зимой и сухим летом. Однако количество накапливающегося гумуса зависит не только от климатических и почвенных условий, но и от природы растительных остатков. Солома хлебных злаков и остатки степных растений дают легко разлагающийся гумус, тогда как из листьев лесных деревьев и особенно из хвои образуется грубый гумус, с трудом поддающийся разложению.

В процессе образования гумуса в органических соединениях освобождается или образуется много карбоксильных групп. Поэтому для качества гумуса и быстроты его переработки микроорганизмами решающее значение имеет наличие или отсутствие оснований. В почвах, бедных минеральными компонентами, в частности щелочными катионами (подзолы, почвы пустошей и хвойных лесов), происходит накопление фульвокислот (кислый гумус). При достаточном количестве щелочных минеральных веществ образуются нейтрализованные щелочами коллоиды гумуса, которые в сочетании с коллоидами глины составляют так называемый сорбционный комплекс почвы. Органическую часть этого комплекса можно рассматривать как высокомолекулярный естественный ионообменник, обеспечивающий для обитателей почвы — растений и микроорганизмов — определенное ионное равновесие. Образование мягкого гумуса ведет к активизации жизни в почве; грибные гифы и слизь связывают частицы почвы, в результате чего она приобретает благоприятную комковатую структуру.

В то время как чисто минеральная почва бедна микроорганизмами, в почве, богатой гумусом, она представлена большим разнообразием видов. Такой комплекс, присутствующий и в неудобренной почве, называют **автохтонным** в отличие от **зимогенного**, доминирующего при внесении в почву органических веществ. Таким образом, стабилизирующее действие гумуса на почвенную динамику связано также и с тем, что оно обеспечивает поддержание богатой почвенной микрофлоры.

14.11 Углеводороды

Даже химически столь устойчивые вещества, как парафины, нефть и каучук, подвергаются разложению под действием микробов. Заметного их распада не происходит только в отсутствие O₂ (например, в нефтяных месторождениях или, при особых условиях, в пластах каменного угля). Большое практическое значение имеют следующие вопросы: подвергается ли биологическому окислению нефть, попадающая в почву или в воду? Существуют ли микроорганизмы, специфически использующие углеводороды? И наконец, можно ли по количеству микроорганизмов, окисляющих углеводороды, судить о вероятном наличии нефти или природного газа?

Еще недавно рост микроорганизмов на нефти считали явлением очень редким. Предполагалось, что бактерии, способные использовать нефть, встречаются только там, где имеется сама нефть (нефтяные промыслы, нефтехранилища). На этом основании был предложен и новый способ разведки нефти: нефтяные месторождения надеялись обнаружить, подсчитывая в пробах грунта число бактерий, способных исполь-

phomicrobium X. Вероятно, у других микроорганизмов имеются модификации этого пути. Акцептором формальдегида служит глицин. Следует ожидать, что у организмов, ассимилирующих C_1 -соединения с помощью этого цикла, удастся обычно обнаружить гидроксипируватредуктазу, малатпиокиназу, малил-СоА-лиазу и изоцитрат-лиазу.

Дрожжи способны использовать только метанол, но не метан. У ряда дрожжей (*Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*) включение метанола в вещество клеток происходит тоже через формальдегид, однако через другой пентозофосфат, а именно ксилулозо-5-фосфат. В этом ксилулозо-монофосфатном цикле фиксации формальдегида последний вместе с ксилулозо-5-фосфатом превращается с помощью специальной транскетоллазы в глицеральдегидфосфат и дигидроксиацетон. Оба продукта (дигидроксиацетон—после фосфорилирования триокиназой) поступают на пути синтеза.

Использование метанола бактериями начинается при участии метанолдегидрогеназы. В этом ферменте была обнаружена ранее неизвестная простетическая группа—метоксатин, или пирролохинолинхинон. В настоящее время известно, что метоксатин входит в состав многих бактериальных мембраносвязанных алкогольдегидрогеназ.

14.11.2 Этан, пропан и бутан

В то время как в накопительных культурах, содержащих помимо CO_2 и O_2 только чистый метан, развивается главным образом *Methylomonas methanica*, в культурах на природном газе, в состав которого наряду с метаном входит и этан, растут одни только окислители этана. К окислению этана способно гораздо большее число видов, чем к окислению метана. Большинство микроорганизмов, окисляющих этан, принадлежит к родам *Mycobacterium*, *Flavobacterium* и *Nocardia*. Некоторые из бактерий, использующих этан, могут также окислять газообразный водород. Еще большее число видов бактерий развивается в накопительных культурах за счет использования пропана. Были выделены также бактерии, способные окислять бутан (*Mycobacterium* и *Pseudomonas*).

14.11.3 Алканы (алифатические углеводороды) с длинной цепью

Алканы с длинной цепью используются очень многими бактериями. Решающее значение при этом имеет длина цепи: по мере удлинения цепи парафинов растет число видов, способных использовать эти соединения, а также активность их использования. В их разложении участвуют микобактерии, нокардии и коринебактерии. Долгое время способность бактерий расти на средах с углеводородами рассматривалась как своего рода курьез. Интерес к микроорганизмам, окисляющим углеводороды, возник в связи с двумя наблюдениями. В 1950 г. в Институте бродильных производств в Берлине из накопительных культур, содержав-

ших в качестве источника энергии различные фракции углеводородов, были выделены два вида дрожжей—*Candida lipolytica* и *Candida tropicalis*. Оказалось, что *C. lipolytica* использует все высшие гомологи углеводородов, начиная с C_{15} -соединений. Вслед за этим было установлено, что большинство видов *Candida* окисляет углеводороды. Проведенная проверка штаммов из коллекции дрожжей показала, что способность использовать углеводороды присуща очень многим из них. Использование углеводородов протекает с необычайно высоким выходом полезных продуктов (Y). Если при использовании углеводов коэффициент Y составляет около 0,5, то для углеводородов он колеблется в пределах от 0,7 до 1,0.

Механизм. Многие псевдомонады окисляют углеводороды настолько полно, что накопления промежуточных продуктов не происходит. Только у *Acinetobacter calcoaceticus* продукты окисления выделяются в среду, а у *Nocardia* накапливаются в клетке. Характер продуктов зависит от природы субстрата. Если *A. calcoaceticus* растет на среде с гексадеканом, то из культуральной жидкости можно выделить цетилпальмитат. Цетилпальмитат представляет собой эфир пальмитиновой кислоты и цетилового спирта (гексадеканол)—двух продуктов окисления гексадекана. На приводимой схеме (рис. 14.8) показано, что расщепление парафина начинается с окисления конечного углерода.

В первичном воздействии на углеводородную цепь участвует кислород. Без молекулярного кислорода парафин не окисляется. Окисление

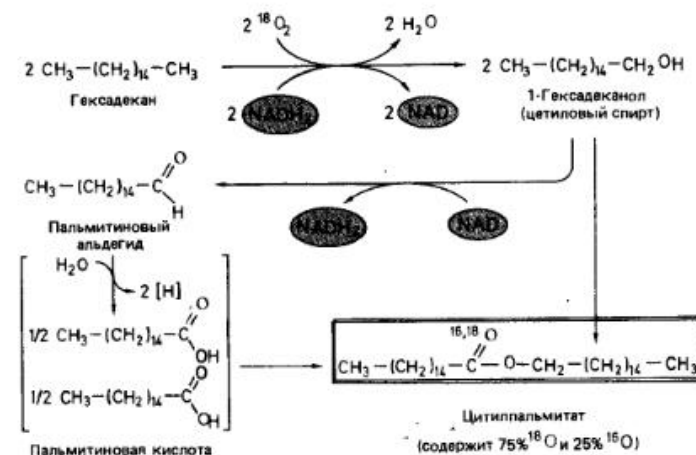


Рис. 14.8. Образование цетилпальмитата из гексадекана, осуществляемое *Acinetobacter calcoaceticus*. При росте на среде с обычной водой ($\text{H}_2\text{-}^{16}\text{O}$) в атмосфере с тяжелым кислородом ($^{18}\text{O}_2$) образуется цетилпальмитат, кислород которого на 75% состоит из ^{18}O . Это согласуется с представлением о том, что превращение гексадекана начинается с окисления конечного углерода при участии алканоксигеназы.

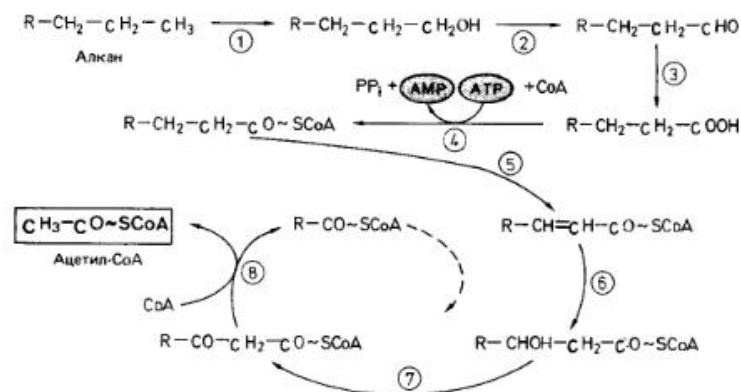
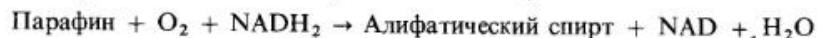


Рис. 14.9. Расщепление алканов (парафинов) путем терминального окисления при участии монооксигеназы и последующего β -окисления до ацетил-CoA. Участвующие ферменты: 1 – монооксигеназа (алкан-1-гидроксилаза); 2 – алкогольдегидрогеназа; 3 – альдегиддегидрогеназа; 4 – ацил-CoA-синтетаза; 5 – ацил-CoA-дегидрогеназа; 6 – 3-гидроксиацил-CoA-гидро-лиаза; 7 – 3-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназа; 8 – β -кетотиолаза.

катализирует монооксигеназа (алканоксигеназа):



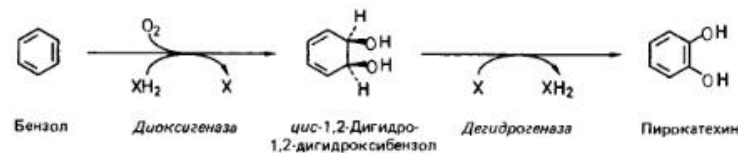
Дальнейшее окисление парафина протекает по пути, который известен как β -окисление жирных кислот с длинной цепью (рис. 14.9). Если псевдомонады, окисляющие гептан, поместить в условия пониженного парциального давления кислорода, то в культуральной жидкости будут накапливаться C_3 -, C_5 - и C_7 -жирные кислоты. Вырастив клетки бактерий в присутствии гексана, а затем инкубируя их с гептаном, можно наблюдать накопление пропионовой кислоты. Это, видимо, объясняется тем, что клетки, выросшие в присутствии гексана, не содержат ферментов, необходимых для окисления пропионата через метилмалонил-CoA.

14.11.4 Ароматические углеводороды

Растения синтезируют много соединений, содержащих ароматические кольца. Из них в количественном отношении преобладает лигнин, составляющий 20% (по весу) древесины. Способность расщеплять такие соединения с разрывом ароматического кольца обладают многие бактерии и грибы. Некоторые псевдомонады растут на среде, содержащей бензоат, быстрее, чем на среде с сахарами. Для быстрого расщепления ароматических веществ необходимо присутствие молекулярного кислорода. Пути такого расщепления мы рассмотрим в этом разделе. Согласно новейшим данным, ароматические соединения могут подвергаться также анаэробному разложению, но мы не будем описывать его метаболические механизмы.

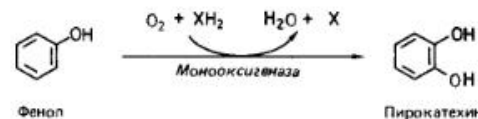
Подготовка к расщеплению кольца. Большинство природных ароматических соединений расщепляется бактериями сначала до пирокатехина (катехола) или протокатеховой кислоты. Расщеплению до **пирокатехина** подвергаются многие соединения, у которых в ароматическом кольце имеется либо один заместитель, либо два заместителя в положениях 1 и 2, т.е. такие вещества, как миндальная кислота, фенилаланин, толуол, бензол, фенол, бензойная и салициловая кислоты.

Ароматические вещества с двумя заместителями в положениях 1,3 или 1,4, а также с большим числом замещающих групп (например, 4-гидроксибензойная, хинная, ванильная и шикимовая кислоты) расщепляются с образованием **протокатеховой кислоты**. Во всех случаях в кольцо вводятся гидроксигруппы. Атомы кислорода для гидроксигрупп доставляет молекулярный кислород. В случае нефенольных ароматических веществ необходима для разрыва кольца 1,2-дигидроксибензольная структура создается путем двойного гидроксирования.



Например, незамещенное кольцо бензола подвергается гидроксированию с помощью диоксигеназы (двойной гидроксилазы) до *cis*-1,2-дигидро-1,2-дигидроксибензола, а затем дегидрируется (реароматизируется) с образованием пирокатехина.

Фенольные ароматические соединения гидроксированы монооксигеназами. Один атом O молекулярного кислорода включается в субстрат, а другой восстанавливается до воды. Донорами водорода могут служить пиридиннуклеотиды.

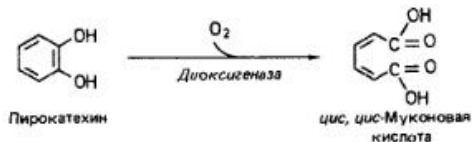


Заместители в ароматическом кольце часто (но не всегда) отщепляются до разрыва кольца. Например, атомы хлора, нитрогруппы и сульфогруппы могут быть заменены на гидроксильные группы. Алифатические боковые цепи могут изменяться и укорачиваться самым различным образом или же остаются без изменений.

Разрыв кольца. Разрыв ароматического кольца осуществляют диоксигеназы. При этом в субстрат включается молекулярный кислород. Разрыв происходит либо между двумя соседними гидроксильными группами, либо между гидроксильрованным углеродом и соседним негидроксильрованным. Из участвующих в процессе ферментов лучше всего изучены ферменты, выделенные из разных видов *Pseudomonas*. На

рис. 14.10 показаны наиболее важные типы разрыва ароматического кольца.

Орто-расщепление. Разрыв кольца между двумя соседними гидроксильными атомами С (*орто*-расщепление, или интрадиольное расщепление) приводит к образованию дикарбоновой кислоты. По-видимому, сначала происходит присоединение молекулы O_2 к гидроксильным группам соседних атомов углерода с образованием циклической перекиси, а затем в результате внутримолекулярной перегруппировки межуглеродная связь разрывается и образуется *цис,цис*-муконовая кислота:



Пирокатехин расщепляется с помощью *орто*-пирокатехаза (катехол-1,2-диоксигеназы), а протокатеховая кислота – при участии протокатехат-3,4-диоксигеназы. Образующиеся при этом промежуточные продукты – *цис,цис*-муконовая кислота и 3-карбоксит-*цис,цис*-муконовая кислота – в ходе дальнейшего катаболизма проходят через этап общего для них обоих продукта – 3-оксоадипиновой кислоты. Последняя активируется *CoA*-трансферазой и расщепляется с образованием сукцинил-*CoA* и ацетил-*CoA*, которые подвергаются дальнейшим превращениям в ходе промежуточного обмена (рис. 14.10).

Мета-расщепление. Разрыв ароматического кольца между гидроксильным и негидроксильным атомами углерода (*мета*-расщепление, или экстрадиольное расщепление) тоже катализируется диоксигеназами. Продукты расщепления в этом случае – полуальдегиды 2-гидроксимуконовой кислоты (рис. 14.11), которые затем превращаются (в зависимости от замещений) в пируват, ацетальдегид, оксалоацетат, фумарат, ацетоацетат, сукцинат или иные промежуточные продукты, вовлекаемые в промежуточный метаболизм.

Проведенные исследования показали, что пути распада ароматических соединений чрезвычайно разнообразны. Варьировать могут и стадии, предшествующие их расщеплению, и характер самого расщепления. У некоторых бактерий даже от фазы и условий роста зависит, будут ли образовываться в клетках ферменты *орто*- или *мета*-расщепления. Некоторые псевдомонады расщепляют ароматические соединения, подвергшиеся распаду до пирокатехина, по *орто*-пути, а расщепленные до протокатеховой кислоты – по *мета*-пути.

Конвергентные пути распада. В расщеплении ароматических соединений участвует достаточно большое число различных реакций. Разные пути распада в конце концов сходятся (конвергируют), приводя к образованию либо пирокатехина, либо протокатеховой кислоты (рис. 14.12 и 14.13). Поэтому на примере распада ароматических соединений можно изучать регуляцию конвергирующих путей катаболизма (разд. 16.1.1).

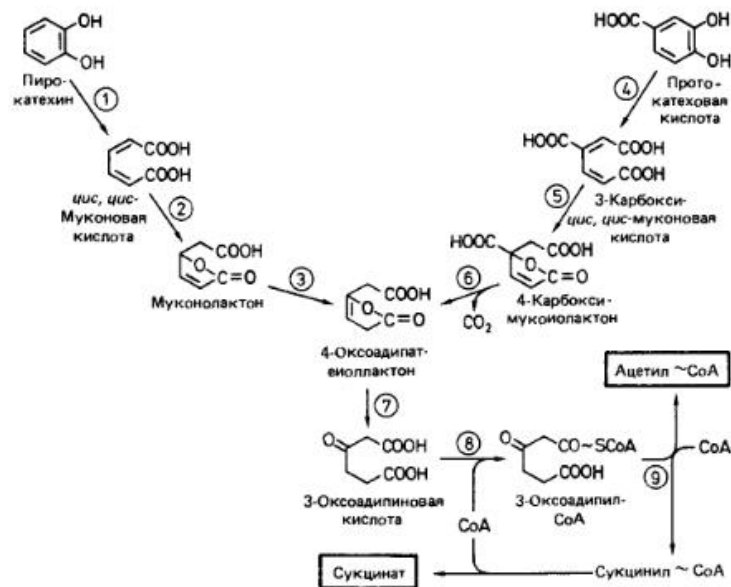


Рис. 14.10. *Орто*-расщепление ароматического кольца и путь 3-оксоадипиновой кислоты. Участвующие ферменты: 1 – пирокатехаза (катехол-1,2-диоксигеназа); 2 – муконатциклоизомераза; 3 – муконолактон-изомераза; 4 – протокатехат-3,4-диоксигеназа; 5 – 3-карбоксимуконат-циклоизомераза; 6 – 4-карбоксимуконлактон-декарбоксилаза; 7 – 4-оксоадипат-еноллактонгидролаза; 8 – 3-оксоадипат-сукцинил-*CoA*-трансфераза; 9 – 3-оксоадипил-*CoA*-тиолаза.

Нафталин, антрацен и другие полиароматические соединения. Некоторые бактерии способны расщеплять полициклические углеводороды, из которых мы упомянем лишь нафталин, антрацен и фенантрен. Если выращивать бактерии на среде, содержащей одно из этих соединений, то можно часто наблюдать выделение в культуральную жидкость салициловой кислоты; по-видимому, здесь происходят превращения, уже рассмотренные выше на примере расщепления моноциклических соединений (рис. 14.13).

Подводя итоги, можно сказать, что природные углеводороды частично или полностью окисляются микроорганизмами. При благо-

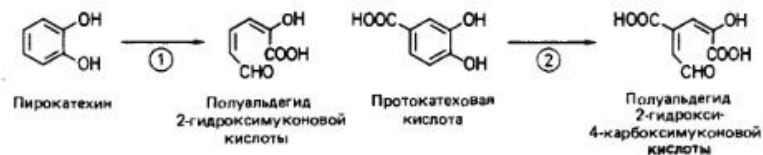


Рис. 14.11. *Мета*-расщепление ароматического кольца. Участвующие ферменты: 1 – метапирокатехаза (катехол-2,3-диоксигеназа); 2 – протокатехат-4,5-диоксигеназа.

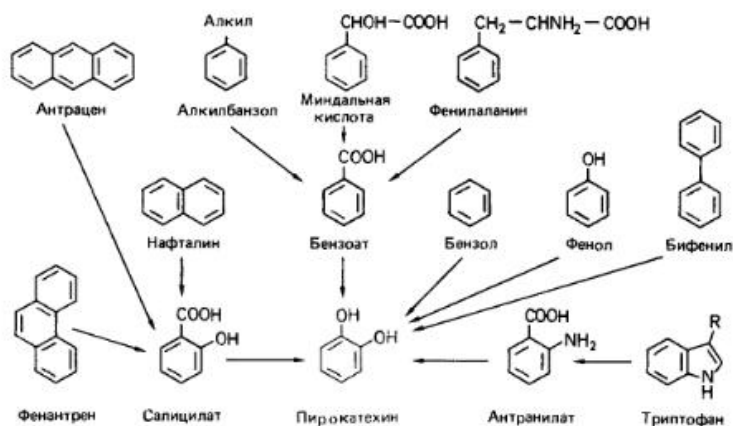


Рис. 14.12. Пути расщепления ароматических соединений, ведущие к образованию пирокатехина.

приятных условиях даже асфальт подвергается разложению, хотя и очень медленно. В почве, населенной микроорганизмами, окисляется даже графит.

Загрязнение среды нефтью. В случае загрязнения почвы нефтью следует учесть, что в нестерильных аэрируемых почвах углеводороды быстро и полностью разлагаются. Только при сильном загрязнении и в отсутствие доступа воздуха или в тех случаях, когда нефть проникает в почву на большую глубину, возникает опасность, что она будет долго сохраняться здесь и в конце концов попадет в питьевую воду. Нефть,

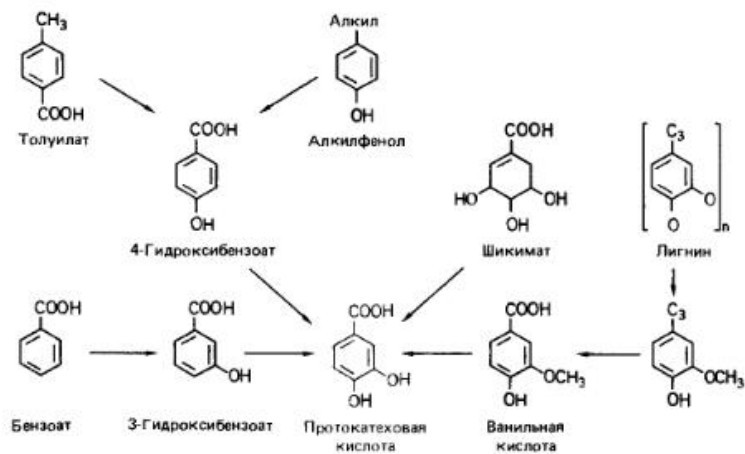


Рис. 14.13. Пути расщепления ароматических соединений, ведущие к образованию протокатеховой кислоты.

разлившаяся по поверхности моря, вначале представляет большую опасность для флоры и фауны, но затем тоже разлагается бактериями. При этом, однако, остаются алканы с длинной цепью, полиароматические углеводороды и смеси веществ, напоминающие асфальт; все эти вещества долгое время не поддаются биологическому воздействию.

Чужеродные вещества. Чужеродные вещества (ксенобиотики), в особенности различные ядохимикаты (фунгициды, гербициды, инсектициды и нематоциды), после обработки ими почвы могут накапливаться в ней, так как при этом не развиваются микроорганизмы, способные разлагать и «обезвреживать» эти вещества.

Ароматические соединения с такими заместителями в кольце, как галогены, сульфогруппы и нитрогруппы, разлагаются крайне медленно и могут противостоять воздействию микробов на протяжении многих лет. Одно из самых стойких веществ — дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Неопасны, но, видимо, совершенно не поддаются микробному разложению пластмассы типа полиэтилена, полипропилена и т.п. Содержащиеся в них пластификаторы постепенно окисляются, но полимерный скелет остается.

Кометаболизм. По-видимому, некоторые соединения расщепляются микроорганизмами только совместно с хорошо утилизируемыми субстратами. Такое превращение какого-либо вещества, которое само по себе не может быть использовано, в присутствии так называемого ко-субстрата, т.е. вещества, используемого клетками для роста, получило название *кометаболизма* или *соокисления*. Явление кометаболизма может быть полезно, например, при очистке промышленных сточных вод, содержащих плохо поддающиеся разложению синтетические продукты, вместе со сточными водами из населенных пунктов в тех же самых водоочистных сооружениях.

14.12 Белки

Азот органических соединений — это прежде всего белковый азот. Подобно другим высокомолекулярным соединениям, белки сначала расщепляются внеклеточными протеазами на фрагменты, способные проникнуть в клетку, — полипептиды, олигопептиды и отчасти аминокислоты. Пептиды поступают в клетки и гидролизуются внутриклеточными протеазами до аминокислот. Последние либо используются клеткой как таковые для синтеза белка, либо подвергаются превращениям, в результате которых они в конечном счете дезаминируются и после этого вовлекаются в промежуточный обмен (рис. 14.14).

Продукты неполного переваривания белков первоначально называли пептонами. В настоящее время это название, недостаточно определенное по смыслу, сохранилось только для обозначения того продукта, который применяют для приготовления питательных бактериальных сред. Его получают, обрабатывая белки ферментом пепсином (при этом разрывается только часть пептидных связей). Пептон состоит примерно на 30% (по весу) из свободных аминокислот;

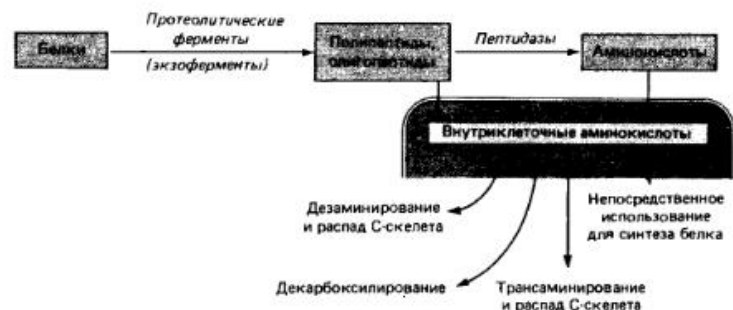
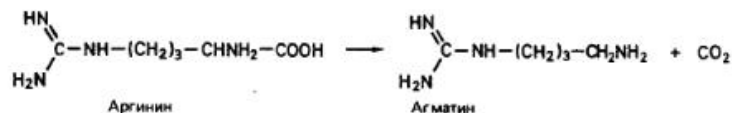
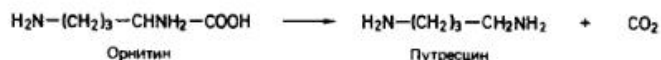


Рис. 14.14. Распад белков вне и внутри бактериальной клетки и возможные дальнейшие превращения аминокислот.

остальное составляют ди- и трипептиды, а также водорастворимые, уже не осаждаемые нагреванием или кислотой полипептиды.

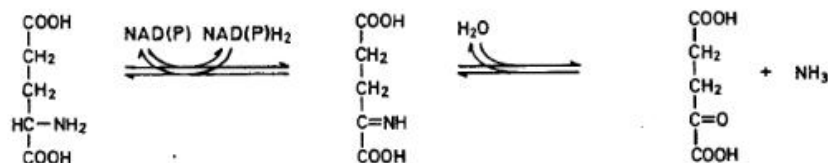
Распад белков в почве сопровождается образованием аммиака. Поэтому говорят о минерализации азота, или **аммонификации**. В разложении белков участвуют многочисленные грибы и бактерии, в том числе *Bacillus cereus* var. *mycoides*, псевдомонады, *Proteus vulgaris* и другие.

Первой реакцией, затрагивающей аминокислоты, может быть **декарбосилирование** или **дезаминирование**. Декарбосилазы образуются главным образом в кислой среде. В результате декарбосилирования аминокислот образуются CO_2 и первичные амины (называемые также «биогенными аминами»). Из них наиболее известны кадаверин, путресцин и агматин (ранее их называли птомаинами или трупными ядами); они образуются соответственно из лизина, орнитина и аргинина. Первичные амины обнаруживаются при обычных гнилостных процессах в кишечнике и при других анаэробных процессах распада белковых веществ.



Под **дезаминированием** понимают отщепление аммиака от аминокислоты. В зависимости от судьбы углеродного скелета аминокислоты различают окислительное дезаминирование, гидролитическое дезаминирование и дезаминирование, приводящее к образованию ненасыщенных соединений.

Окислительное дезаминирование — наиболее распространенный тип распада аминокислот. Глутаминовая кислота дезаминируется *глутаматдегидрогеназой* до 2-оксоглутаровой кислоты. Реакция обратима и поэтому играет важнейшую роль в обмене аминокислот. Равновесие в сильной степени сдвинуто в сторону образования глутаминовой кислоты:



Примером дезаминирования, приводящего к образованию **ненасыщенного соединения**, служит дезаминирование аспарагиновой кислоты в fumarовую:



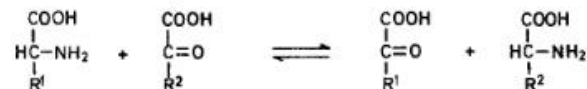
Эта реакция, катализируемая *аспартазой*, тоже обратима.

Гидролитическим дезаминированием является, например, гидролиз мочевины. Большое число бактерий способно использовать мочевины в качестве источника азота. Мочевина расщепляется *уреазой*:



У большинства бактерий синтез уреазы подавляется ионами аммония. Благодаря этому количество образующегося и выделяющегося в культуральную жидкость аммиака не превышает того, что требуется для синтеза белков. Лишь у немногих бактерий, известных своей способностью разлагать мочевины (*Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina ureae*, *Proteus vulgaris* и др.), уреазы представляют собой конститутивный фермент; для ее образования не требуется индукции мочевиной, и аммиак не подавляет ее синтеза. Эти бактерии могут, таким образом, расщеплять всю имеющуюся мочевины (например, в конюшнях) до аммиака. В результате pH среды сдвигается до тех значений (pH 9–10), к которым эти бактерии приспособлены.

При **трансаминировании** аминогруппа аминокислоты переносится на 2-оксокислоту:



Путем трансаминирования образуются аминокислоты, которые не могут быть синтезированы путем прямого аминирования аммиаком; с трансаминированием связано также расщепление некоторых аминокислот.

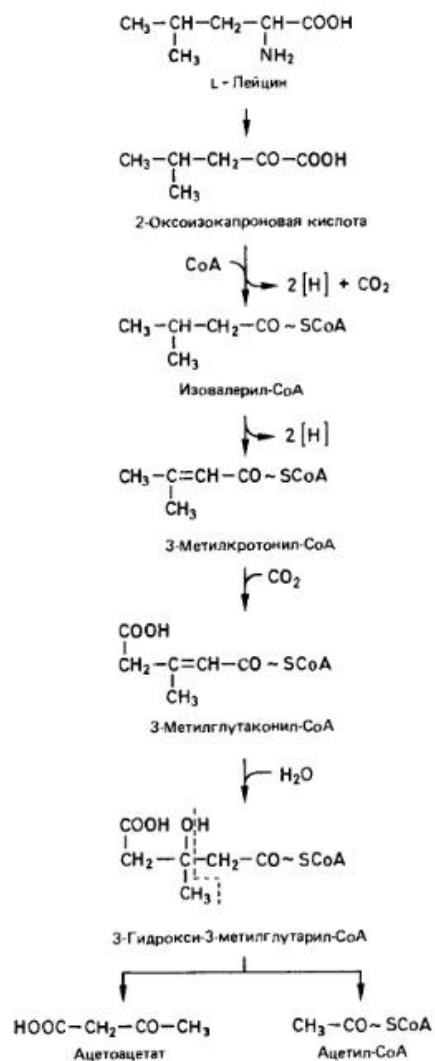
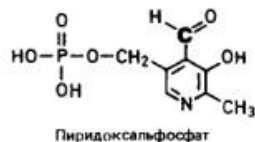


Рис. 14.15. Путь расщепления лейцина. Сначала L-лейцин в результате трансаминирования превращается в 2-оксокислоту. Эта 2-оксокислота подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием CoA-производного. Дегидрирование приводит к образованию 3-метилкротонил-CoA. В результате биотин-зависимого карбоксилирования и последующего присоединения воды образуется 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA. Продукты его расщепления – ацетоацетат и ацетил-CoA. Они подвергаются дальнейшим превращениям по обычному пути. На примере распада лейцина видно, что реакции карбоксилирования могут быть и этапами катаболических процессов. Если содержание CO_2 в среде падает ниже определенной пороговой величины, рост многих микроорганизмов прекращается.

В реакциях декарбоксилирования и трансаминирования (см. рис. 14.15) участвует пиридоксальфосфат.



Этот кофермент, участвующий в обмене аминокислот, родственен пиридоксалу, известному также как адермин или витамин B_6 . Роль реакционноспособной группы в молекуле пиридоксальфосфата играет альдегидная группа. При взаимодействии этой группы с аминогруппой аминокислоты образуется шиффово основание. В процессе трансаминирования аминогруппа остается связанной с пиридоксальфосфатом, а углеродный скелет аминокислоты отщепляется в виде 2-оксокислоты. Пиридоксальфосфат регенерируется затем в результате реакции с соответствующей оксокислотой. При декарбоксилировании от шиффова основания отщепляется CO_2 .

Дальнейшая судьба **углеродного скелета** у разных аминокислот различна. Лишь немногие продукты дезаминирования (пировиноградная, 2-оксоглутаровая, щавелевоуксусная кислоты) являются одновременно промежуточными продуктами центральных путей катаболизма. Другие углеродные скелеты через специальные катаболические пути вовлекаются в промежуточный обмен. Мы не ставили здесь задачу охарактеризовать все известные пути распада. В качестве типичного примера на рис. 14.15 представлен путь расщепления лейцина. Особого внимания заслуживает здесь 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA – важный промежуточный продукт в синтезе стероидов и каротиноидов.

15. Постоянство, изменение и передача признаков

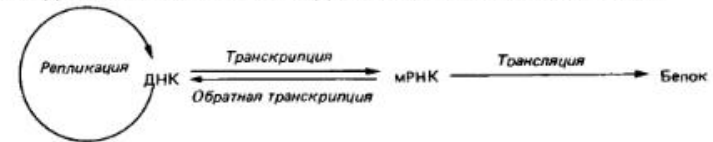
Всякое живое существо по большинству своих признаков сходно со своими предками. Сохранение специфических свойств, т.е. постоянство признаков в ряду поколений, называют **наследственностью**. Изучением передачи признаков и закономерностей их наследования занимается **генетика**. Каждому признаку в качестве носителя информации соответствует определенный **ген**. Еще во времена классической генетики исследователи пришли к выводу, что гены находятся в клеточном ядре. Тогда же было установлено, что они должны располагаться в линейном порядке. Долгое время считали, что наследственная информация связана с белковыми компонентами нуклеоплазмы. Лишь после успешных экспериментов по передаче наследственных признаков с помощью ДНК (см. разд. 15.3.4) генетики пришли к убеждению, что именно ДНК, входящая в состав хромосом у всех организмов, служит материальным носителем наследственной информации. Сначала на насекомых, а затем на микроорганизмах было показано, что проявление признаков зависит от активности ферментов. У микроорганизмов ферменты можно было связать с конкретными признаками, поддающимися точному биохимическому определению. Гипотеза **один ген – один фермент** гласит, что определенный ген содержит информацию, необходимую для синтеза определенного фермента (позднее была принята более точная формулировка: каждый структурный ген кодирует определенную полипептидную цепь). Изменение гена вследствие мутации приводит либо к утрате фермента, либо к изменению его свойств, а тем самым и к изменению признака. Гены выявляются только благодаря мутациям. Генетический анализ основан прежде всего на изучении различий в признаках, определяемых альтернативными формами (*аллелями*) того или иного гена. Поэтому исследование различных генетических проблем ведется на мутантах.

Микроорганизмы – чрезвычайно удобные объекты для генетического анализа, ибо опыты можно проводить в короткие сроки на огромном числе особей и они не требуют много места. Однако эти преимущества были оценены не сразу: бактерии стали использоваться в генетических исследованиях лишь тогда, когда был преодолен ряд давних предубеждений.

15.1 Синтез белка и генетический код

Репликация ДНК. У бактерий, так же как и у высших организмов, носителем генетической информации служит ДНК. Рассматривая структуру клетки, мы уже говорили о том, что бактериальная ДНК представляет собой двойную спираль, замкнутую в кольцо. Сразу же возникает вопрос: как сохраняется наследственная информация при росте и размножении клеток? Перед их делением происходит **идентичная редупликация**, или **репликация**, генов. Этот процесс можно удовлетворительно объяснить, исходя из модели структуры ДНК, предложенной Уотсоном и Криком, и из механизма удвоения ДНК, теперь уже известного (см. с. 36). Две цепи двойной спирали ДНК комплементарны друг другу. На каждой цепи из структурных элементов ДНК – дезоксирибонуклеозидтрифосфатов – синтезируется новая цепь; при этом с каждым из оснований спаривается комплементарное ему основание, так что каждая из двух новых цепей опять-таки будет комплементарна родительской цепи. Обе новые двойные спирали состоят из одной родительской и одной вновь синтезированной цепи. Эта точная репликация ДНК гарантирует сохранение генетической информации.

Транскрипция ДНК. Возникает еще один вопрос: каким образом содержащаяся в генах информация определяет специфическую активность и другие свойства ферментов и как она преобразуется в аминокислотную последовательность ферментного белка? ДНК, будучи носителем наследственной информации, тем не менее сама не служит матрицей для синтеза полипептидов. Биосинтез белков происходит на рибосомах, которые непосредственно с ДНК не соприкасаются. Передачу записанной в ДНК информации к местам синтеза белка осуществляет **матричная**, или **информационная, рибонуклеиновая кислота (мРНК)**. Она состоит из одной цепи и очень напоминает одиночную цепь ДНК с тем отличием, что тимин (Т) ДНК в РНК заменен урацилом (У). мРНК синтезируется на одной из цепей ДНК, причем механизм этого процесса сходен с механизмом репликации ДНК. Образование мРНК начинается на 5'-ОН-конце, и по последовательности оснований ее цепь комплементарна цепи ДНК. Таким образом, при синтезе мРНК просто копируется нуклеотидная последовательность ДНК. Этот процесс называют **транскрипцией** и противопоставляют его **трансляции** – переводу нуклеотидной последовательности в последовательность аминокислот:



Генетический код. Каждый ген представлен определенным участком молекулы ДНК. Специфическая информация, содержащаяся в гене, определяется последовательностью оснований в цепи ДНК. «Алфавит», с помощью которого записана эта информация ДНК, включает четыре

«буквы» — основания аденин (А), гуанин (G), тимин (Т) и цитозин (С). В мРНК тимин заменен урацилом (U).

Специфичность ферментных белков, синтез которых контролируют гены, определяется последовательностью аминокислот в полипептидных цепях. Эта же последовательность определяет и пространственную структуру белка, так называемую *конформацию* (вторичную, третичную и четвертичную структуру).

Для перевода с языка нуклеиновых кислот на язык аминокислот служит специфический код. Каждая аминокислота определяется группой из трех соседних нуклеотидов — **триплетом**, или **кодоном**. Та или иная последовательность триплетов в нуклеиновой кислоте однозначно опреде-

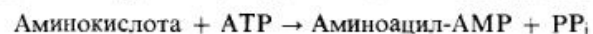
Таблица 15.1. Генетический код. Триплеты, или кодоны, UAA (ochre) UAG (amber) и UGA определяют конец синтеза и отделение растущей полипептидной цепи от рибосомы

Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота	Триплет	Аминокислота
UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	“ochre”	UGA	—
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	“amber”	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ileu	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ileu	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ileu	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Ala — аланин	Gly — глицин	Pro — пролин
Arg — аргинин	His — гистидин	Ser — серин
Asn — аспарагин	Ile — изолейцин	Thr — треонин
Asp — аспарагиновая кислота	Leu — лейцин	Trp — триптофан
Cys — цистеин	Lys — лизин	Tyr — тирозин
Gln — глутамин	Met — метионин	Val — валин
Glu — глутаминовая кислота	Phe — фенилаланин	

ляет последовательность аминокислот в полипептидной цепи; последняя, таким образом, представляет собой коллинеарное отображение нуклеиновой кислоты. В триплетных кодонах возможны 64 различные комбинации нуклеотидов (табл. 15.1). Если бы каждая из 20 аминокислот кодировалась лишь одним-единственным триплетом, то 44 возможные комбинации остались бы неиспользованными. Но оказалось, что многие аминокислоты кодируются двумя или большим числом различных триплетов. Некоторые триплеты имеют особый смысл — они означают «начало» или «конец» полипептидной цепи. Триплеты считаются как 1, 2, 3; 1, 2, 3 и т.д. от начала молекулы мРНК.

Трансляция мРНК: синтез белка. Аминокислоты соединяются в полипептидную цепь в порядке, определяемом триплетами мРНК. В этом процессе участвуют мРНК, транспортные РНК (тРНК), рибосомы, ряд ферментов, АТФ и другие факторы. Сначала аминокислоты при участии АТФ активируются с образованием аминоацил-AMP:



От AMP аминоацильная группа переносится на концевой нуклеотид тРНК. Активация и присоединение аминокислоты к соответствующей тРНК осуществляются с помощью специфического фермента — *аминоацил-тРНК-синтетазы*, которая распознает, с одной стороны, аминокислоту, а с другой — соответствующую тРНК. Имеется 20 различных аминоацил-тРНК-синтетаз, по одной для каждой аминокислоты. Как уже упоминалось, некоторым аминокислотам соответствует не один, а несколько кодонов (т.е. генетический код, как говорят, «вырожденный»); для каждой из таких аминокислот имеется несколько тРНК. Различные тРНК, предназначенные для одной и той же аминокислоты, называют также *изоакцепторными* тРНК. Таким образом, соответствующая синтетаза может присоединять аминокислоту к нескольким изоакцепторным тРНК. В молекуле тРНК имеется участок, комплементарный кодону мРНК (*антикодон*). Соединение аминокислот происходит на **рибосомах** (рис. 15.1). Рибосома перемещается вдоль мРНК, начиная с 5'-ОН-конца, и при каждом ее перемещении на один триплет очередная аминокислота устанавливается транспортной тРНК в нужное положение и присоединяется своей аминогруппой к карбоксильной группе предшествующей аминокислоты (образуется пептидная связь). Так растет полипептидная цепь по мере продвижения рибосомы вдоль мРНК. По-видимому, одновременно происходит закручивание этой цепи и свертывание ее в клубок, определяемое последовательностью аминокислот и природой их боковых цепей (гидрофобные и гидрофильные группы), и в результате возникает структура, обуславливающая специфические свойства и функцию данного белка. К мРНК обычно прикрепляется несколько рибосом, так что на одной и той же матрице одновременно синтезируется несколько полипептидных цепей. Такой комплекс одной мРНК с рибосомами называют **полисомой**. На конце мРНК находится кодон, от которого зависит отделение сформирова-

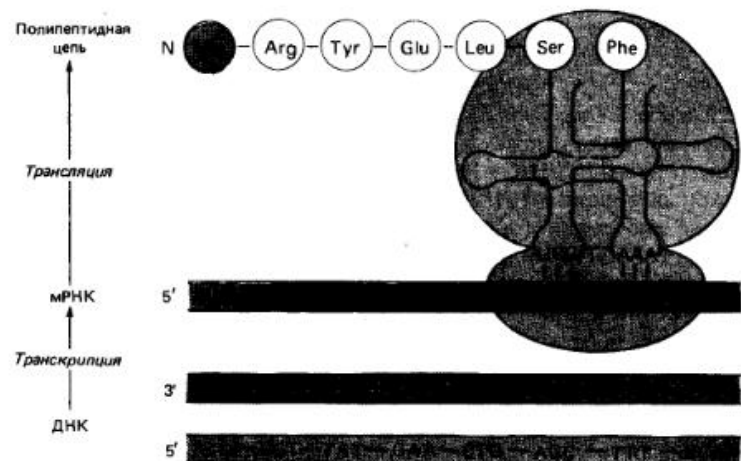
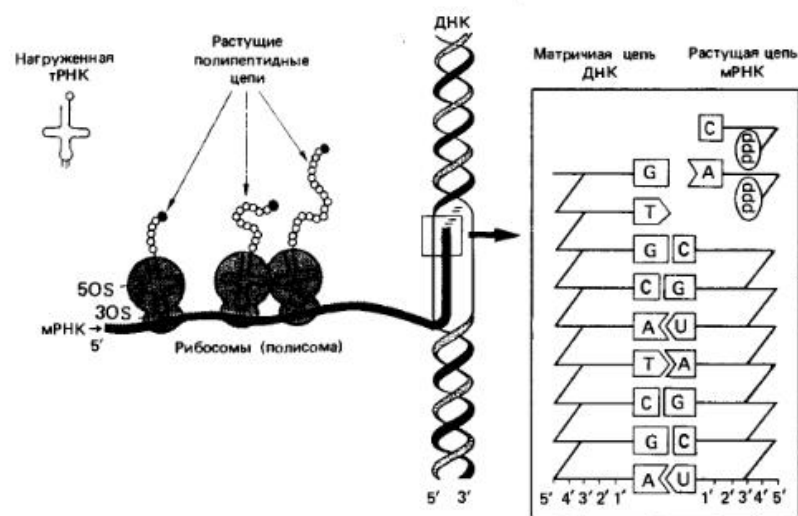


Рис. 15.1. Биосинтез белка. Перенос генетической информации осуществляется в два этапа. Сначала на матричной цепи ДНК образуется мРНК. Затем во время перемещения рибосомы вдоль мРНК (на схемах — слева направо) различные тРНК подводят к ней аминокислоты и устанавливают их в положение, определяемое триплетами мРНК. Аминокислоты соединяются между собой пептидными связями.

рованной полипептидной цепи от рибосомы (UAA, UAG или UGA).

Таким образом, нуклеотидная последовательность ДНК представляет собой закодированную «инструкцию», определяющую (при посредстве мРНК) структуру специфического белка. Представление о передаче информации от ДНК через РНК на белок называют «центральной догмой» молекулярной биологии. Таким путем происходит перенос информации у всех организмов, у которых генетическим материалом служит ДНК. Этот универсальный процесс передачи информации при репликации ДНК, транскрипции и трансляции представлен на приведенной выше схеме (стр. 435) красными стрелками. Эта схема применима к эукариотам, прокариотам и ДНК-вирусам.

Среди РНК-вирусов есть такие, у которых РНК реплицируется прямо на матрице РНК. Однако у некоторых онкогенных (опухолеродных) РНК-вирусов вначале происходит синтез ДНК, контролируемый РНК, т. е. РНК служит матрицей для синтеза ДНК. Таким образом, информация, содержащаяся в вирусной РНК, передается на ДНК путем *обратной транскрипции* (при помощи фермента *обратной транскриптазы*; см. упомянутую выше схему). Этот фермент можно выделить из клеток опухолей, вызываемых РНК-вирусами. Он находит применение в генной инженерии (см. разд. 15.3.6). Если, например, в качестве носителя информации выделяют не фрагмент ДНК, а соответствующую мРНК, то последняя должна быть «переписана» в ДНК, которая и встраивается в плазмиду. При помощи обратной транскриптазы удается получить нужную ДНК *in vitro*.

У прокариотических организмов обратная транскрипция не найдена.

15.2 Мутации и их возникновение

15.2.1 Ненаправленный характер мутаций

Представление о том, что и у микроорганизмов возможны скачкообразные изменения наследственных признаков — мутации, — утверждалось лишь с трудом. До разработки метода чистой культуры многие ученые (Нэгели, Цопф) думали, что у бактерий морфология и физиологические свойства чрезвычайно изменчивы. Считалось, что большое число бактерий, встречающихся в природе, представляют собой разные стадии жизненного цикла небольшого количества видов (**плеоморфизм**). Возражая против этого на основании результатов, полученных с помощью усовершенствованных методов и чистых культур, другие ученые выступили в пользу теории **мономорфизма**, согласно которой бактерии можно различать и классифицировать, исходя из постоянства их морфологических и физиологических признаков. Необходимо было научиться различать и у бактерий генотип и фенотип. **Генотипом** называют совокупность наследственных задатков клетки; ему противопоставляют **фенотип** — совокупность наблюдаемых признаков. Фенотипическое проявление одного и того же генотипа может быть различным в зависимости от условий среды.

Термин **мутация** введен Де Фризом, изучавшим изменчивость и на-

следственность у растений и определившим мутацию как «скачкообразное изменение наследственного признака». Это понятие Бейеринк позднее распространил и на бактерии.

У бактерий наибольшее внимание привлекали варианты, возникающие под действием ядов. Долгое время считали эти резистентные к ядам клетки результатом адаптации. Отличить фенотипическую адаптацию к измененным условиям среды от **генотипического изменения** оказалось нелегкой задачей, хотя критерий различия достаточно прост. Фенотипическая адаптация проявляется у всех клеток данной культуры, тогда как изменение генотипа затрагивает лишь немногие клетки; благодаря своей лучшей приспособленности к среде клетки, ставшие наследственно устойчивыми, например, к яду, растут быстрее, чем клетки исходного штамма, и в конце концов вытесняют их.

Возник еще один вопрос: не вызывается ли изменение генотипа самим селективным фактором, оказывающим направленное воздействие на гены? Или же мутации происходят независимо от среды и носят ненаправленный характер? Теория Ламарка о наследовании приобретенных адаптивных признаков в отношении высших организмов оказалась несостоятельной. Получила признание теория Дарвина, согласно которой новые типы и виды возникают в результате мутаций, не зависящих от среды, с последующим отбором наиболее приспособленных форм. У высших организмов передающиеся потомкам мутации происходят в половых клетках, в значительной мере защищенных от воздействия среды. В отличие от этого бактериальные клетки легко подвержены внешним влияниям. Поэтому можно было представить себе, что воздействие яда, приводящее к появлению в бактериальной популяции устойчивых мутантов, не сводится только к отбору, а определяет также и направленность мутаций. Вопрос о зависимости мутаций от среды и об их направленном характере оставался кардинальной проблемой биологии, и его предстояло решать на бактериях.

В результате ряда экспериментов, привлечших к себе большое внимание, были получены доказательства того, что и у бактерий мутации носят спонтанный и ненаправленный характер. Здесь мы рассмотрим лишь один из этих классических экспериментов; он легко доступен для понимания и демонстрирует широко применяемую сейчас методику пересева с помощью штампа (метод реплик).

Непрямой отбор мутантов методом реплик (отпечатков). Этот безупречный метод, получивший в настоящее время широкое распространение, был предложен Ледербергами в 1952 г. Он состоит в следующем. Обтянутый бархатом штамп несколько меньшего диаметра, чем чашка Петри, прижимают к агару, на котором растут колонии бактерий. При этом часть клеток пристает к ворсинкам бархата. Если теперь прижать этот штамп к незасеянному агару в другой чашке, то на ней будет воспроизведена вся картина колоний исходной чашки.

Из чашки I с плотным газоном фагочувствительных бактерий (рис. 15.2) при помощи штампа был произведен пересев на обычный

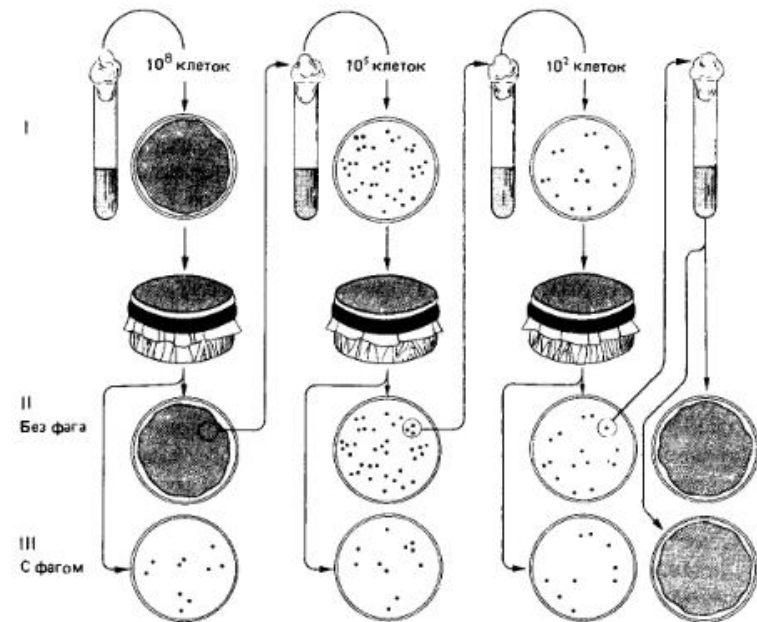


Рис. 15.2. Доказательство ненаправленного характера мутаций у бактерий, полученное с помощью метода реплик (отпечатков). Объяснение см. в тексте.

агар (II) и на агар, предварительно засеянный фагом (III). После инкубации появились отдельные фагоустойчивые колонии. Затем из чашки с обычным агаром (II) произвели пересев с участка, соответствовавшего ареалу фагоустойчивых колоний в чашке с фагом. Размножившиеся клетки распределили по агару в новой чашке и после инкубации перенесли с помощью бархатного штампа в две чашки (с обычным агаром и с агаром, засеянным фагом). Такую процедуру повторили много раз, и в конце концов была получена суспензия фагоустойчивых мутантов, никогда не имевших контакта с фагом. Этот эксперимент дает четкое доказательство спонтанного возникновения фагоустойчивых мутантов без всякого контакта с селективным агентом.

15.2.2 Спонтанные и индуцированные мутации

Спонтанные мутации

В популяции бактерий без всякого экспериментального вмешательства регулярно возникают мутации; такие мутации называют *спонтанными мутациями*, а клетки, в которых они возникли, — *спонтанными мутантами*. Мутагенное действие аналогов оснований ДНК (см. ниже) указывает на возможные причины спонтанных мутаций: вероятно, речь идет о слу-

чайных ошибках при включении нуклеотидов во время репликации ДНК — ошибках, вызванных таутомерным перемещением электронов в основании. Тимин, например, обычно находится в оксо-форме, в которой он образует водородные связи с аденином. Но если тимин во время спаривания оснований при репликации ДНК переходит в енольную форму, то он спаривается с гуанином. В результате в новой молекуле ДНК на том месте, где раньше находилась пара А—Т, появляется пара G—C.

Доля мутантов в популяции и частота мутирования. Численная доля мутантов в клеточной популяции для разных признаков различна и варьирует в пределах от 10^{-4} до 10^{-11} . Она зависит от частоты возникновения мутаций, условий среды, возраста клеточной суспензии и других факторов. Вероятность возникновения определенных мутаций в расчете на одну клетку и на одну генерацию называют частотой мутирования. При высоких скоростях роста она постоянна, и ее обычно определяют для клеток в экспоненциальной фазе роста при оптимальных условиях среды. Частота спонтанных мутаций для определенного гена составляет величину порядка 10^{-5} , а для определенной пары нуклеотидов 10^{-8} .

«Молчание» мутации. Если под мутацией в традиционном смысле понимают внезапное изменение признака, т.е. изменение генотипа, проявляющееся в фенотипе, то на молекулярном уровне любое стабильное наследуемое изменение ДНК рассматривают как мутацию. Однако ввиду вырожденности генетического кода понятно, что не всякая мутация такого рода будет проявляться в фенотипе. Во многих триплетях изменение третьего основания остается без последствий («молчание» мутации). Даже замена первого или второго основания триплета не всегда приводит к серьезным последствиям. Хотя структуры высшего порядка (третичная и четвертичная) определяются первичной структурой белка (т.е. последовательностью аминокислот), разные аминокислоты играют в этой структуре не одинаково важную роль. Например, мутация AUC → GUC ведет к замене изолейцина валином, т.е. к замене одной липофильной группы на другую. Однако мутация CUU → CCU приведет к замене лейцина пролином, и последствием такой замены будет отклонение от нормальной пространственной конфигурации полипептидной цепи, что может сильно изменить структуру высшего порядка. Из этого понятно, что различные мутации в одном и том же структурном гене определенного фермента могут по-разному сказываться на его активности: возможны любые изменения — от едва заметного снижения каталитического действия до полной инактивации.

Обратные мутации и реверсии. Из сказанного выше становится ясно, что у мутанта может произойти *обратная мутация*, в результате которой восстановятся свойства дикого типа. Об истинной обратной мутации говорят лишь в тех случаях, когда вторая мутация точно восстанавливает исходный генотип, т.е. когда измененный при первой мутации триплет будет вновь кодировать ту же аминокислоту, что и раньше. Ес-

ли же дело сводится к восстановлению исходного фенотипа (например, к возобновлению синтеза нормально функционирующего фермента), то говорят о *реверсии* или *супрессорной мутации* и соответственно о *ревертантах*. Супрессорные мутации могут происходить как в исходном гене, так и в каких-либо других участках хромосомы (*интрагенные* и *экстрагенные* супрессорные мутации).

Индуцированные мутации

Обработывая клетки мутагенными (вызывающими мутации) веществами, можно повысить частоту мутаций. В этом случае говорят об индукции мутаций, а полученные при этом клетки называют индуцированными мутантами. Мутагенами могут быть химические, физические или биологические агенты. Механизм их действия будет пояснен на ряде примеров.

В отношении генетической структуры различают три класса мутантов со следующими дефектами: 1) одна пара оснований заменена другой, например вместо AT может быть GC или наоборот; 2) включена дополнительная пара оснований в нуклеотидную последовательность или утрачена одна из существовавших пар; 3) группа оснований или даже генов может быть утрачена (делеция), перемещена в пределах хромосомы (транспозиция) или «разорвана» путем вставки посторонней ДНК (инсерция).

Для мутаций класса 1, называемых также *точечными мутациями*, характерна высокая частота реверсии. В случае мутаций класса 2, к которым относятся также мутации со сдвигом рамки (см. рис. 15.4), ревертанты редки, а после мутаций класса 3 (за некоторыми исключениями) ревертанты не появляются.

В последующих разделах мы остановимся на некоторых механизмах мутагенеза.

Включение аналогов оснований. Аналоги оснований — это антиметаболиты. Некоторые аналоги настолько сходны с нормальными пиримидиновыми и пуриновыми основаниями, что поглощаются клетками и включаются в ДНК. Здесь они в значительной степени выполняют функцию нормальных оснований, но в отличие от них обнаруживают большую тенденцию связывать «ложного» (неподходящего) партнера при репликации ДНК. Для вызывания мутаций часто используются бромурацил и 2-аминопурин. Бромурацил представляет собой соединение, аналогичное по структуре тимину, которое включается вместо него в цепь ДНК как партнер аденина (рис. 15.3). Бромурацил таутомеризуется в енольную форму чаще, чем тимин. При репликации цепи, содержащей бромурацил, он в енольной форме спаривается как цитозин, т.е. вызывает включение гуанина вместо аденина. Таким образом, в некоторых случаях пара оснований AT заменяется на CG. 2-Аминопурин включается в ДНК вместо аденина и действует подобным же образом. Этот вид изменений — замену одного пурина другим пурином (A → G)

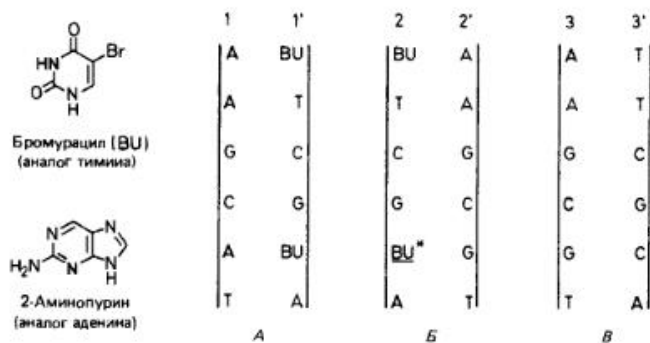


Рис. 15.3. Замена пары оснований АТ парой GC после включения бром урацила (BU) в ДНК. А. Включение нескольких остатков BU вместо тимина во время первой репликации (1 – родительская цепь, 1' – дочерняя цепь). Б. Включение G вместо A во время второй репликации в результате спаривания с BU, находящимся в енольной форме. В. Включение C во время третьей репликации.

или одного примидина другим пиримидином (C → T) – называют *транзицией*.

Химическое изменение оснований. Некоторые мутагенные вещества действуют путем химического изменения содержащихся в ДНК оснований, что приводит к ошибкам репликации. Вполне понятное изменение вызывает **нитрит**. Азотистая кислота дезаминирует аденин, гуанин или цитозин без разрыва или каких-либо других изменений полинуклеотидной цепи. В результате замещения аминогруппы гидроксильной группой аденин превращается в гипоксантин и спаривается с цитозином вместо тимина, что приводит к мутации АТ → GC. Если цитозин дезаминируется в урацил, то он спаривается с аденином вместо гуанина, и это ведет к мутации GC → АТ. Будучи превращен в ксантин, гуанин по-прежнему спаривается с цитозином, т. е. дезаминирование G не вызывает мутации. **Гидроксиламин** вступает в реакцию главным образом с цитозином и изменяет его так, что тот спаривается с аденином; значит, он тоже вызывает мутации CG → ТА.

Алкилирующие агенты. Этил- и метилметансульфонат, диметил- и диэтилсульфат, этиленимин, азотистый или серный иприт, а также N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин принадлежат к наиболее эффективным мутагенам. Например, этилметансульфонат этилирует преимущественно атом N гуанина. Образовавшийся 7-алкилгуанин отщепляется от цепи, в результате чего в ней образуется «пропуск». При очередной репликации на этом месте часто оказывается «ошибочное» основание.

Включение или утрата отдельных пар оснований. Профлаavin и другие акридиновые красители действуют по-иному. Вероятно, молекула акридина внедряется между соседними основаниями цепи ДНК и увеличивает расстояние между ними (*интеркаляция*). Такое пространственное изменение при репликации ДНК может вызывать ошибки двух типов –

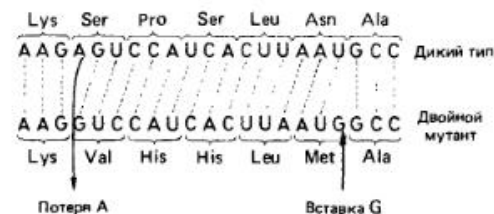


Рис. 15.4. Изменение разбивки считываемой последовательности на триплеты в результате «мутации со сдвигом рамки». Бактериофаг Т4 способен образовывать лизоцим. Этот фермент кодируется геном фага. Вверху представлен отрезок нормальной нуклеотидной последовательности (фаг дикого типа) и указаны соответствующие аминокислоты. Внизу приведена нуклеотидная последовательность двойного мутанта, полученного из дикого типа в результате двукратной обработки профлавином. Нуклеотид А во втором триплете утрачен, и начиная с этого места триплеты считываются неправильно («рамка считывания» сдвинута). В результате включения G в конце пятого неверного триплета в дальнейшем восстанавливается правильный порядок считывания. Таким образом, нуклеотидные последовательности двойного мутанта и дикого типа различны только на участке от второго до пятого триплета включительно. Если кодируемые этими триплетными аминокислоты не существенны для функции данного белка, то вторая мутация восстанавливает свойства (фенотип) дикого типа (генетическая супрессия).

утрату нуклеотида или включение дополнительной пары нуклеотидов. Мутации этого типа приводят к очень серьезным последствиям, так как при этом нарушается порядок считывания информации при синтезе белка: начиная с места утраты или включения нуклеотида, информация считывается в «неправильных» триплетных (мутация «со сдвигом рамки», рис. 15.4).

Ультрафиолетовые лучи и ионизирующее излучение. УФ-свет, рентгеновские лучи и другие виды ионизирующего излучения оказывают на микроорганизмы как подавляющее жизнедеятельность (летальное), так и мутагенное воздействие. Их специфическое действие еще мало изучено. Исходя из совпадения кривой поглощения нуклеиновых кислот и кривой подавления жизнедеятельности клеток при облучении в зависимости от длины волны, а также частоты мутаций в популяции, можно сделать вывод о том, что УФ-лучи действуют в основном на нуклеиновые кислоты. Наиболее эффективны лучи ближней УФ-области с длиной волны около 260 нм (рис. 15.5). Побочные повреждения при этом незначительны. Поражаются главным образом пиримидиновые основания. Например, два соседних тиминовых основания в ДНК могут оказаться ковалентно связанными. Наличие таких димеров тимина служит затем источником ошибок при репликации (рис. 15.6).

Репарация ДНК. На подвергнутых УФ-облучению бактериях было показано, что повреждения ДНК частично обратимы. Если облучить бактериальную суспензию большой дозой ультрафиолета, то значительная доля клеток подвергнется летальному повреждению (в них возникнут летальные мутации); при начатой сразу же инкубации в темноте лишь немногие клетки образуют колонии. Но если непосредственно после УФ-облучения воздействовать на клетки светом бо-

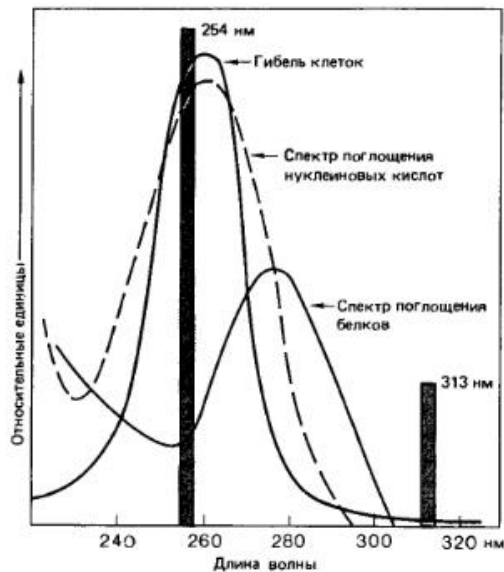


Рис. 15.5. Обоснование использования ртутной лампы низкого давления для вызывания мутаций и уничтожения микроорганизмов. Спектр поглощения нуклеиновых кислот и кривая, описывающая бактерицидное действие света в зависимости от длины волны, имеют максимум при 260 нм. Именно в этой области в спектре ртутной лампы низкого давления имеется сильная полоса испускания (254 нм). Излучение такой УФ-лампы оказывает стерилизующее действие.

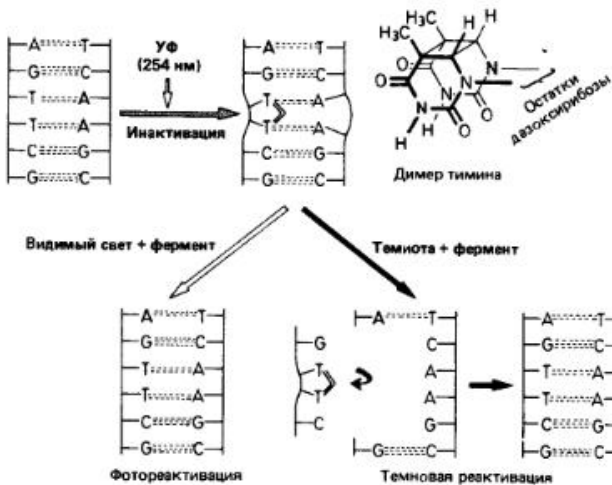


Рис. 15.6. Схема изменений, происходящих в ДНК при УФ-облучении, и процессы фотореактивации и темновой реактивации. Объяснения см. в тексте.

лее длинноволновой области (320–550 нм), то доля выживших клеток возрастет в несколько десятков раз. В такой фотореактивации участвует фермент, активируемый светом и восстанавливающий нормальную структуру ДНК путем расщепления образовавшихся димеров тимина. Есть и другой репаративный механизм, не требующий участия света. При этой темновой реактивации дефектные участки цепи ДНК вырезаются и заменяются новыми нуклеотидами. Степень эффективности такой репарации лучевых повреждений у разных штаммов бактерий неодинакова. Устойчивость к облучению, характерная для некоторых бактерий (например, *Micrococcus radiodurans*), обусловлена высокоэффективным механизмом репарации.

Мутации, вызываемые транспозонами. В генетике бактерий все большее значение приобретает метод получения мутаций с помощью транспозонов. Транспозоны (Tp) представляют собой короткие двойные цепи ДНК, которые состоят из более чем 2000 пар оснований и обычно обуславливают устойчивость к одному антибиотику, в исключительных случаях — к нескольким. Транспозоны способны «перепрыгивать» из одного участка генома в другой, в частности из бактериальной хромосомы в плазмиду и обратно; таким образом, они могут включаться в различные участки генома (см. разд. 15.3.1). В случае внедрения транспозона в какой-либо структурный ген хромосомы нуклеотидная последовательность этого гена будет нарушена и генетическая информация не сможет транслироваться в функционально полноценный полипептид. Возникнет **инсерционный мутант**.

Поскольку транспозоны не способны к автономной репликации, для переноса их из одной бактериальной клетки в другую необходим так называемый вектор (переносчик). Векторами могут служить плазмиды или бактериофаги. Следует упомянуть, что колифаг мю («фаг-мутатор»), подобно транспозону, обладает способностью внедряться в различные участки бактериальной хромосомы и вызывать мутации. По этой причине фаг мю был назван «гигантским транспозоном», и его используют в повседневной практике получения мутантов *E. coli*.

Проявление признаков. Уже возможность фотореактивации после УФ-облучения указывает на то, что первичный эффект при воздействии мутагенного фактора не обязательно ведет к истинной мутации. Включение броморацила в цепь ДНК или димеризация тимина представляет собой лишь **премутацию**; димеризация тимина — процесс обратимый, и в случае фотореактивации дело не доходит до возникновения мутанта. Только при последующей редупликации премутировавшей цепи ДНК первичное повреждение становится стабильным и в дальнейшем передается потомству как новый элемент генотипа. Такая закрепившаяся мутация может исчезнуть только в результате обратной мутации. Проявление мутации в фенотипе связано с рядом последовательных процессов, которые требуют определенного времени или нескольких клеточных делений. Новый фенотип проявится лишь тогда, когда измененный ген начнет функционировать. Этапы, необходимые для реализации нового фенотипа, различны для разных клеток и разных типов мутаций.

Запаздывающее проявление мутаций. Если в гаплоидной клетке произойдет реверсия, превращающая ауксотрофную мутантную клетку в прототрофную, то такая обратная мутация сразу проявится в фенотипе. Восстановление способности вырабатывать определенный фермент можно в надлежащих условиях тотчас же распознать. Иначе обстоит дело с мутациями, приводящими, наоборот, к ауксотрофному состоянию, например к утрате способности синтезировать определенную аминокислоту. Такие мутации удастся распознать лишь по прошествии периода, включающего несколько клеточных генераций. Запаздывающее проявление объясняется в данном случае тем, что, хотя мутация и делает невозможным синтез необходимого фермента, еще продолжает какое-то время действовать фермент, синтезированный ранее. Новый признак проявится лишь тогда, когда в результате клеточных делений произойдет достаточное «разбавление» этого фермента. С запаздывающим изменением фенотипа приходится также считаться при выявлении фагоустойчивых бактерий. Если фагочувствительные бактерии приобретают устойчивость в результате мутации, ведущей к утрате способности синтезировать особое рецепторное вещество, то эта устойчивость выявится лишь тогда, когда в результате ряда клеточных делений это вещество будет в достаточной мере разбавлено.

У многоядерных (пеноцитных) клеток тоже следует различать мутации, приводящие к приобретению и к утрате какой-либо функции. Многие бактерии имеют по несколько ядер (хромосом). Клетки *Escherichia coli* при быстром росте на средах, богатых питательными веществами, содержат в среднем по четыре хромосомы. При мутации с приобретением функции доминирует мутантная хромосома: она сразу же вызывает синтез нового фермента, и мутация немедленно проявляется в фенотипе. Если же в многоядерной клетке произошла мутация с утратой функции, она оказывается рецессивной. При многократном делении клеток ядра распределяются по разным дочерним клеткам (**сегрегация ядер**, рис. 15.7). Дефект может проявиться лишь в той клетке, у которой все

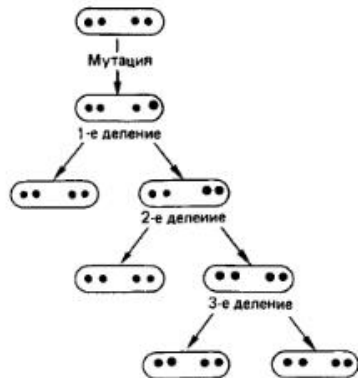


Рис. 15.7. Схема сегрегации ядер при размножении многоядерной бактерии. Только после третьего деления образуется генетически чистый клон. Для проявления мутации в фенотипе может потребоваться еще несколько клеточных генераций (чтобы произошло достаточное разбавление продукта, имевшегося в исходной клетке).

ядра содержат мутировавший ген. Потомство такой клетки представляет собой генетически чистый клон. Таким образом, при мутациях с утратой функции в случае многоядерных клеток следует учитывать как сегрегацию ядер, так и проявление мутации в фенотипе.

15.2.3 Отбор мутантов

На обычных твердых средах лишь немногие мутации можно непосредственно обнаружить по изменению пигмента, измененному росту колоний или иным признакам. Некоторые мутантные признаки выявляются при добавлении индикаторов или красителей. Для идентификации мутантов, отличающихся от родительских клеток пониженными или повышенными требованиями к питанию, приходится сравнивать рост тех и других на двух средах. Если, например, мутант утратил способность к синтезу лейцина, которой обладали клетки родительского (дикого) типа, то он будет расти только на той среде, к которой добавлена эта аминокислота. Мы называем такого мутанта **ауксотрофным** по лейцину, т.е. нуждающимся в лейцине (leu^-), а также дефектным по лейцину, противопоставляя ему **прототрофный** дикий тип (leu^+). Если в клеточной суспензии присутствуют одновременно и мутантные клетки leu^- , и прототрофные клетки дикого типа, то эти два типа можно различить по росту на двух разных средах. Метод, обычно применяемый для выявления таких дефектных мутантов, представлен на рис. 15.8.

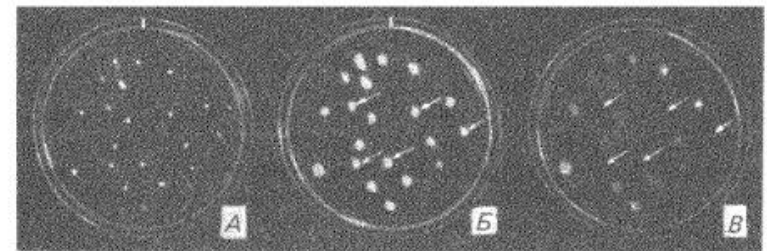


Рис. 15.8. Идентификация и выделение мутантов с биохимическим дефектом. На трех чашках Петри представлен результат опыта по идентификации мутантов *Alcaligenes eutrophus*, утративших способность расти на среде с фруктозой ($Fruc^-$). Питательная среда в чашках А и Б содержит лактат; на нем одинаково хорошо растут и клетки дикого типа, и мутантные клетки. В чашке В среда содержит только фруктозу; на ней мутанты не растут. Смесь тех и других клеток, полученную в накопительной культуре с помощью модифицированного пенициллинового метода, выселили в чашку А (исходная чашка). После того как отдельные клетки образовали колонии, их при помощи бархатного штампа перенесли в чашки Б и В. Клетки, не способные использовать фруктозу, выявились благодаря тому, что они росли только в чашке Б, но не в чашке В. Неспособность этих мутантов использовать фруктозу обусловлена дефектом 2-кето-3-дезоксиглюконоат-альдолазы. Дефектные колонии указаны стрелками. Аналогичный метод применяют для идентификации и выделения мутантов, ауксотрофных по аминокислотам. (Фото I. Sammler.)

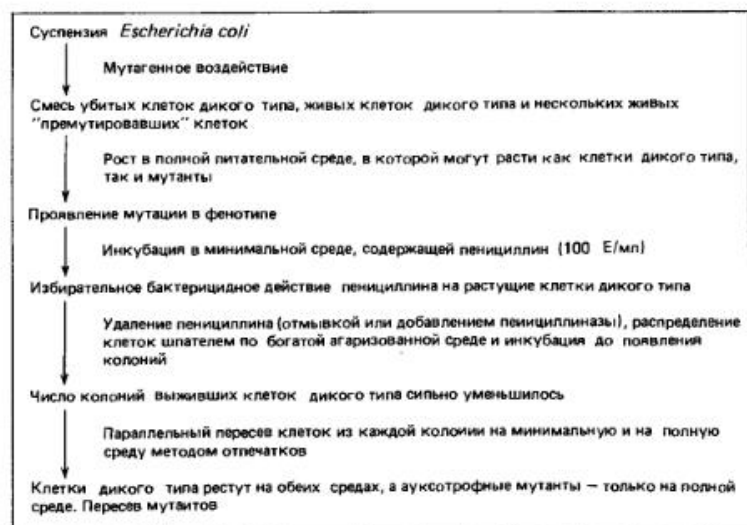


Рис. 15.9. Пенициллиновый метод, применяемый для накопления и выделения ауксотрофных мутантов *Escherichia coli* или других бактерий, чувствительных к пенициллину.

Как уже упоминалось, частота мутаций для многих признаков очень мала. Для большинства изученных до сих пор физиологических признаков, связанных с типом метаболизма, она варьирует в пределах от 10^{-10} до 10^{-5} . При частоте 10^{-8} потребовалось бы обследовать 100 миллионов клеток или их потомство, чтобы выявить новых мутантов. Хотя под влиянием мутагенов частота мутаций значительно возрастает, все равно затрата труда, необходимая для их обнаружения, была бы очень велика. Поэтому перед прямым отбором осуществляют обогащение популяции мутантами.

Получить накопительную культуру мутантов, устойчивых к антибиотикам, ядам или бактериофагам, довольно легко. На среде, к которой добавлен соответствующий агент, выживают только устойчивые к нему мутанты, а клетки дикого типа гибнут.

Методы накопления ауксотрофных мутантов основаны на одном общем принципе: для клеточной суспензии создают такие условия, при которых подлежащие выделению мутанты не растут, а растущие прототрофные клетки отсеиваются или уничтожаются. Существуют средства, которые действуют только на растущие клетки, а не растущим, («покоящимся»), не причиняют вреда. После удаления антимикробного агента и добавления необходимых факторов роста начинают расти ауксотрофные клетки.

Накопление мутантов с применением пенициллина. При накоплении

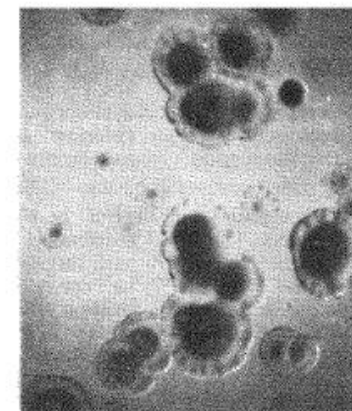


Рис. 15.10. Нормальные колонии и мельчайшие («точечные») колонии дефектного мутанта *Alcaligenes eutrophus*, образующиеся на агаризованной среде с фруктозой (1%) и сукцинатом (0,01%). (Фото I. Sammler.)

ауксотрофных мутантов *E. coli* используют пенициллин. Он убивает растущие клетки дикого типа, а не растущие мутантные клетки при этом выживают (рис. 15.9).

После воздействия, индуцирующего мутации, и многочасового роста бактериальную суспензию инкубируют в среде с глюкозой, но без азота. Это делается для того, чтобы дать возможность клеткам использовать оставшиеся растворимые соединения азота. Через несколько часов добавляют пенициллин и сульфат аммония и проводят инкубацию (на этот раз продолжительностью до 24 ч.). Прототрофные родительские клетки растут, и пенициллин их убивает, тогда как ауксотрофные мутанты, нуждающиеся в определенной аминокислоте, не растут, и это позволяет им уцелеть. Затем суспензию освобождают от пенициллина промыванием или добавлением пенициллиназы и высевают на агаризованную среду, содержащую аминокислоты. Среди вырастающих в таких условиях бактерий процент ауксотрофных клеток оказывается более высоким (помимо них растут также прототрофные клетки, выдержавшие обработку пенициллином). Если бактерии устойчивы к пенициллину, то с той же целью можно применить другие антибиотики (новобиоцин, циклосерин, колистин, канамицин). Для избирательного уничтожения растущих клеток используют и такое явление, как «летальный синтез».

С помощью подобных приемов удается накапливать и выделять мутантов с разного рода дефектами: с нарушениями процессов транспорта или использования субстрата, с дефектами промежуточного обмена, с повышенной чувствительностью к температуре («условно летальные» мутанты). Позднее мы опишем технику выделения других мутантов с измененной регуляцией метаболизма. В табл. 15.2 приводятся краткие сведения о методе отбора и идентификации различных типов мутантов, в том числе и мутантов с дефектами регуляции.

Тип мутантов	Методы отбора и накопления	Идентификация
Мутанты, устойчивые к ингибиторам, антибиотикам, ядам или бактериофагам	Высев большого числа клеток ($> 10^6$) на агаризованную среду, содержащую ингибитор или бактерицидный агент	Растут только устойчивые мутанты
Ауксотрофные мутанты, нуждающиеся помимо субстрата в дополнительных факторах роста (витаминах, аминокислотах или каких-либо веществ)	Метод с применением пенициллина или аналогичный ему: клетки высевают на среду, лишенную соответствующего фактора роста и содержащую пенициллин или иной агент, оказывающий бактерицидное действие только на растущие клетки	Клеточную суспензию высевают на полную среду, содержащую необходимый фактор роста (А), и с помощью штампа производят пересев на минимальную среду (Б). Колонии, растущие только на среде А и не растущие на среде Б, — это колонии, образованные ауксотрофными мутантами
Мутанты, не способные использовать определенный субстрат	Метод с применением пенициллина и(или) непосредственное выделение мельчайших (точечных) колоний. Суспензию высевают на среду, в которой субстрат, используемый диким типом, содержится в нормальной концентрации, а субстрат, доступный для желательного мутанта, — в очень низкой концентрации. После инкубации выделяют мельчайшие колонии (рис. 15.10), которые затем идентифицируют	Поступают так же, как с ауксотрофными мутантами. Бактерии, осуществляющие брожение или выделяющие какое-либо вещество, можно отличить от клеток дикого типа по цвету колоний, если добавить к среде подходящие красители (эозин + метиленовый синий, рН-индикаторы)
Мутанты, чувствительные к температуре (условно летальные)	Метод с применением пенициллина: антибиотик убивает клетки дикого типа, растущие при более высокой температуре, например при 37°C	Поступают так же, как с ауксотрофными мутантами. Проводят инкубацию при различных температурах и выделяют колонии, которые растут, например, при 25°C, но не растут при 37°C
Мутанты с конститутивным синтезом каталитических ферментов	а) Длительное выращивание при концентрации субстрата, лимитирующей рост б) Попеременное выращивание на двух субстратах в) Выращивание в присутствии вещества, подавляющего индукцию ферментов (антииндуктора)	Высев суспензии клеток на среду с неиндуцирующим субстратом. Инкубация и опрыскивание колоний «конститутивно» используемым субстратом (+ индикатор + вещества, подавляющие синтез ферментов). Мутанты с конститутивным ферментом медленно воздействуют на субстрат, и цвет индикатора изменяется

Продолжение табл. 15.2

Тип мутантов	Методы отбора и накопления	Идентификация
Мутанты с конститутивным синтезом анаболических ферментов	Выращивание в присутствии антиметаболитов: антиметаболиты (из-за структурного сходства с конечным продуктом одного из процессов биосинтеза) подавляют рост клеток дикого типа. Среди устойчивых колоний имеются такие, у которых ни репрессии, ни ингибирования конечным продуктом уже не происходит	Растут только устойчивые мутанты. Конститутивный синтез фермента часто распознается по росту сателлитных колоний около устойчивых колоний. Явление это объясняется тем, что в зоне диффузии конечного продукта, выделяемого устойчивыми клетками, антиметаболит не может повлиять на рост клеток дикого типа (рис. 16.15)

15.3 Передача признаков и генетическая рекомбинация

У эукариотических организмов в процессе оплодотворения объединяются гаплоидные наборы генов и образуется диплоидная зигота. В дочернем диплоидном организме после немногих или же многократных митотических делений в процессе редукционного деления (мейоза) происходит перекомбинирование хромосом, принадлежавших двум родительским наборам, и снова образуются клетки с гаплоидными наборами генов (гаметы). Такому половому способу «перетасовки» генетического материала противопоставляют парасексуальные процессы, к которым относится и рекомбинация признаков у прокариот. Бактерии почти всегда гаплоидны; у них имеется только один набор генов. Зиготы образуются и у бактерий, но они никогда не бывают продуктом объединения целых клеток. Как правило, из клетки-донора в клетку-реципиент переносится лишь часть генетического материала, т.е. образуется неполная зигота (мерозигота). Хромосома реципиента спаривается с фрагментом хромосомы донора, и они обмениваются отдельными участками. При последующем делении ядра и клетки возникает клетка, содержащая только рекомбинированную хромосому (рис. 15.11). У бак-

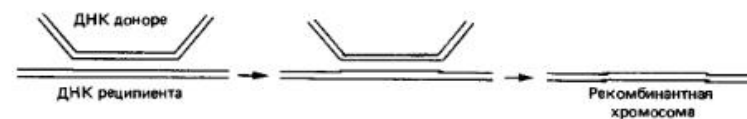


Рис. 15.11. Общая гомологичная рекомбинация: обмен между фрагментом ДНК донора (выделен красным цветом) и хромосомой бактерии-реципиента. Согласно одной из моделей, гомологичные двойные цепи ДНК сближаются и обмениваются участками одной из цепей, а затем в результате репликации или репарации образуется рекомбинантная хромосома.

терий известны три способа передачи признаков: конъюгация, трансдукция и трансформация.

В результате этих трех процессов ДНК переносится из бактерии-донора в бактерио-реципиент. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки ДНК. После переноса ДНК в клетке-реципиенте происходит рекомбинация. При этом ДНК донора встраивается в ДНК бактерии-реципиента. Клетку, в которой произошла рекомбинация, называют рекомбинантом.

15.3.1 Генетическая рекомбинация

В настоящее время известны по меньшей мере три разных механизма рекомбинации попавшей в бактериальную клетку чужеродной ДНК с бактериальной хромосомой (или с плазмидой) *in vivo*: 1) общая гомологичная рекомбинация, 2) сайт-специфическая рекомбинация и 3) негомологичная рекомбинация.

Общая гомологичная рекомбинация. В этом случае поступившая извне ДНК рекомбинируется с клеточной ДНК путем реципрокного обмена соответствующими участками. Если не считать различий, обусловленных мутациями, партнеры по рекомбинации должны иметь одинаковую нуклеотидную последовательность, т. е. быть максимально гомологичными. Гомологичная рекомбинация находится под контролем гена *rec A*; мутанты с дефектом этого гена (*rec⁻*) не способны к гомологичной рекомбинации.

Существует несколько моделей данного механизма. Предполагают, что спаривание оснований происходит между деспирализованными, одноцепочечными участками двух двойных цепей ДНК. Вторая цепь, возможно, образуется в результате репликации или репарации.

Сайт-специфическая рекомбинация. Этот процесс осуществляется независимо от гомологичной рекомбинации, т. е. возможен и у мутантов *rec⁻*. Он состоит в том, что короткая двухцепочечная ДНК встраивается в определенном месте в длинную двойную спираль; при этом меньший партнер теряет свою автономность. Типичным примером сайт-специфической рекомбинации может служить интеграция бактериофага лямбда (λ) (рис. 4.14).

Генетические эксперименты свидетельствуют о том, что фаг при переходе в состояние профага включается в хромосому клетки-хозяина в определенном месте — между *gal*-опероном и биотиновой областью (рис. 15.12). Включению фага предшествует его присоединение к определенному участку бактериальной ДНК. Ранее считали, что оно определяется высокой степенью гомологии нуклеотидных последовательностей, однако эта гомология оказалась незначительной; по-видимому, большую роль здесь играет кодируемый фагом белок — так называемая *интеграза*. В определенном участке фаговой ДНК (*att B*) и в соответствующем участке бактериальной ДНК (*att λ*) этот белок катализирует разрыв и перекрестное воссоединение геномов фага и клетки-хозяина.

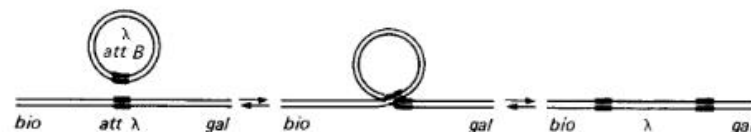


Рис. 15.12. Сайт-специфическая рекомбинация, представленная на примере интеграции бактериофага лямбда в хромосому клетки-хозяина. С помощью специфического белка кольцевая ДНК фага своим участком *att B* присоединяется к участку *att λ* на бактериальной ДНК, расположенному между генами *bio* и *gal*; затем в результате разрыва и перекрестного воссоединения двойных цепей ДНК фаг включается в хромосому. (См. также рис. 4.14.)

Негомологичная рекомбинация. Рекомбинационные процессы, в которых участвуют сегменты ДНК, не обнаруживающие заметной генетической гомологии, называют негомологичной рекомбинацией. Так же как и сайт-специфическая рекомбинация, она представляет собой интеграционную форму рекомбинации, т. е. не обмен, а соединение ДНК. Негомологичная рекомбинация независима от гена *rec A*. К такой рекомбинации способны: 1) вставочные последовательности (IS-элементы); 2) транспозоны (Tn); 3) бактериофаг μ (мю). Молекулярный механизм негомологичной рекомбинации еще не вполне выяснен.

Как было установлено около 15 лет назад, некоторые мутации, спонтанно возникающие у *Escherichia coli*, объясняются включением чужеродной ДНК. Такие мутации происходят в структурных и регуляторных генах по всей хромосоме. Чужеродная ДНК представляет собой так называемые **инсерционные последовательности** (IS-элементы); они встречаются как в бактериальных хромосомах, так и в плаزمидах. IS-элементы состоят из 800–1400 пар нуклеотидов; распознаваемых фенотипических признаков они не кодируют, и об их функциях мало что известно. Мутагенное действие их обусловлено просто включением посторонней ДНК, нарушающим процесс транскрипции (с. 447). Можно предполагать, что IS-элементы играют важную роль в перестройках генетического материала.

Транспозоны — это последовательности ДНК, которые способны встраиваться во многие участки генома и могут «перепрыгивать» с плазмиды на бактериальную хромосому, на другую плазмиду или на умеренный фаг. Транспозоны содержат гены, определяющие внешне распознаваемые признаки, а именно устойчивость к таким антибиотикам, как пенициллин, тетрациклин или канамицин. В связи с этим их легче обнаружить, чем IS-элементы. По обе стороны от генов устойчивости, находящихся внутри транспозона, расположены две одинаковые последовательности, которые могут идти в одном и том же или в противоположных направлениях. Эти повторяющиеся последовательности оснований ДНК частью идентичны с IS-элементами. Расположение этих «фланкирующих» отрезков ДНК можно определить путем электронно-микроскопического исследования гетеродуплексов (рис. 15.13).

Бактериофаг мю сходен с IS-элементами и с транспозонами необыч-

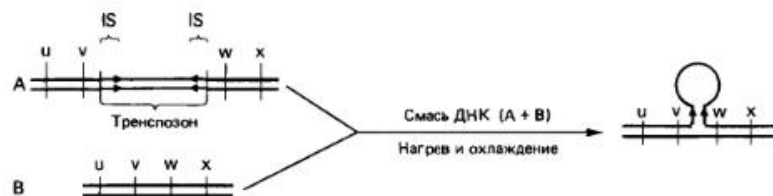


Рис. 15.13. Выявление транспозонов путем электронно-микроскопического исследования гетеродуплексов. Для того чтобы сделать транспозон видимым, нагревают ДНК из бактерии дикого типа (В) и бактерии, несущей транспозон (А), и в результате цепи двойных спиралей расходятся («плавление»). При последующем медленном охлаждении смеси происходит спаривание комплементарных оснований отдельных цепей ДНК А и В, что ведет к образованию гетеродуплексов ДНК. Если на концах транспозона имеются противоположно ориентированные комплементарные IS-элементы, то эти области тоже спариваются и образуют стебелек, на котором средняя часть транспозона выступает вбок в виде петли из одиночной цепи.

ностью своего поведения при включении в бактериальную хромосому. Он обладает типичными свойствами фага, и в то же время его можно рассматривать как гигантский транспозон.

15.3.2 Конъюгация

Перенос генетического материала путем прямого контакта между двумя клетками называется конъюгацией. Уже давно на основании морфологических данных предполагали, что и у бактерий может происходить своего рода спаривание; однако только эксперименты с множественными мутантами беспорядно доказали, что и у бактерий возможна передача генетического материала при прямом межклеточном контакте. В 1946 г. Ледерберг и Татум провели решающий опыт с двумя мутантами *E. coli* K12, каждый из которых был ауксотрофным по двум различным аминокислотам (рис. 15.14). Один двойной мутант нуждался в аминокислотах А и В, но был способен синтезировать С и D ($A^- B^- C^+ D^+$); другой мутант был ему комплементарен ($A^+ B^+ C^- D^-$). Эти мутанты не росли на минимальной питательной среде и не образовывали колоний. Однако если на ту же минимальную среду высевали смесь суспензий обоих мутантов, то колонии появлялись. Клетки этих колоний обладали наследственной способностью синтезировать все аминокислоты, т. е. принадлежали к типу $A^+ B^+ C^+ D^+$ (были прототрофными). Такие клетки возникали с частотой $1:10^6$; это были **генетические рекомбинанты** — они объединяли в себе генетическую информацию двух реципрокно дефектных (взаимодополняющих) родительских клеток. Использование в качестве исходных штаммов множественных мутантов исключало возможность появления ревертантов, так как вероятность одновременной реверсии по двум генам составляет величину порядка 10^{-14} – 10^{-16} на генерацию. Необходимой предпосылкой рекомбинации служил прямой контакт родительских клеток.

Направленный перенос генов из клетки в клетку. Эксперименты по

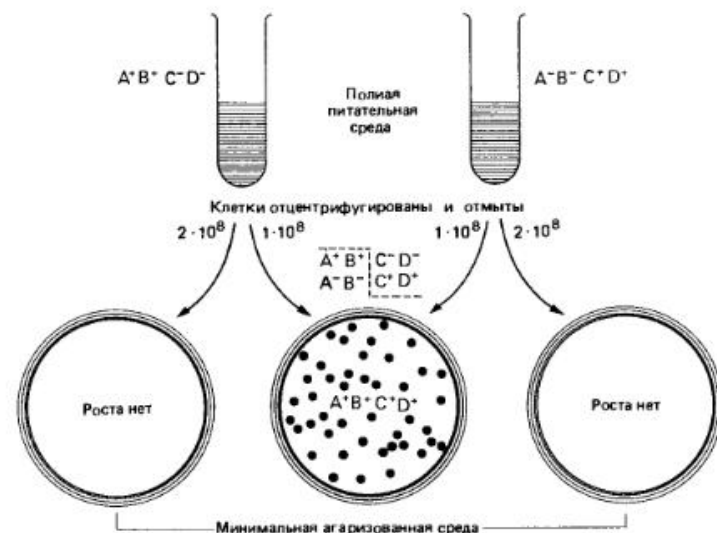


Рис. 15.14. Рекомбинация при конъюгации двух мутантов *Escherichia coli* K12 с различными парами биохимических дефектов.

скрещиванию, в которых один из родительских штаммов был стрептомициноустойчивым, позволили сделать вывод, что генетический материал передается лишь в одном направлении. Если клетки после скрещивания высевали на среду, содержащую стрептомицин, то рекомбинанты возникали только в тех случаях, когда один из штаммов (штамм-реципиент) был стрептомициноустойчивым и выживал. Как вел себя другой родительский штамм, было несущественно; он мог быть стрептомициночувствительным и мог на этой среде погибнуть — достаточно того, чтобы он успел выполнить свою функцию **донора** генетического материала. Отсюда можно было заключить, что перенос генетического материала происходит в одном направлении — от донора («мужского» штамма) к реципиенту («женскому» штамму) — и что весь процесс рекомбинации и расщепления протекает в клетках штамма-реципиента. Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только фрагменты генома.

Фактор F и состояние Hfr. При исследовании процесса скрещивания бактерий выяснилось, что способность клетки быть донором связана с наличием особого фактора, который при конъюгации передается из одной клетки в другую — **полового фактора F** (от fertility — плодовитость). Клетки, не содержащие фактора F (клетки F^-), могут функционировать только как реципиенты. При конъюгации, т. е. при прямом контакте между клетками, частота передачи фактора F близка к 100%. Таким образом, клетки-реципиенты в результате конъюгации превращаются в потенциальных доноров; при этом хромосомные признаки еще не передаются.

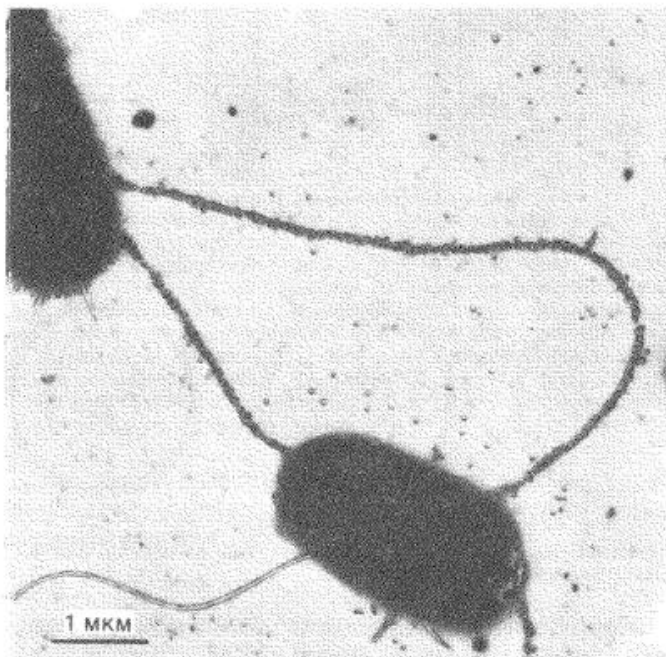


Рис. 15.15. Клетки *Escherichia coli*, связанные между собой *F*-пилями. Обе *F*-пили клетки *Hfr* помечены донор-специфическими РНК-фагами MS-2. Многочисленные пили типа I клетки-реципиента (в верхнем левом углу) короткие и не адсорбируют бактериофага. Электронные микрофотографии, полученные после негативного контрастирования с помощью фосфорновольфрамовой кислоты. (Curtiss R. et al., J. Bacteriol., 100 [1969], 1091.)

Фактор *F* представляет собой кольцевую двухцепочечную молекулу ДНК с массой $45 \cdot 10^6$ Да. В качестве внехромосомного автономно реплицируемого элемента ДНК ее следует отнести к **плазмидам**. Эта молекула содержит гены, ответственные за процесс конъюгации, в том числе гены, детерминирующие особые структуры клеточной поверхности, например половые волоски, или *F*-пили (рис. 15.15), необходимые для конъюгации. По всей вероятности, они служат для взаимного узнавания при контакте между клеткой-донором и клеткой-реципиентом и делают возможным образование конъюгационного мостика, по которому ДНК переходит внутрь клетки-реципиента. Пока не ясно, происходит ли такая «инъекция» ДНК через сами *F*-пили.

В популяции F^+ лишь немногие клетки способны быть донорами хромосомной ДНК. Оказалось, что это те клетки, в которых фактор *F* интегрировался в бактериальную хромосому (рис. 15.16). Если клоны таких клеток-доноров использовать в экспериментах со скрещиванием, то рекомбинанты образуются примерно в тысячу раз чаще, чем при ис-

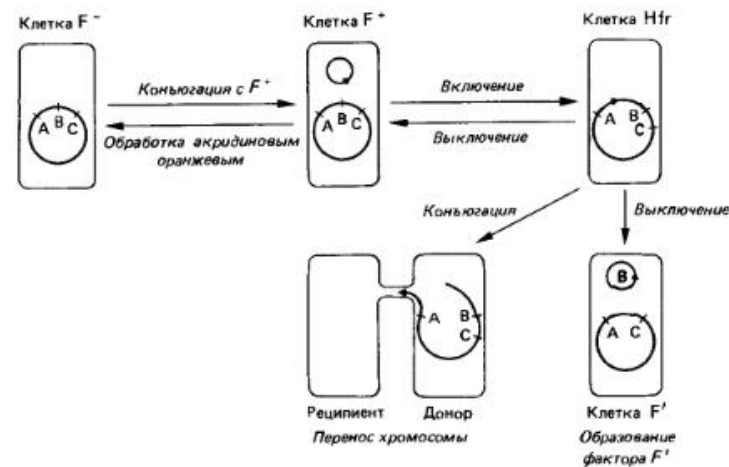


Рис. 15.16. Взаимоотношения между половыми типами *Escherichia coli*. Клетка F^- может служить только реципиентом. При конъюгации с клеткой штамма F^+ или *Hfr* она может получить фактор *F* и в результате стать клеткой F^+ . В клетке F^+ фактор *F* представляет собой кольцевую молекулу ДНК. Этот фактор можно удалить путем обработки клеток акридиновым оранжевым. При включении фактора *F* в бактериальную хромосому клетка переходит в состояние *Hfr*. Фактор может включиться в разные участки хромосомы и в различной ориентации; от этого зависит, с какого места начнется и в каком направлении будет происходить перенос хромосомы (показано красными стрелками). В случае неправильного выключения фактора *F* из хромосомы он может превратиться в фактор *F'*, содержащий кусочек хромосомной ДНК.

пользовании обычных клеток F^+ . Клетки-доноры, обеспечивающие высокую частоту рекомбинаций, получили название клеток *Hfr* (от англ. high frequency of recombinants). Фактор *F* включается в бактериальную хромосому лишь в определенных участках, число которых ограничено; этот процесс сравним с интеграцией фага λ (лямбда) в хромосому клетки-хозяина (см. рис. 4.14, 15.12 и 15.16).

Процесс переноса. Если смешать популяцию клеток *Hfr* с избытком клеток F^- , то почти каждая клетка *Hfr* найдет себе партнера F^- и будет с ним конъюгировать. Из такой смеси через определенные промежутки времени брали пробы и, сильно встряхивая их в смесителе, насильственно разъединяли партнеров. Затем пробы переносили на чашки с агаром для выделения рекомбинантов. И наконец, исследовали рекомбинантные штаммы, чтобы выяснить, какие гены были переданы донорами клеткам-реципиентам. Исследования показали, что каждый ген передается в совершенно определенный момент времени после начала конъюгации (рис. 15.16). Временная последовательность переноса генов соответствовала порядку их расположения в бактериальной хромосоме, установленному в результате генетического анализа. Это значит, что любой штамм *Hfr* представляет собой гомогенную популяцию, все

клетки которой передают свою хромосому реципиенту одинаковым образом – начиная с определенного участка (начала) и в одном и том же направлении. Чем дальше располагается тот или иной ген от «начала» хромосомы, тем позже он передается и тем реже попадает внутрь клетки-реципиента, даже если конъюгацию не прерывать искусственно. Перенос всей хромосомы *E. coli* продолжается при 37°C около 100 мин. Эксперименты, осуществленные по принципу «прерванной конъюгации», сделали возможным составление генетических карт.

Разные штаммы *Hfr*, выделенные независимо друг от друга из одного и того же штамма F^+ , различаются по двум главным признакам: роль «начала» играет у каждого штамма иная точка хромосомы и каждый штамм отличается своей специфической последовательностью переноса генов. Результаты экспериментов согласуются с представлением о том, что фактор *F* при интеграции (т.е. при переходе в состояние *Hfr*) может включаться в бактериальную хромосому в одном из примерно 20 возможных генных локусов. При переносе бактериальная ДНК реплицируется, начиная от места включения фактора *F*, и вновь синтезируемая цепь, двигаясь 5'-концом вперед, проталкивается внутрь клетки-реципиента. Вслед за этим процессом переноса в клетке-реципиенте происходит гомологичная рекомбинация между донорской ДНК и собственной ДНК реципиента. Взаимоотношения между клеткой F^- , клеткой F^+ и клетками *Hfr* представлены на рис. 15.16.

Генетическая карта. В результате применения описанного выше метода прерванной конъюгации, позволяющего выяснить временную последовательность переноса генов из клетки-донора, можно составить карту расположения генов в бактериальной хромосоме (рис. 15.17). Скорость их переноса в течение всего процесса остается постоянной. Моменты перехода внутрь клетки-реципиента позволяют судить о расстояниях между ними в хромосоме. При использовании этого метода не удастся учитывать различия менее одной минуты. Для более тонкого картирования может служить анализ сцепления при трансдукции (переносе генов фагом).

Для *Escherichia coli* K12 известно расположение более чем тысячи генов, главным образом структурных, кодирующих ферменты. Последовательность расположения генов на бактериальной хромосоме была определена для *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis* и некоторых других бактерий.

Перенос генов при посредстве фактора F' . Интеграция (включение) фактора *F* в бактериальную хромосому обратима. *F*-фактор может быть высвобожден из хромосомы, и тогда клетка *Hfr* становится клеткой F^+ (рис. 15.16). Этот процесс «вырезания» (эксцизии, выключения) происходит примерно с той же частотой, что и интеграция. При правильной эксцизии разрыв происходит в том же самом месте, что и при интеграции. В редких случаях он происходит где-то очень близко к этому месту, и в результате соседний участок ДНК остается присоединенным к фактору *F*. Этот фактор *F*, содержащий небольшой фрагмент

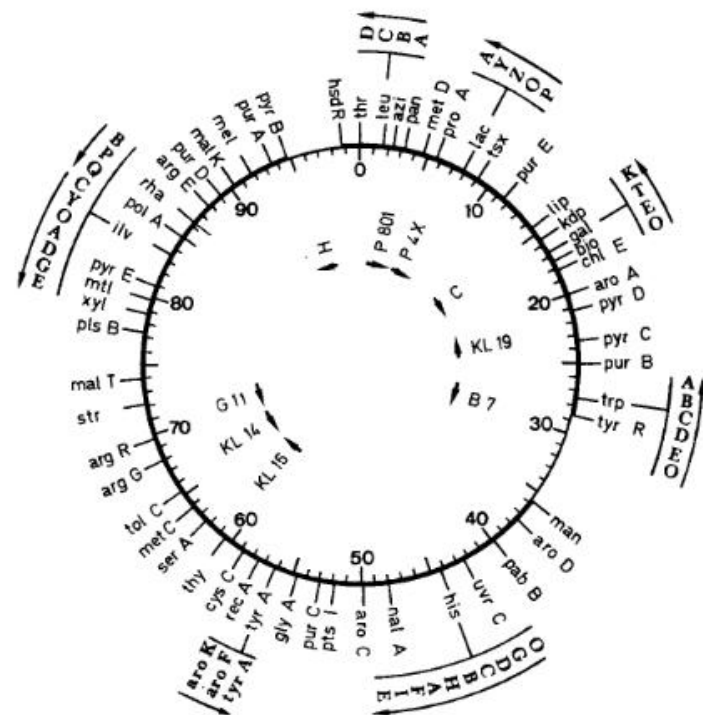


Рис. 15.17. Генетическая карта хромосомы *Escherichia coli*. Цифры соответствуют положению генов – они указывают, через сколько минут после начала конъюгации (в питательном бульоне при 37°C) те или иные гены переходят в клетку-реципиент. Красными стрелками внутри круга указана последовательность перехода генов в клетку-реципиент при конъюгации с клетками различных штаммов *Hfr* (направление перемещения хромосомы противоположно направлению стрелки). Красными стрелками вне круга обозначено направление, в котором считываются отдельные гены того или иного оперона при транскрипции (например, в *lac*-опероне – *P*, *O*, *Z*, *Y*, *A*). Обозначения генов: *azi* – устойчивость к азиду; *bio* – потребность в биотине; *gal* – использование галактозы; *his* – потребность в гистидине и гены ферментов, участвующих в его синтезе; *ilu* – потребность в изолейцине и валине; *lac* – оперон лактозы с генами: *P* – промотор, *O* – оператор, *Z* – β -галактозидаза, *Y* – галактозид-пермеаза, *A* – тиогактозид-трансацилаза; *proA* – потребность в пролине (блок перед глутаматполуальдегидом); *recA* – способность к генетической рекомбинации и репарации лучевых повреждений; *thr* – потребность в треонине; *trp* – потребность в триптофане. (Bachmann B. J., Bacteriol. Rev., 40 [1976], 116.)

хромосомной ДНК, называют фактором F' . Возникновение фактора F' аналогично образованию фага, осуществляющего специфическую трансдукцию (разд. 15.3.3).

Клетку, содержащую фактор F' , называют первичной клеткой F' . Включившаяся в *F*-фактор ДНК теперь может передаваться клетками-донорами F' штаммам F^- с такой же высокой частотой (100%), что

и при обычной передаче фактора F штаммами F^+ реципиентам F^- . Тот же самый фрагмент ДНК мог бы передаваться штаммом *Hfr* штамму F^- с максимальной частотой 1%. Если фактор F' будет перенесен из первичной родительской клетки F' (где он впервые возник) в нормальную клетку F^- , то образуется вторичная клетка F' , в которой небольшая участок бактериальной хромосомы окажется удвоенным (будет в диплоидном состоянии).

Распространенность конъюгации среди других групп бактерий. Передача генов путем конъюгации, открытая у *Escherichia coli*, очень широко распространена у энтеробактерий.

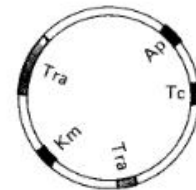
Посредством переноса факторов F из *E. coli* K12 в клетки *Salmonella* и *Shigella* удалось создать новые генетические системы. Сходные системы были найдены в группе псевдомонад. Конъюгация у энтеробактерий представляет собой высокоразвитый процесс; чтобы она осуществилась, достаточно суспендировать смесь клеток-партнеров в жидкой среде и оставить на некоторое время в покое. У многих других бактерий конъюгацию удается вызвать лишь в том случае, если колонии обоих партнеров будут хорошо перемешаны и размазаны на твердой среде, где они должны затем расти несколько дней. Если теперь распределить клетки по одной на селективной среде, то окажется, что у многих клеток возникла новая комбинация признаков и, по всей вероятности, произошел обмен крупными участками бактериальных хромосом. Процессы конъюгации широко изучались на *Streptomyces coelicolor*, видах *Nocardia*, *Rhizobium* и других бактериях. Обмен генами путем конъюгации и мобилизация генов с помощью плазмид, вероятно, очень распространены в мире прокариот.

Плазмиды

Многие (если не все) бактерии могут содержать внехромосомные элементы ДНК. Эти малые по сравнению с бактериальной хромосомой, замкнутые в кольцо двухцепочечные ДНК называют плазмидами. При росте в обычных условиях бактерии могут без них обходиться: клетки, «излеченные» от плазмид с помощью УФ-облучения, митомицина С или акридинового красителя, хорошо растут на обычных питательных средах. Плазмиды распознаются по особым свойствам, которые приобретает содержащая их клетка. Некоторые плазмиды делают клетку способной конъюгировать с другими клетками. Это обеспечивает дальнейшее распространение таких плазмид путем прямого межклеточного контакта. С прототипом подобного рода плазмиды мы уже встречались (с. 457) при рассмотрении F -факторов *Escherichia coli*.

Факторы фертильности (F -факторы). Это, как уже говорилось, плазмиды, которые могут включаться в бактериальную хромосому подобно ДНК умеренного фага лямбда. Они «мобилизуют» генетическую информацию этой хромосомы и осуществляют перенос ее в другую клетку. Такой перенос (конъюгация) был хорошо изучен на *E. coli*.

Рис. 15.18. Генетическая карта плазмиды RP4, обуславливающей устойчивость к антибиотикам. В этой плазмиде были найдены две области, содержащие большой и малый фрагменты *tra*; они ответственны за конъюгацию. Гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам — ампициллину (*Ap*), тетрациклину (*Tc*) и канамицину (*Km*), — распределены по разным участкам плазмиды.



Факторы резистентности (R -факторы). Бактерии, устойчивые (резистентные) к некоторым антибиотикам, были впервые открыты в 50-е годы в Японии. Речь идет о штаммах возбудителя дизентерии *Shigella*, выделенных от больных, которых лечили антибиотиками. Характерно то, что бактерии обнаруживали множественную устойчивость и что эта устойчивость могла передаваться другим бактериям, таким как *Escherichia coli*. Как стало теперь известно, факторы резистентности (R) содержат гены, которые делают клетку устойчивой, например, к сульфонидам, стрептомицину, хлорамфениколу и тетрациклину. Некоторые R -факторы обуславливают резистентность сразу к восьми антибиотикам, другие же придают устойчивость к ядовитым тяжелым металлам, например ртути, никелю, кадмию или кобальту. R -плазида несет две группы генов: 1) гены, ответственные за передачу плазмиды путем конъюгации (гены *tra*), — они образуют так называемый «фактор переноса устойчивости» (RTF, resistance transfer factor); 2) гены, обуславливающие собственно резистентность (они составляют лишь небольшую часть плазмиды) (рис. 15.18).

Фактор переноса устойчивости (RTF) включает все гены, ответственные за перенос фактора R из клетки в клетку, который осуществляется обычно путем конъюгации. Таким образом, фактор R , так же как и фактор F , в широком смысле инфекционен. Область RTF по своей молекулярной структуре гомологична соответствующей области F -фактора *E. coli*. Для некоторых R -факторов характерен широкий круг хозяев; возможен их перенос между несколькими разными родами бактерий, что способствует их дальнейшему распространению. В некоторых случаях наблюдали, что вместе с фактором R передаются и хромосомные гены, которые, по-видимому, были мобилизованы им.

Механизм устойчивости к антибиотикам, определяемой R -факторами, может быть не таким, как в случае ее хромосомного наследования. Наглядным примером этого служит резистентность к стрептомицину. Если она зависит от хромосомного гена, то она связана с изменением субъединицы 30S рибосомы, так что бактерия не имеет мишени для воздействия стрептомицина (разд. 2.2.2). В отличие от этого устойчивость, обусловленная R -фактором, основана на инактивации антибиотика в результате его аденилирования под влиянием фермента. Ферментативная химическая модификация антибиотиков часто бывает причиной устойчивости к ним, обусловленной плазмидами; например, хлорамфеникол ацетируется, канамицин и неомицин подвергаются фосфорилирова-

нию и ацетилированию, а пенициллин инактивируется пенициллиназой. Поскольку и при наличии *R*-факторов возможна генетическая рекомбинация, может возникнуть новое сочетание генов, придающее дополнительные свойства устойчивости. *R*-факторы имеют большое значение для химиотерапии; их существование – лишний довод против бесконтрольного применения антибиотиков, так как они могут распространяться в популяциях бактерий подобно инфекционным агентам.

Бактериоцины. Многие бактерии синтезируют белки, убивающие родственные виды или штаммы или тормозящие их рост. Эти белки с весьма специфическим действием, *бактериоцины*, кодируются особыми плазмидами, *бактериоциногенными факторами*. Бактериоцины были выделены из *Escherichia coli* (колицины), *Pseudomonas aeruginosa* (пиоцины), *Bacillus megaterium* (мегацины) и других бактерий.

Другие признаки, определяемые плазмидами. Плазмиды могут содержать также гены, обуславливающие ряд специфических биологических свойств, которые в определенных условиях создают селективное преимущество. Гены ферментов, необходимых для расщепления камфоры, салициловой кислоты, нафталина, октана, 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты и многих других необычных субстратов, могут находиться в плазмидах. Мы уже упоминали о плазмиде бактерии *Agrobacterium tumefaciens*, вызывающей опухоли у растений, и ее биохимической активности (разд. 4.3). Перечень свойств, наследуемых с плазмидами, стал сейчас очень длинным и включает, в частности, азотфиксацию, образование клубеньков, синтез индолилуксусной кислоты, диацетила, гидрогеназы, поглощение сахаров. Некоторые из этих свойств могут определяться генами бактериальной хромосомы; это свидетельствует о том, что более или менее часто происходит обмен генами или группами генов между хромосомой и плазмидой. Плазмиды, вероятно, играли очень важную роль в эволюции прокариот.

Несовместимость. Многие бактерии содержат плазмиды различной величины. Сосуществование разных плазмид в одной бактериальной клетке говорит о том, что такие плазмиды совместимы между собой. Однако две родственные плазмиды не могут сосуществовать в одной клетке – они несовместимы. Все плазмиды подразделяются на группы несовместимости: плазмиды, относящиеся к одной и той же группе, несовместимы друг с другом.

15.3.3 Трансдукция

Трансдукцией называют передачу ДНК от клетки-донора клетке-реципиенту при участии бактериофагов. Обычно при этом фаг переносит лишь небольшой фрагмент ДНК хозяина. Различают два вида трансдукции: **неспецифическую** (общую), при которой может быть перенесен любой фрагмент ДНК хозяина, и **специфическую**, затрагивающую лишь строго определенные фрагменты ДНК. При неспецифической трансдукции ДНК клетки-хозяина включается в частицу фага либо дополнительно к его собственному геному, либо вместо него, тогда как при специ-

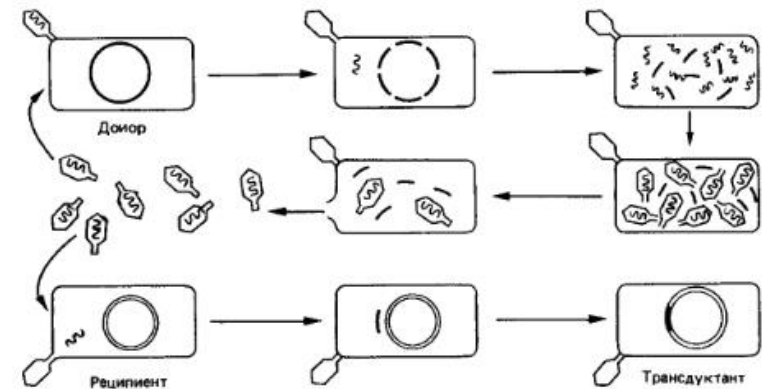


Рис. 15.19. Неспецифическая трансдукция – один из механизмов переноса ДНК из одной бактериальной клетки в другую.

фической трансдукции некоторые гены фага замещаются генами хозяина. В обоих случаях трансдуцирующие фаги, как правило, дефектны – например, они часто теряют способность лизировать клетку-хозяина. Передача признаков путем трансдукции была обнаружена у многих бактерий, в том числе у видов *Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Vibrio* и *Rhizobium*. Но не все фаги могут осуществлять трансдукцию, и не во все бактерии таким путем может быть перенесена ДНК.

Неспецифическая трансдукция. Перенос участков бактериальной хромосомы фагами был открыт в 1951 г. Ледербергом и Циндером у *Salmonella typhimurium*. В решающем эксперименте (рис. 15.19) штамм-донор V^+ инфицировали умеренным бактериофагом P22. После лизиса клетки-хозяина выделяли свободные фаги и инкубировали их вместе со штаммом-реципиентом V^- , который генетически отличался от штамма V^+ по меньшей мере одним признаком. Авторы нашли, что после высева инкубированных клеток на подходящую среду появлялись рекомбинанты, обладавшие признаками штамма-донора V^+ .

Процессы, происходящие при таком неспецифическом переносе ДНК, весьма сложны. Во время репродукции фага P22 в клетках штамма-донора V^+ в капсиды вместо фаговой ДНК могут включаться фрагменты бактериальной хромосомы. Таким образом, фаголизат содержит смесь нормальных и дефектных фагов. Заражение штамма-реципиента V^- нормальным фагом ведет, как правило, к лизису клеток. Однако в некоторые клетки проникают дефектные трансдуцирующие фаги, ДНК которых способна рекомбинироваться с хромосомой реципиента. Происходит обмен гомологичными участками ДНК, что может привести к замене дефектного гена реципиента интактным геном донора.

Так как трансдуцируются лишь небольшие фрагменты ДНК, вероятность рекомбинации, затрагивающей какой-то определенный признак,

очень мала: она составляет от 10^{-6} до 10^{-8} . Становится понятно, что с помощью одной частицы фага P22 *Salmonella* или неспецифически трансдуцирующего фага P1 *Escherichia coli* в каждом случае может быть трансдуцирован только один ген (или несколько очень близко расположенных генов). Количество бактериальной ДНК, сравнимое с геномом фага, составляет лишь 1–2% всего количества ДНК, содержащегося в бактериальной клетке. Исключение составляет бактериофаг PBS 1 *Bacillus subtilis*, который может трансдуцировать до 8% генома хозяина.

Специфическая трансдукция. Наиболее известным примером служит трансдукция, осуществляемая фагом λ (см. разд. 4.2.2). Обычно он трансдуцирует лишь определенные гены, а именно *gal* и *bio*. Как уже говорилось, этот фаг при переходе в состояние профага включается в определенный участок хромосомы бактерии-хозяина – между генами *gal* и *bio*. Отделение фаговой ДНК от бактериальной хромосомы (например, в результате УФ-облучения) может произойти неточно, т.е. какой-то фрагмент ее останется в хромосоме, а близко расположенные гены клетки-хозяина будут захвачены фаговой ДНК. По-видимому, причиной этого может быть неправильная рекомбинация.

В случае заражения трансдуцирующим фагом клеток, дефектных по определенному гену, например *gal*⁻, может произойти рекомбинация с заменой собственного дефектного гена бактерии интактным трансдуцированным геном; при этом образуются рекомбинанты (трансдуктанты) *gal*⁺.

Подобным же образом происходит перенос генов бактериофагом Phi 80. Его ДНК включается в хромосому вблизи генов, кодирующих ферменты, ответственные за биосинтез триптофана. По этой причине Phi 80 особенно пригоден для переноса генов *trp*.

Предпосылкой успешного переноса генов при специфической трансдукции (в отличие от неспецифической) является интеграция фага в геном клетки-хозяина.

В некоторых случаях было показано, что трансдуцированный фрагмент ДНК не вступает в рекомбинацию с хромосомой реципиента, а остается вне хромосомы. В этом случае клетка становится гетерозиготной по перенесенным генам. Перенесенная ДНК транскрибируется (на это указывает синтез соответствующего генного продукта), но не реплицируется. Это приводит к тому, что при клеточном делении донорский фрагмент переходит только в одну из дочерних клеток (**абортивная трансдукция**). Если реципиент ауксотрофный, а перенесенный фрагмент исправляет соответствующий дефект, то расти могут только те клетки, которые унаследовали этот фрагмент; при посеве на агар они образуют мельчайшие колонии.

15.3.4 Трансформация

Гены могут также передаваться из клетки в клетку без всякого межклеточного контакта и без каких-либо переносчиков. Такую передачу генов при помощи свободной растворимой ДНК, выделенной из клеток-доноров, называют трансформацией. У бактерий такой способ передачи при-

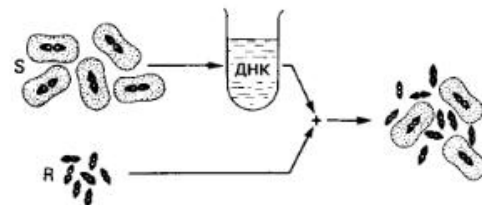


Рис. 15.20. Трансформация *Streptococcus pneumoniae* (схема). Способность к образованию капсулы передается бескапсульному штамму (R) при помощи интактной ДНК, экстрагированной из капсулообразующего штамма (S). (Nultsch W., Allgemeine Botanik, 3. Aufl., Stuttgart: Thieme, 1968.)

знаков стал известен раньше других, и это открытие сыграло важную роль в истории науки.

Открытие роли ДНК как генетического материала. В 1928 г. Гриффит описал превращение бескапсульного R-штамма *Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*) в штамм, образующий капсулу, т.е. в S-форму (рис. 15.20). Гриффит ввел мышам небольшое количество авирулентных R-клеток и одновременно убитые нагреванием S-клетки. R-клетки происходили от S-штамма (SII), капсульное вещество которого принадлежало к иному серологическому типу, нежели капсульное вещество S-штамма, убитого нагреванием (SIII). Из крови погибших мышей были выделены вирулентные бактерии с капсулой типа SIII. Это означало, что убитые клетки типа SIII передали наследственную способность к образованию капсул типа SIII R-клеткам, которые в свою очередь передали ее своему потомству. Природу «трансформирующего фактора» удалось установить Эвери, Мак-Леоду и Мак-Карти в 1944 г. Оказалось, что этот фактор представляет собой ДНК. Это открытие явилось решающим аргументом в пользу того, что генетическая информация содержится в ДНК, а не в белке.

Компетенция. Позже возможность передачи признаков с помощью очищенной ДНК была доказана для *Haemophilus influenzae*, *Neisseria*, *Rhizobium*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* и многих других бактерий. Этим способом могут передаваться такие признаки, как устойчивость к различным ядам и прототрофность в отношении отдельных аминокислот. Трансформировать удастся только те бактерии, в клетки которых может проникать высокомолекулярная двухцепочечная, т.е. интактная, ДНК. Для трансформации требуются чрезвычайно малые концентрации ДНК: 0,1 мкг на 1 мл суспензии клеток-реципиентов достаточно, чтобы трансформировать компетентные клетки (доля их в клеточной популяции составляет максимум 15%). Компетенцией называют способность клеток поглощать ДНК. Компетенция зависит от физиологического состояния клетки: она наиболее высока в середине фазы экспоненциального роста, а затем быстро снижается до минимума. Предполагают, что клеточная поверхность изменяется на протяжении цикла роста и ДНК может поглощаться только в определенную, относительно короткую его фазу. Бактерии,

раньше считавшиеся некомпетентными (такие, как *E. coli*), удавалось сделать компетентными путем модификации клеточной поверхности, например с помощью обработки хлоридом кальция. Можно ожидать, что передача признаков посредством трансформации будет приобретать все большее значение.

Хотя в компетентные клетки может проникать любая ДНК, рекомбинация происходит лишь в том случае, если это ДНК близко родственного вида: тогда возможен обмен гомологичными участками между собственной и проникшей извне ДНК.

15.3.5 Рестрикция и модификация

Бактериофаги, как правило, проявляют специфичность в отношении хозяев: они инфицируют только один штамм бактерий или ограниченное число родственных штаммов, видов или родов бактерий. В основе этой специфичности лежат прежде всего рецепторные свойства поверхности бактериальных клеток (разд. 4.2.1).

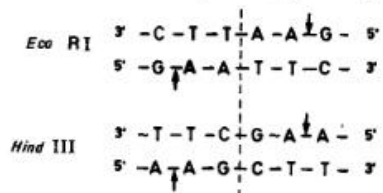
Кроме того, у бактерий есть и другие системы, обуславливающие специфичность взаимоотношений с фагами. Одна из таких систем получила название **рестрикции**. Суть ее можно проиллюстрировать на следующем примере. Если бактериофаг λ вырастить на штамме *A Escherichia coli* и затем инфицировать полученным лизатом другой штамм *B*, то в культурах штамма *B* фаг будет расти значительно хуже, чем на штамме *A*. Если же немногочисленные фаговые частицы, образовавшиеся на штамме *B*, использовать для заражения другой культуры штамма *B*, то размножение фага вновь будет нормальным; однако если перед этим фаг снова провести через исходный штамм *A*, то на штамме *B* он опять будет расти очень плохо. Таким образом, рестрикция (ограничение репродукции фага) зависит от того хозяина, в котором данный фаг выращивали предыдущий раз. Она обусловлена расщеплением инфицирующей фаговой ДНК под действием фермента, специфичного для штамма-хозяина. Такого рода ферменты называют **рестрикционными эндонуклеазами**. Благодаря своему нуклеазному действию они препятствуют проникновению чужеродной ДНК в бактериальную клетку.

Очевидно, что бактериальная клетка должна как-то защищать свою ДНК от воздействия собственной рестрикционной эндонуклеазы. Такую защиту обеспечивает метилирование или глюкозилирование определенных оснований ДНК, обычно аденина или цитозина. Этот процесс известен под названием **модификации**. Из него извлекают пользу также и фаги, размножающиеся в клетках определенного штамма бактерий. На фаговую ДНК при ее синтезе в клетках данного типа накладывается тот же «отпечаток», что и на ДНК самой клетки: в присутствии модифицирующего фермента фаговая ДНК видоизменяется таким же образом, как и ДНК хозяина. Она так же метилируется и приобретает свойства, защищающие ее от воздействия рестрикционных ферментов данного штамма бактерий.

Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы). Эти ферменты могут

кодироваться не только геномом бактерии, но также бактериофагами и плазмидами. Все они разрезают двухцепочечные ДНК. Различают несколько классов рестрикционных ферментов. Ферменты класса 1 распознают какую-то определенную последовательность нуклеотидов, но и вне этой области могут неспецифически расщеплять ДНК. К ним относится рестрикционная эндонуклеаза из бактериофага P1. Ферменты класса 2 отличаются тем, что разрывают цепи ДНК только в определенных точках распознаваемой ими области. Это ведет к образованию совершенно определенных фрагментов ДНК. Рестрикционные эндонуклеазы класса 2 используются при молекулярном клонировании, которое будет рассмотрено в следующем разделе.

Примером рестриктаз класса 2, специфически расщепляющих ДНК, может служить рестриктаза *EcoRI*, действие которой поясняется ниже. Последовательность, распознаваемая этим ферментом, состоит из шести пар оснований, образующих **палиндром** (в двух цепях последовательности одинаковые, но идут в противоположных направлениях).



Места расщепления ДНК, указанные стрелками, лежат вне оси симметрии. В результате несовпадения разрывов образуются одноцепочечные концы из четырех пар оснований.

Число известных и охарактеризованных рестриктаз непрерывно растет, так как эти ферменты играют важную роль и в фундаментальных, и в прикладных исследованиях в области молекулярной генетики. Например, полученные с их помощью фрагменты ДНК (**рестрикционные фрагменты**) можно расположить в такой последовательности, что это даст возможность построить физическую карту генетического материала.

15.3.6 Метод молекулярного клонирования

Рассмотренный в предыдущих разделах обмен участками хромосомной ДНК у бактерий был в основном ограничен пределами одного вида. Но, как мы уже упоминали, передача внехромосомных молекул ДНК, способных к автономной репликации, может преодолеть этот барьер.

При молекулярном клонировании (рис. 15.21) используют плазмиды в качестве переносчиков (векторов) для введения в бактериальную клетку и репродукции в ней чужеродной ДНК, которая может быть даже эукариотического происхождения. Для этой цели плазмиду и соответствующую чужеродную ДНК обрабатывают специфической рестриктазой, например *EcoRI*. В результате из обоих препаратов ДНК

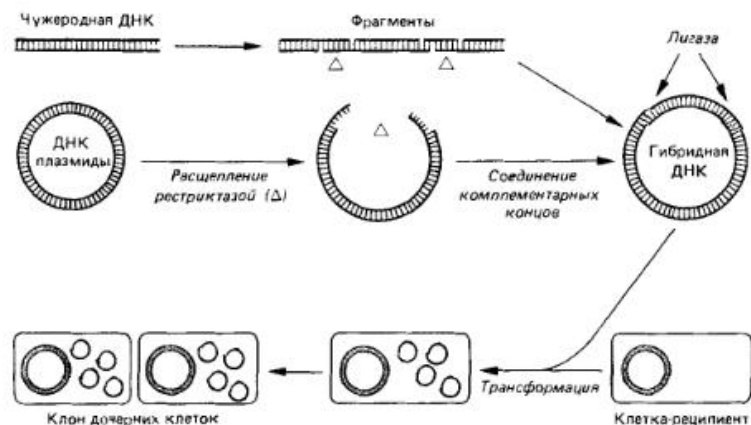


Рис. 15.21. Получение гибридной ДНК путем вставки фрагмента эукариотической ДНК в бактериальную плазмиду (упрощенная схема). Чужеродную ДНК и ДНК плазмиды расщепляют *in vitro* с помощью одной и той же рестрикционной эндонуклеазы. При этом получают фрагменты с «липкими» концами (одноцепочечными концевыми участками с комплементарными основаниями). В результате смешивания таких фрагментов и обработки лигазой образуются плазмиды с включенной в них эукариотической ДНК. Эти гибридные ДНК можно вводить в подходящие бактерии и размножать, получая массовые культуры трансформированных клонов. Из такого клона удастся выделить чужеродную ДНК.

образуются линейные фрагменты ДНК с одноцепочечными концами, состоящими из последовательностей ААТТ или ТГАА. Если полученные таким образом фрагменты той и другой ДНК смешать, то в результате спаривания оснований произойдет соединение комплементарных одноцепочечных концов. Места разрывов ковалентно связывают, добавляя полинуклеотидлигазу. Этим этапом заканчивается создание рекомбинантной молекулы ДНК — так называемой гибридной плазмиды (хи-мерной ДНК).

Для того чтобы генетическая информация гибридной плазмиды могла проявиться, необходим белоксинтезирующий аппарат бактериальной клетки. Поэтому плазмиду вводят в бактериальную клетку путем трансформации (см. выше). Если гибридная плаزمидка будет представлена в клетке в большом числе копий, то чужеродная ДНК будет многократно воспроизводиться вместе с плазмидой. Потомство клетки, содержащей гибридную ДНК, генетически однородно — оно образует клон.

Метод клонирования нашел множество новых применений. С помощью микробов можно получать большие количества чужеродной ДНК, чтобы исследовать ее. Если в бактериальной клетке происходит экспрессия генов такой ДНК, это позволяет микробиологическим путем получать, например, гормоны и ферменты. Новый метод может быть применен на пользу человека; поскольку, однако, конструирование

новых ДНК при неумелом обращении с материалом сопряжено с опасностью, практическое применение описанного метода требует строгого соблюдения ряда предосторожностей.

15.3.7 Слияние протопластов

Еще 15 лет назад был разработан метод гибридизации соматических клеток для проведения генетических исследований на клеточных культурах. На его основе была создана методика генетической рекомбинации путем искусственно вызываемого слияния протопластов; ее уже удалось с успехом применить на материале грибов и растений. Первичный продукт такого слияния — клетка, объединяющая в себе геномы обеих родительских клеток.

Лишь недавно этот метод генетической рекомбинации был испытан и на бактериях: получали протопласты и затем индуцировали их слияние путем обработки полиэтиленгликолем. Из слившихся протопластов в определенных экспериментальных условиях регенерировали морфологически полноценные клетки, из которых получались стабильные рекомбинанты, обладавшие некоторыми признаками обоих родительских штаммов. Пока этот метод успешно применялся только в отношении грам-положительных бактерий, таких как *Bacillus* и *Streptomyces*. Следует ожидать, что в будущем он найдет более широкое применение.

В отличие от механизмов переноса ДНК, описанных ранее, а именно конъюгации, трансдукции и трансформации, при которых ДНК передается от донора реципиенту, перенос генетической информации при слиянии протопластов не носит однонаправленного характера.

В предшествующих главах, посвященных обмену веществ у микроорганизмов, неоднократно шла речь о регуляции метаболизма и роста факторами среды. Обнаруженное еще Пастером подавление брожения атмосферным кислородом у дрожжей – превосходный пример такой регуляции, весьма детально изученный. Давно известно также, что некоторые ферменты, участвующие в расщеплении того или иного субстрата, образуются только в его присутствии. У денитрифицирующих бактерий нитратное дыхание может начаться лишь в отсутствие O_2 : кислород подавляет и образование нитратредуцирующей ферментной системы, и ее функцию. Изменение pH в культурах *Enterobacter* или *Clostridium* способно изменить ход брожения и повлиять на природу образующихся продуктов. У фототрофных бактерий кислород и свет влияют на синтез пигментов. В основе этих и многих других изменений, обусловленных средой, лежат специальные регуляторные механизмы.

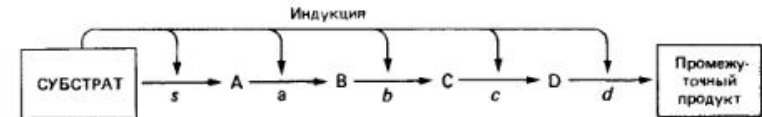
Многообразие обменных процессов, необходимых для синтеза различных веществ и роста клеток, требует их хорошей координации. Каждый метаболический путь включает несколько ферментативных реакций. Процессы метаболизма обеспечивают получение энергии в биологически доступной форме, синтез простых структурных компонентов и сложных макромолекул, а также редупликацию клетки. Необходимость выдержать конкуренцию с другими живыми существами привела к развитию механизмов, которые, с одной стороны, дают возможность приспосабливаться к меняющимся условиям внешней среды, а с другой – оптимально согласовывают между собой различные метаболические процессы. Объектами такой оптимизации могут быть ферментные белки, их синтез и функционирование. Регуляция клеточного метаболизма происходит на двух уровнях – на уровне синтеза ферментов и на уровне изменения их активности.

Первый тип регуляции свойствен многим метаболическим путям. Как правило, одновременно регулируется синтез многих ферментов, относящихся к одному и тому же пути. Цель этой регуляции – обеспечить нужное соотношение между скоростью синтеза определенных ферментов и скоростью синтеза суммарного клеточного белка. Эта скорость определяется частотой транскрипции структурных генов.

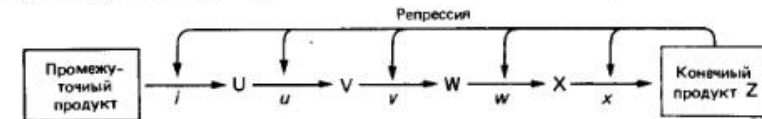
Многие ферменты образуются непрерывно вне зависимости от условий среды; такие ферменты называют **конститутивными** (соответственно

говорят также о конститутивных генах и конститутивном синтезе ферментов).

Образование катаболических ферментов регулируется путем **индукции**. С точки зрения экономности клеточного метаболизма выгодно, чтобы ферменты, участвующие в использовании субстрата и включении продуктов его распада в промежуточный обмен, синтезировались лишь в тех случаях, когда данный субстрат имеется в питательной среде. Все другие катаболические ферменты, которые клетка способна синтезировать, не должны образовываться, пока в них нет надобности.

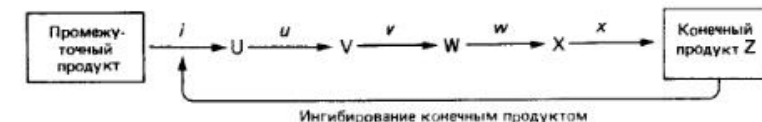


Образование анаболических ферментов регулируется путем **репрессии**. С точки зрения той же экономии выгодно, чтобы ферменты определенного биосинтетического пути не синтезировались, если его конечный продукт имеется в среде. Поэтому в присутствии такого конечного продукта или при его накоплении снижается скорость синтеза всех ферментов, специфичных для данного биосинтетического пути.



Ферменты, необходимые для синтеза основных структурных компонентов клетки, обычно образуются непрерывно, но их образование подавляется (репрессируется), если конечный продукт имеется в избытке. В таких случаях говорят о **репрессии конечным продуктом**.

Регуляция на уровне активности ферментов свойственна, как правило, только ключевым ферментам клеточного метаболизма. Каталитическая активность ферментов, участвующих в том или ином пути биосинтеза, может подвергаться изменениям; она может повышаться (под действием положительного фактора) или снижаться (под действием отрицательного фактора). При **ингибировании конечным продуктом** (ретроингибировании) этот продукт подавляет активность первого фермента, участвующего в данной цепи реакций.



Оба типа регуляции – индукция и репрессия, с одной стороны, и изменение активности фермента, с другой, – приводят к почти одинаковому результату: они влияют на «пропускную способность» того или иного метаболического пути. Индукция и репрессия действуют медленно,

и их можно рассматривать как механизмы грубой регуляции. Изменение активности ключевого фермента проявляется мгновенно; это уже тонкая регуляция.

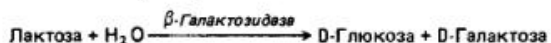
16.1 Регуляция синтеза ферментов

Многие бактерии могут расти, используя большое число различных субстратов. Это означает, что они способны синтезировать все ферменты, необходимые для превращения этих субстратов, т.е. имеют соответствующие структурные гены. Если в питательной среде содержится только один субстрат, то в клетках образуются ферменты, необходимые для расщепления (катаболизма) именно этого субстрата. Соответственно говорят об **индукции ферментов**, индуцирующем субстрате и индуцируемых (индуцибельных) ферментах. Для синтеза большинства ферментов, участвующих в катаболизме субстратов, требуется индукция.

Образование ферментов, участвующих в процессах анаболизма, например в биосинтезе пиримидинов, пуринов и 20 аминокислот, регулируется путем **репрессии**. В большинстве случаев сигнал к остановке биосинтеза белков исходит от конечных продуктов этого процесса (репрессия конечным продуктом). Если в среде имеются одновременно два субстрата, то бактерия обычно «предпочитает» тот субстрат, который обеспечивает более быстрый рост. Синтез ферментов, расщепляющих второй субстрат, репрессируется; в этом случае говорят о **катаболической репрессии**.

16.1.1 Индукция

Индукция β-галактозидазы. Один из наиболее изученных примеров индукции синтеза ферментов — это синтез фермента, необходимого для использования лактозы клетками *Escherichia coli* (рис. 16.1). Лактоза — дисахарид, который, прежде чем вступить на путь катаболизма гексоз, должен быть расщеплен:



Клетки дикого типа, растущие на среде с глюкозой, содержат лишь едва заметные следы β-галактозидазы. Если же выращивать их на среде с лактозой или иным β-галактозидом, то β-галактозидазная активность увеличивается в 1000 раз: этот фермент может составлять около 3% всего клеточного белка! Он обычно образуется только в присутствии индуцирующего вещества — лактозы. Изучению механизма регуляции существенно помогло применение не используемого бактерией индуктора — 2-пропил-β-тиогалактозида. Добавление этого вещества приводит к «обманной» индукции β-галактозидазы: фермент образуется, но не может гидролизовать соединение, индуцировавшее его синтез, и сделать его доступным для дальнейших превращений.

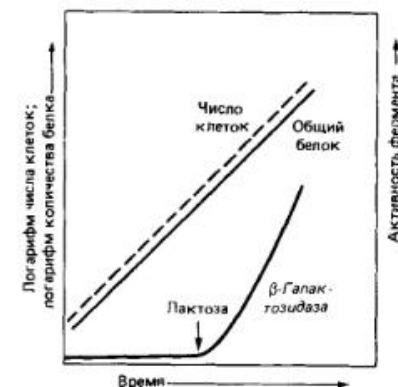
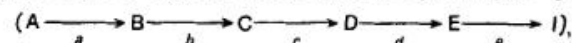


Рис. 16.1. Индукция образования β-галактозидазы. После добавления к питательной среде лактозы начинается синтез β-галактозидазы.

Координированная и последовательная индукция. Если при расщеплении субстрата А образуется последовательный ряд промежуточных продуктов В, С и т.д. и в этом процессе участвуют ферменты *a*, *b*, *c* и т.д.:



то теоретически возможны несколько схем индукции ферментов (рис. 16.2):

1. Синтез отдельных ферментов может происходить поэтапно, или последовательно; при этом каждый следующий фермент индуцируется продуктом предшествующей реакции.
2. Синтез всех ферментов данной цепи реакций индуцируется координированно, т.е. субстрат А вызывает одновременное образование всего ряда ферментов от *a* до *e*.
3. Несколько ферментов, катализирующих ряд начальных реакций (например, *a*, *b*, *c*), индуцируются совместно, после чего продукт последней из этих реакций (*D*) или какой-либо другой из них (например, *C*) индуцирует синтез ферментов следующей серии реакций (*d*, *e*).

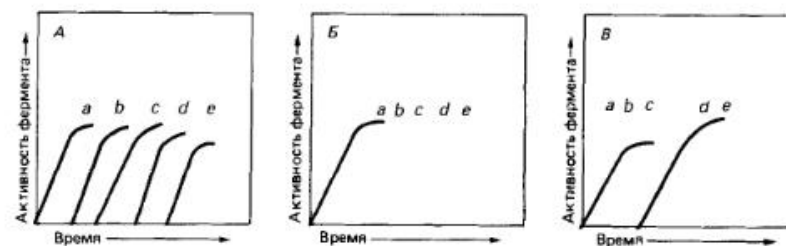
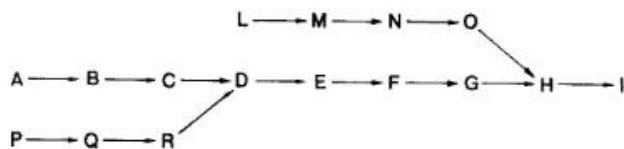


Рис. 16.2. Время появления индуцибельных ферментов при разных типах индукции. А. Строго последовательная индукция. Б. Полностью координированная индукция. В. Последовательная индукция координированно регулируемых групп ферментов. В нулевое время к клеткам, выросшим в условиях, не вызывавших индукции, добавляли индуцирующий субстрат.

Координированный синтез всех ферментов, необходимых для использования того или иного субстрата, дает клетке то преимущество, что она может быстро реагировать на его появление. При последовательной индукции скорость превращения субстрата, а значит, и скорость роста клеток увеличиваются медленно, так как концентрация продукта первой реакции в клетке должна достигнуть определенного порогового уровня, прежде чем она будет стимулировать образование второго фермента. При регуляции синтеза ферментов конвергирующих (сходящихся) путей катаболизма представляется целесообразным под-



разделение этих ферментов на совместно (координированно) регулируемые группы, синтез которых в свою очередь индуцируется продуктом предыдущей группы ферментов. Регуляция синтеза ферментов сходящихся катаболических путей детально изучалась на примере расщепления миндальной кислоты, 4-гидроксибензойной кислоты и триптофана клетками *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaceticus* и *Alcaligenes eutrophus*; схемы регуляции у разных видов оказались различными.

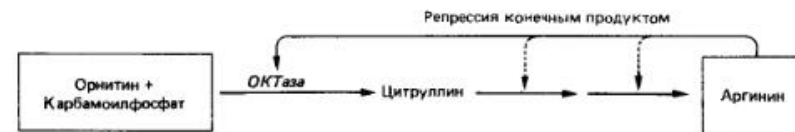
Индукция продуктами реакций. Синтез некоторых ферментов индуцируется продуктом первой или следующей реакции данного катаболического пути. Это имеет место, например, при расщеплении триптофана; путь этого процесса идет от L-триптофана через L-формилкинурунин, L-кинурунин и антраниловую кислоту к пирокатехину. Индуктором для соответствующей группы ферментов служит кинурунин:



При этом типе индукции «основной» (минимальный) уровень ферментов, участвующих в превращении триптофана в кинурунин, должен быть достаточно высок для того, чтобы при наличии высокой концентрации субстрата — триптофана — могли образоваться хотя бы следовые количества кинурунина. Индукцию продуктом при расщеплении L-триптофана через L-кинурунин можно рассматривать как защитный механизм, предотвращающий индукцию катаболических ферментов эндогенно синтезируемым триптофаном, необходимым для синтеза белка. Триптофан разлагается лишь тогда, когда он добавлен к питательной среде и поэтому клетки содержат его в высокой концентрации.

16.1.2 Репрессия

Репрессия конечным продуктом. Влияние конечного продукта биосинтетического пути на концентрацию ферментов этого пути можно проиллюстрировать на примере синтеза аргинина (рис. 16.3). Аргинин синтезируется из глутамата (см. рис. 7.17) через орнитин, цитруллин и аргининосукцинат:



При выращивании клеток *Escherichia coli* на минимальной среде концентрация одного из ферментов биосинтеза аргинина — орнитин:карбамоил-трансферазы (ОКТаза) — оказывается «обычной». При добавлении к минимальной среде аргинина (20 мкг/мл) образование ОКТаза сразу же прекращается вследствие репрессии. В результате дальнейшего роста клеток в присутствии аргинина происходит «разбавление» фермента, и его активность падает до очень низкого уровня. Если теперь отмыть клетки от аргинина и перенести их в минимальную среду, не содержащую этой аминокислоты, то сразу же произойдет дерепрессия и синтез ОКТаза возобновится. Спустя короткое время концентрация фермента во много раз превысит его содержание в исходной суспензии клеток (рис. 16.4).

Лишь постепенно, после того как синтез анаболических ферментов приведет к образованию и накоплению аргинина, активность ОКТаза вновь снизится и достигнет «обычного» уровня.

На мутантах, дефектных по одному из ферментов биосинтеза аргинина, путем опытов в хемостате удалось показать, что состояние дерепрессии может сохраняться: если рост клеток лимитируется аргинином, активность фермента в 25 раз выше «обычного» уровня.

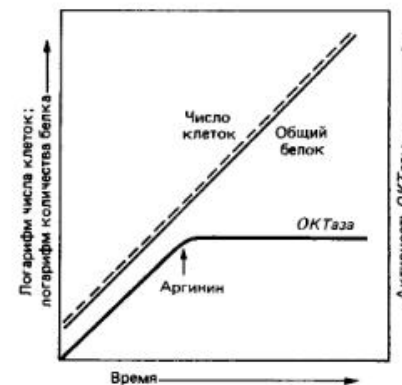


Рис. 16.3. Репрессия орнитин:карбамоил-трансферазы. Образование ферментов, необходимых для биосинтеза аргинина, при добавлении к среде аргинина почти мгновенно прекращается (репрессируется).

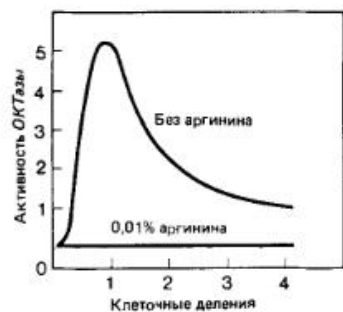


Рис. 16.4. Ускоренное образование орнитин:карбамоил-трансферазы при дерепрессии аргининового оперона. Клетки *Escherichia coli* (дикого типа) выращивали на минимальной питательной среде, содержащей избыток аргинина. Затем клетки отмывали, сuspendировали одну часть в минимальной среде с аргинином, а другую в среде без аргинина и снова инкубировали. Через различные промежуточные времени брали пробы и определяли в них плотность бактериальной суспензии и активность важного фермента данного биосинтетического пути — орнитин:карбамоил-трансферазы. Как видно из графика, в отсутствие аргинина активность этого фермента за короткое время превысила нормальную, но в дальнейшем в результате разбавления снизилась до нормы. При наличии в среде аргинина фермент не синтезировался. (Gorini L., Maas W.K., *Biochim. Biophys. Acta*, 25 [1957], 208.)

Схемы регуляции при разветвленных путях биосинтеза. Регуляция образования ферментов, участвующих в разветвленных путях биосинтеза, очень сложна. Примерами могут служить системы, синтезирующие «семейство ароматических аминокислот», «семейство аспарагиновой кислоты» и «семейство пировиноградной кислоты» (см. рис. 7.17). Очевидно, что каждый конечный продукт может репрессировать образование ферментов только специфического пути биосинтеза. Ферменты, находящиеся перед местом разветвления путей, подвержены репрессии всеми конечными продуктами, действующими одновременно (мультивалентная репрессия). Синтез этих ферментов подавляется лишь тогда, когда в питательной среде присутствуют все конечные продукты; если же добавлять их по отдельности, они такого эффекта не оказывают.

Интересный пример разветвленного пути биосинтеза — образование L-изолейцина, L-лейцина и L-валина. В роли катализатора четырех этапов биосинтеза валина из пирувата и изолейцина из 2-оксобутирата выступает на каждом этапе в обеих цепях один и тот же фермент (рис. 16.5), а образующийся 2-оксоизовалерат (2-оксо-3-метилбутират) служит общим предшественником валина и лейцина.

Катаболическая репрессия. В то время как репрессия конечным продуктом действует на путях биосинтеза, при помощи катаболической репрессии регулируются катаболические реакции. Если в питательной среде содержатся два разных субстрата, то, как правило, бактерии «предпочитают» тот, который обеспечивает более быстрый рост. Этот субстрат вызывает репрессию синтеза тех ферментов, которые нужны для ис-

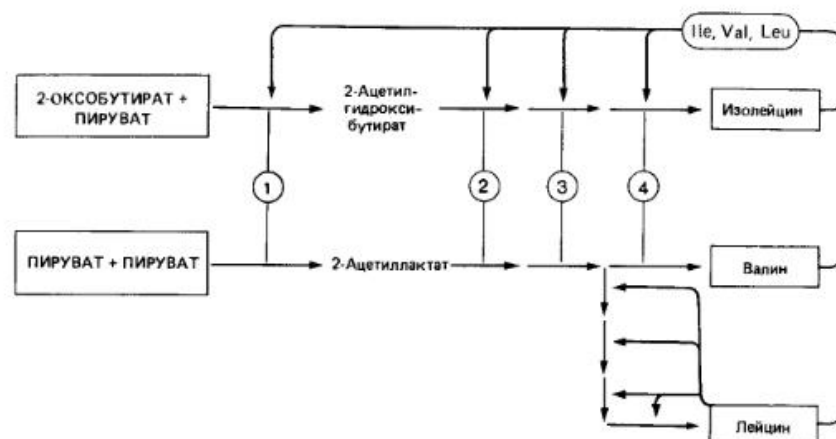


Рис. 16.5. Регуляция образования ферментов, находящихся на путях биосинтеза L-изолейцина, L-валина и L-лейцина, путем мультивалентной (в данном случае тривалентной) репрессии. Ферменты синтеза ацетилгидроксициклот (1), изомероредуктаза ацетилгидроксициклот (2), дегидратаза дигидроксициклот (3) и трансминаза (4) функционируют одновременно на путях биосинтеза изолейцина и валина.

пользования второго субстрата (рис. 16.6). Катаболическая репрессия лежит в основе, например, известного явления диауксин (см. рис. 6.7). При наличии двух субстратов (глюкоза + сорбит, глюкоза + ацетат) они используются клетками *E. coli* не одновременно, а последовательно. Сначала используется глюкоза, и при этом она подавляет синтез ферментов, необходимых для расщепления второго субстрата.

Сложнее обстоит дело, когда та или иная аминокислота служит для клеток не только источником энергии и углерода, но также источником

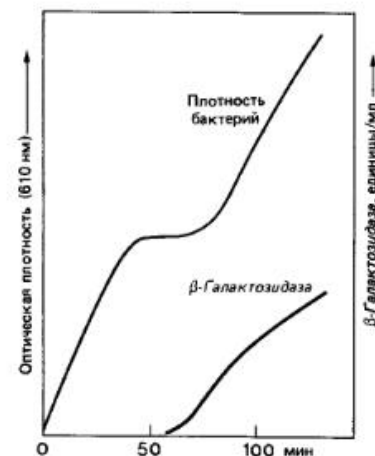


Рис. 16.6. «Эффект глюкозы», или катаболическая репрессия. Замедленное образование β-галактозидазы у *Escherichia coli*. Питательная среда вначале содержала 0,4 мг/мл глюкозы и 2 мг/мл лактозы. Пока в среде есть глюкоза, образование β-галактозидазы репрессировано. (Erstein W. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 24 [1966], 588.)

Таблица 16.1. Содержание гистидазы в клетках *Enterobacter aerogenes* после роста на различных средах (Neidhardt F. C., Magasanik B., J. Bacteriol., 73, [1957], 253)

Добавки к основной питательной среде			Содержание гистидазы, Е на 10 мг клеточной массы
Глюкоза	Гистидин	(NH ₄) ₂ SO ₄	
+	-	+	< 5
+	+	+	< 5
-	+	-	182
-	+	+	170
+	+	-	70

азота. На примере использования гистидина клетками *Enterobacter aerogenes* видно, как может влиять глюкоза на содержание ферментов, с помощью которых происходит усвоение какой-либо аминокислоты. Измеряли содержание в клетках гистидазы, взятой в качестве типичного катаболического фермента (табл. 16.1). В среде, содержащей глюкозу и аммонийный азот, образования гистидазы не происходило даже в присутствии гистидина. Глюкоза и ионы аммония совместно почти полностью подавляли синтез этого фермента. При отсутствии ионов NH₄⁺, т.е. в условиях, когда клетки не имели дополнительного источника азота и должны были использовать азот гистидина, репрессирующее действие глюкозы на синтез гистидазы было менее выражено. Этот пример показывает, что недостаток азота может частично снимать катаболическую репрессию, вызываемую глюкозой. Таким образом, синтез катаболического фермента зависит здесь не только от наличия индуктора и источника энергии, но и от присутствия азота в среде.

Регулирование концентрации ферментов центральных метаболических путей. Эти ферменты тоже могут быть подвержены регуляции. В клетках *Escherichia coli*, растущих в аэробных условиях, ферменты цикла трикарбоновых кислот присутствуют в высокой концентрации; между тем при росте в анаэробных условиях их активность в 10–20 раз меньше, а образование 2-оксoglutarатдегидрогеназы бывает полностью подавлено. Некоторые анаэробные ферменты, такие как малатсинтаза, изоцитрат-лиаза и глиоксилат-карболигаза, содержатся только в тех клетках, которым они необходимы для использования имеющегося субстрата.

16.1.3 Механизмы индукции и репрессии

Теоретически регуляция синтеза ферментов могла бы осуществляться как при транскрипции, так и при трансляции. Как выяснилось, экспрессия генов у прокариот регулируется главным образом на уровне транскрипции. Большинство генов, кодирующих структуру полипептидных цепей, подвержено регуляции – точнее, регулируется их транскрипция. От условий среды и состояния клеточного метаболизма зависит, будут

ли синтезироваться определенные ферменты, т.е. будут ли вообще и с какой частотой транскрибироваться соответствующие гены.

Для такой регуляции нужно, чтобы к ДНК из других частей клетки поступали определенные сигналы. Сигнальные вещества, или **молекулы-эффекторы**, представляют собой низкомолекулярные соединения, такие как сахара или их производные, аминокислоты или нуклеотиды. Поскольку такие эффекторы не могут вступать в прямое взаимодействие с ДНК, посредником для каждого из них служит определенный **регуляторный белок**. Если эффектор присутствует в клетке в высокой концентрации, то в результате специфического присоединения к регуляторному белку он изменяет его конформацию и тем самым – его способность связываться с ДНК. Регуляторный белок, который связывается с ДНК в отсутствие эффектора (**индуктора**), называют **репрессором**. Если же белок связывается с ДНК в присутствии эффектора (**корепрессора**), его называют **апорепрессором**.

Участки ДНК, к которым присоединяются регуляторные белки, – это не сами структурные гены, а непосредственно прилегающие к ним области, называемые промоторами и операторами. Промотор представляет собой последовательность оснований, распознаваемую ДНК-зависимой РНК-полимеразой; он служит местом связывания РНК-полимеразы, и от него начинается транскрипция. С промотором связаны и гены, экспрессия которых не подвержена регуляции. Промоторы регулируемых генов могут изменять свои свойства в результате связывания регуляторных белков. **Оператор** представляет собой нуклеотидную последовательность, расположенную между промотором и структурными генами. Он тоже взаимодействует с регуляторным белком-репрессором, от которого зависит, будет ли подавлена транскрипция или она произойдет. Промотор, оператор и структурные гены образуют **оперон**. Опероном называют группу функционально связанных между собой генов. Белки, кодируемые генами одного оперона, – это, как правило, ферменты, катализирующие разные этапы одного метаболического пути. Транскрипция генов оперона ведет к синтезу одной общей (полицистронной) молекулы мРНК.

За синтез регуляторных белков ответственны **гены-регуляторы**, которые, вероятно, являются конститутивными. Они могут располагаться по соседству с соответствующим опероном, но это не обязательно.

По-видимому, РНК-полимераза способна правильно присоединиться к промотору только в форме полного голофермента. Она состоит из субъединиц α , β , β^1 , σ и ω . В отсутствие легко отделяющегося фактора сигма (σ) фермент обладает полной каталитической активностью, но не способен связываться со специфическим участком ДНК – промотором. Этот фактор транскрипции (сигма) играет, вероятно, важную роль при специфическом присоединении полимеразы к ДНК.

За прекращение (терминацию) синтеза мРНК у конца оперона или отдельного гена, по-видимому, также ответственна специфическая область ДНК – **терминатор**. Какую роль играет фактор терминации

(ρ)-тетрамерный белок – при отделении РНК-полимеразы от ДНК, пока неясно.

Матричная РНК (мРНК) в отличие от тРНК и рРНК неустойчива и недолговечна; время ее полураспада составляет от 0,5 до 5 мин. Концентрация той или иной мРНК в клетке зависит только от частоты транскрипции соответствующего гена; и в свою очередь она определяет содержание в клетке ферментов, кодируемых этим геном.

Различают индуцибельные и репрессибельные опероны. Опероны, управляющие *катаболизмом* лактозы, галактозы и арабинозы, являются **индуцибельными**, т.е. максимальная частота их транскрипции достигается только тогда, когда в питательной среде присутствует внешний эффектор – лактоза, галактоза или арабиноза. Внешние эффекторы называют также внешними индукторами. Синтез ферментов индуцибельных оперонов включается посредством **индукции**. Наоборот, опероны, управляющие *синтезом* аргинина, гистидина или триптофана, являются **репрессибельными**, т.е. максимальная частота транскрипции достигается только при отсутствии в клетке соответствующих низкомолекулярных эффекторов – аргинина, гистидина и триптофана (или в том случае, если их концентрация ниже критического порогового уровня).

Такие эффекторы называют корепрессорами, а соответствующие регуляторные белки – белками-репрессорами или апорепрессорами. Синтез ферментов репрессибельного оперона включается посредством **дерепрессии**.

Индукция лактозного оперона (отрицательный контроль). Лактозный оперон (*lac*-оперон) *Escherichia coli* содержит *lac*-промотор, *lac*-оператор и структурные гены для трех ферментов: β-галактозидазы, пермеазы и *трансацетилазы* (рис. 16.7). Этот оперон был тщательно исследован; удалось выделить его ДНК; была определена нуклеотидная последовательность области промотор–оператор; были выделены и исследованы регуляторные белки.

Оперон находится под **отрицательным контролем**, т.е. регуляторный белок (*lac*-репрессор) остается связанным с оператором и препятствует транскрипции до тех пор, пока отсутствует индуктор. Внешним индуктором служит лактоза (α-D-галактозил-β-1,4-D-глюкоза). Она транспортируется с помощью *пермеазы* и превращается в аллолактозу (α-D-галактозил-β-1,6-D-глюкозу), действующую как индуктор (внутренний). Катализатором этого превращения служит β-галактозидаза. Оба фермента – пермеаза и β-галактозидаза – присутствуют и в неиндуцированных клетках, но в концентрациях, составляющих менее 0,001 от их концентраций после полной индукции. Связав аллолактозу, *lac*-репрессор претерпевает конформационное изменение, уменьшающее его сходство к ДНК оператора, и в результате освобождает оперон для транскрипции.

Лактозный оперон подвержен также второму контролю – **положительному**. Это означает, что транскрипция происходит лишь тогда, когда с промотором связан второй регуляторный белок – CAP, или CRP.

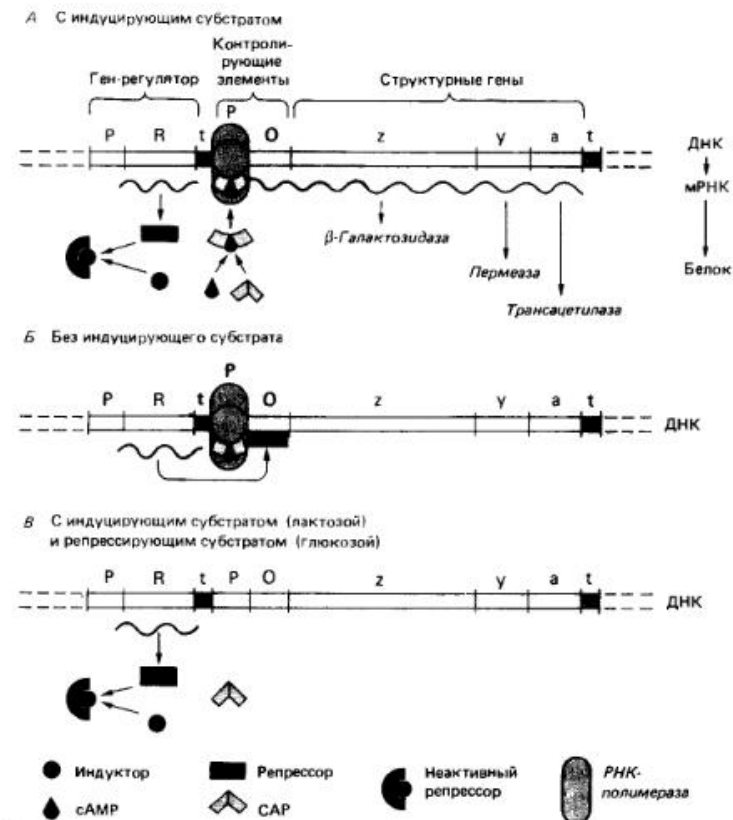


Рис. 16.7. Модель регуляции лактозного оперона, активность которого определяется как индуцирующим действием субстрата, так и катаболитной репрессией. Для транскрипции оперона необходимо присоединение CAP (сAMP-рецепторного белка) к промотору. Оно происходит только в присутствии сAMP. Глюкоза тормозит синтез сAMP и тем самым транскрипцию *lac*-оперона.

Сокращения CAP (catabolite activator protein) и CRP (cyclic AMP receptor protein) – синонимы. Связывание CAP служит необходимым условием для присоединения РНК-полимеразы к ДНК. Однако CAP может связаться с промотором только в том случае, если в клетке в достаточно высокой концентрации присутствует циклический AMP (сAMP).

Катаболитная репрессия *lac*-оперона. Если в питательной среде для *Escherichia coli* содержатся лактоза и глюкоза, синтез ферментов *lac*-оперона подавляется (см. рис. 16.6 и 16.7). Такое действие глюкозы обусловлено тем, что в ее присутствии внутриклеточная концентрация сAMP остается низкой. Глюкоза (так же как фруктоза и глюкозо-6-фосфат) репрессирует и другие индуцибельные пути катаболизма (расщепление арабинозы, галактозы, сорбитола, глицерола и др.).

Снижение концентрации сАМР под действием глюкозы обусловлено, вероятно, локализацией фермента аденилатциклазы, при участии которого образуется сАМР:



Фермент в клетке связан с мембраной. Его активность высока, если система транспорта сахаров находится в фосфорилированной форме. Если же эта система затрачивает много энергии на транспорт сахаров (что связано с их фосфорилированием), активность аденилатциклазы снижается.

Индукция арабинозного оперона (положительный контроль). Арабинозный оперон *E. coli* подвержен положительной регуляции, так же как рамнозный и мальтозный опероны. Он содержит структурные гены *ara B*, *ara A* и *ara D* для ферментов, участвующих в превращении L-арабинозы в D-ксилоулозо-5-фосфат. Экспрессия оперона индуцируется арабинозой. Как и многие другие системы катаболизма, оперон подвергается регуляции в области промотора, с которым связан сАР, активированный циклическим АМР. Кроме того, в этом опероне есть еще два регулируемых участка – оператор и инициатор. С оператором связан регуляторный белок, кодируемый геном *ara C*. Этот белок действует как репрессор – присоединяясь к оператору, он препятствует транскрипции. Однако в присутствии арабинозы он становится активатором – присоединяется к промотору и делает возможной транскрипцию. Таким образом, арабинозный оперон находится под влиянием как отрицательного, так и положительного контроля со стороны специфического белка-регулятора.

Репрессия триптофанового оперона конечным продуктом. Триптофановый оперон *E. coli* содержит структурные гены для синтеза пяти ферментов, участвующих в превращении хоризмата в триптофан, а также оператор и промотор в начале оперона. Второй, малоэффективный промотор внутри серии структурных генов можно оставить без внимания. Детально изученная функция данного оперона полностью соответствует обобщенной модели, предложенной в 1961 г. Жакобом и Моно для репрессибельного оперона (рис. 16.8). Расположенный далеко от оперона ген-регулятор *trp R* кодирует эффективный белок – апорепрессор. В присутствии корепрессора – триптофана, имеющего высокое сродство к белку-апорепрессору, репрессор подавляет транскрипцию оперона. Снижение концентрации триптофана вновь приводит к освобождению оператора и синтезу мРНК.

Аутогенная регуляция. Это такой механизм, в котором функцию белка-регулятора выполняет продукт одного из генов, находящихся в самом опероне. Принцип аутогенной регуляции состоит в том, что регуляторный белок управляет транскрипцией оперона и тем самым влияет на свой собственный синтез. При этом безразлично, какому контролю подвергается оперон – положительному или отрицательному.

Наиболее изученной системой такого типа является регуляция ис-

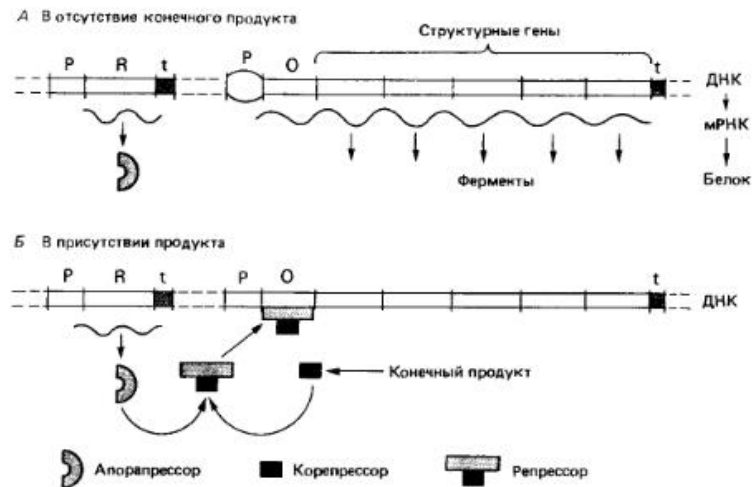


Рис. 16.8. Модель регуляции образования биосинтетических ферментов, осуществляемой путем репрессии конечным продуктом. В отсутствие конечного продукта происходит синтез фермента. Эффективный репрессор, блокирующий оператор («активированный репрессор»), образуется только при связывании конечного продукта или корепрессора с апорепрессором.

пользования гистидина у *Salmonella*. Превращение гистидина в глутамат, ионы аммония и формамид катализируют четыре фермента, структурные гены которых (гены *hut*) расположены рядом, образуя один оперон. Их экспрессия контролируется репрессорным белком. Ген, кодирующий этот белок, находится между структурными генами, т.е. в самом опероне. Этот оперон – *hut* – индуцируется первым продуктом катаболизма – уроканатом (индукция продуктом). В связи с этим индукция оперона ведет не только к синтезу ферментов, расщепляющих гистидин, но и к накоплению белка-репрессора. Последний вновь притормаживает транскрипцию генов *hut*, включая ген-регулятор. Аутогенная регуляция создает возможность мягкого, плавного управления синтезом ферментов. Такого рода саморегулирующиеся системы широко распространены у бактерий, эукариот и бактериофагов.

Регуляция синтеза рРНК и тРНК. В то время как синтез мРНК регулируется путем индукции и репрессии (в частности, катаболитной), регуляция синтеза стабильных РНК происходит совершенно иначе. Как уже давно известно, штаммы дикого типа *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis* очень резко реагируют на недостаток какой-либо аминокислоты. Они сразу же перестают синтезировать не только белки, но и РНК. Эта строгая зависимость от наличия «строительных блоков» для биосинтеза белка – аминокислот – позволяет заключить, что синтез стабильных РНК зависит не только от наличия их собственных предшественников – нуклеотидов. Выделение мутантов с менее строгой,

«расслабленной» регуляцией, синтезирующих РНК даже при отсутствии одной аминокислоты, привело к выводу, что в регуляции участвует по меньшей мере один ген (*rel A*). Если отсутствие какой-либо аминокислоты в клетках дикого типа приводит к накоплению необычных нуклеотидов (ppGpp и pppGpp), то у мутантов этого не наблюдается. Можно предположить, что эти нуклеотиды служат сигнальными веществами, приостанавливающими синтез рРНК и тРНК.

16.2 Регуляция путем изменения каталитической активности ферментов

Ранее мы рассмотрели возможности, которыми располагает клетка для приспособления внутриклеточной концентрации ферментов к нуждам метаболизма. Путем синтеза новых ферментов или разбавления уже имеющихся (в результате роста) клетки могут лишь медленно адаптироваться к измененным условиям среды. Более быстрое приспособление клетки к резко меняющейся метаболической ситуации достигается путем изменения каталитической активности ферментов.

16.2.1 Механизмы регуляции

Скорость ферментативной реакции, т.е. количество субстрата, превращаемое в единицу времени (как правило, в микромолях субстрата, превращенного за 1 мин), зависит как от концентраций фермента (E) и субстрата (S) или продукта (P), так и от сродства фермента к субстрату (K_m), а также от максимальной скорости реакции (v_{max}). K_m — это так называемая константа Михаэлиса–Ментен; она равна той концентрации субстрата, при которой активность фермента составляет половину максимальной ($v_{max}/2$). Максимальная скорость реакции достигается при избытке субстрата, т.е. тогда, когда фермент насыщен субстратом. K_m и v_{max} — кинетические параметры фермента.

Простые ферменты. Для большинства ферментов характерна гиперболическая кривая насыщения субстратом. Скорость реакции зависит только от концентраций субстрата и продукта и гиперболически возрастает с повышением концентрации субстрата, т.е. удовлетворяет условиям соотношения Михаэлиса–Ментен. Такие ферменты называют простыми или «гиперболическими» ферментами (рис. 16.9, А, черная кривая).

Понятно, что при высокой концентрации субстрата фермент перерабатывает его быстрее, чем при более низкой концентрации. Насколько чувствительно реагирует фермент на изменение концентрации субстрата, зависит от крутизны кривой его насыщения субстратом. Чем круче кривая, тем больше повышается скорость реакции при незначительном сдвиге концентрации субстрата. Как видно из рис. 16.9, А, крутизна кривой и соответственно чувствительность больше всего при низких концентрациях субстрата. Из этих рассуждений ясно, что скорость оборота

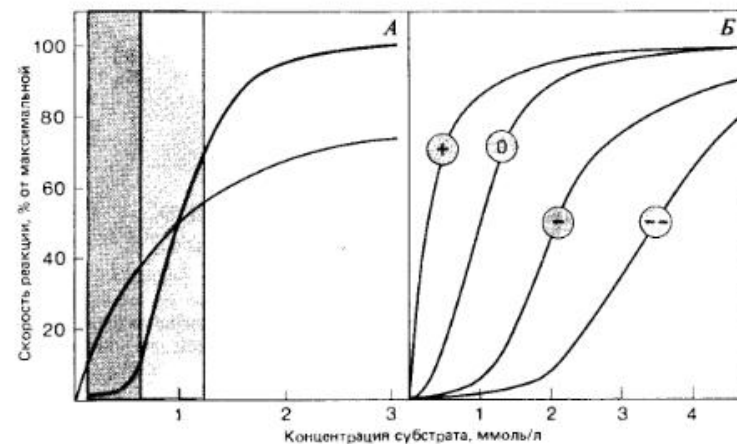


Рис. 16.9. Кривые насыщения субстратом для «гиперболических» и «сигмоидных» ферментов. А. Кривые насыщения субстратом «гиперболического» фермента (черная) и «сигмоидного» фермента (красная). Б. Эффекторы изменяют ход кривой — положительные эффекты (+) в сторону повышения сродства фермента к субстрату, а отрицательные (–) в сторону его понижения. Серым и красным цветом показаны области наибольшей чувствительности.

веществ в клетке зависит от их концентрации. Как правило, субстраты ферментов (метаболиты) содержатся в клетке в концентрациях ниже K_m .

Регуляторные ферменты. Свойства регуляторных ферментов намного более сложны. Кривые насыщения субстратом для большинства этих ферментов отклоняются от гиперболической формы и часто становятся сигмоидными (рис. 16.9, А и Б). У таких кривых имеется область значительно большей крутизны, чем у кривых насыщения для простых ферментов. В этой области, примерно между $1/2$ и $1/4$ K_m , регуляторные ферменты очень чувствительны — даже небольшого изменения концентрации субстрата достаточно, чтобы сильно изменить скорость реакции.

Сигмоидная форма кривой указывает на то, что фермент построен из субъединиц, между которыми существуют **кооперативные** взаимодействия. Очевидно, связывание субстрата с каталитическим центром одной из субъединиц фермента повышает сродство к субстрату других участков связывания в той же молекуле. Регуляторные ферменты состоят из двух или более, чаще всего из четырех, субъединиц.

Кроме каталитических центров, распознающих и связывающих субстраты, у регуляторных ферментов есть и другие стереоспецифические участки — так называемые **аллостерические центры**. Это места связывания **эффекторов**, изменяющих сродство фермента к субстрату. Имеются особые участки для связывания положительных эффекторов (активаторов) и для отрицательных эффекторов (ингибиторов). Под влиянием эффекторов изменяется форма кривой насыщения (степень ее «сигмоидности») (рис. 16.9, Б). Говорят не только об аллостерических центрах, но

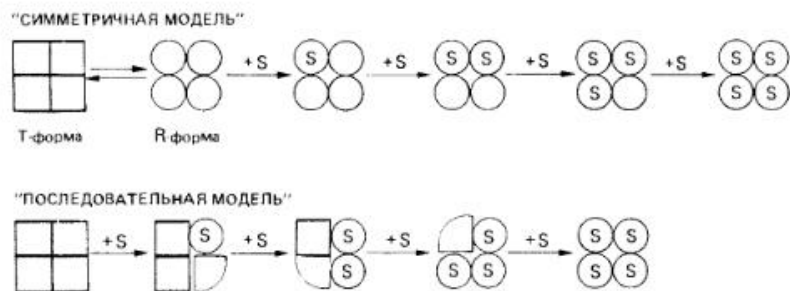


Рис. 16.10. «Симметричная» и «последовательная» модели аллостерических ферментов. На схеме представлен фермент, состоящий из четырех идентичных субъединиц.

также об аллостерическом торможении и аллостерических ферментах (термины «аллостерические ферменты», «регуляторные ферменты» и «сигмоидные ферменты» часто употребляют как синонимы).

Степень кооперативности выражают с помощью коэффициента кооперативности (или коэффициента Хилла) n . Он соответствует числу зависимых друг от друга областей связывания или числу субъединиц, участвующих в кооперативной реакции. При отсутствии кооперативности $n = 1$. Для аллостерического фермента, состоящего из четырех субъединиц, возможны значения $n > 1$ и $n < 4$ в зависимости от степени положительной кооперативности. При отрицательной кооперативности $n < 1$. Кроме того, имеются более сложные системы, на которых мы здесь останавливаться не будем.

Модели кооперативности. Попытки объяснить кооперативность между субъединицами ферментов, проявляющуюся в сигмоидной форме кривой насыщения субстратом, сводятся к двум гипотезам: «симметричной» модели (Моно и сотр.) и «последовательной» модели (Кошленд); они схематически представлены на рис. 16.10.

В основу обеих моделей положено представление о том, что ферменты могут существовать в различных формах – в активной форме (с высоким сродством к субстрату) и в неактивной (с малым сродством к субстрату). В каком соотношении между собой будут находиться разные формы фермента, зависит от наличия и концентрации лигандов (молекул субстрата, активаторов и ингибиторов). Разница между гипотезами касается того, как происходит конформационное изменение.

Согласно **симметричной модели**, фермент представлен только двумя конформационными состояниями, находящимися в динамическом равновесии. При этом все субъединицы данной молекулы фермента находятся в одной и той же конформации; промежуточных состояний нет, существуют только симметричные олигомеры (рис. 16.11). Равновесие характеризуется аллостерической постоянной L . В отсутствие лигандов, как правило, неактивное основное состояние T (от англ. tense – напряженный) преобладает над активным состоянием R (от англ. relaxed – расслабленный). При добавлении лигандов они реагируют с теми молекулами

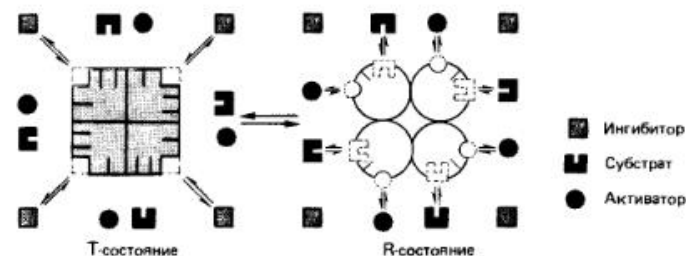


Рис. 16.11. Схема, дающая представление о характере равновесия между состоянием с малой каталитической активностью и состоянием с высокой активностью аллостерического фермента, состоящего из четырех субъединиц (согласно «симметричной» модели). Пояснения в тексте. (Kirschner K., *Ergebn. Microbiol.*, 44 [1968], 123.)

кулами фермента, которые находятся в соответствующей конформации: ингибиторы – с молекулами в состоянии T , субстраты и активаторы – с молекулами в состоянии R . При связывании субстрата фермент удерживается в состоянии R . Чтобы восстановить равновесие между двумя конформационными состояниями, часть других молекул фермента тоже переходит в состояние R . Поскольку каждая молекула имеет несколько участков для связывания субстрата, небольшого числа молекул субстрата достаточно для того, чтобы привести намного большее число таких участков в состояние высокой каталитической активности; таким образом, облегчается связывание и других молекул субстрата. В этом и состоит кооперативный эффект, определяющий сигмоидную форму кривой «концентрация субстрата – скорость реакции». Отрицательный эффект оказывает обратное действие.

В **последовательной модели** предполагается, что фермент приобретает каталитически активную конформацию только в результате взаимодействия с субстратом (рис. 16.10). Если фермент состоит из нескольких субъединиц, то конформационное изменение одной из них, вызванное субстратом, последовательно передается другим субъединицам и облегчает им связывание добавочных молекул субстрата. Возможно образование несимметричных олигомеров (на рис. 16.10 это тетрамеры) с субъединицами, имеющими разную конформацию. Присутствие активаторов способствует переходу в активную форму, а отрицательные эффекторы его затрудняют.

Аллостерические ферменты и эффекторы. Регуляторные ферменты, как правило, имеются в каждом пути биосинтеза и в некоторых путях катаболизма. В большинстве случаев они находятся в начале цепи биосинтеза и занимают, таким образом, ключевую позицию.

Аллостерические эффекторы представляют собой низкомолекулярные соединения – это либо конечные продукты биосинтеза, либо вещества, концентрация которых может отражать состояние клеточного метаболизма, например ATP, ADP, AMP, ацетил-CoA, фосфоенолпируват и $NADH_2$.

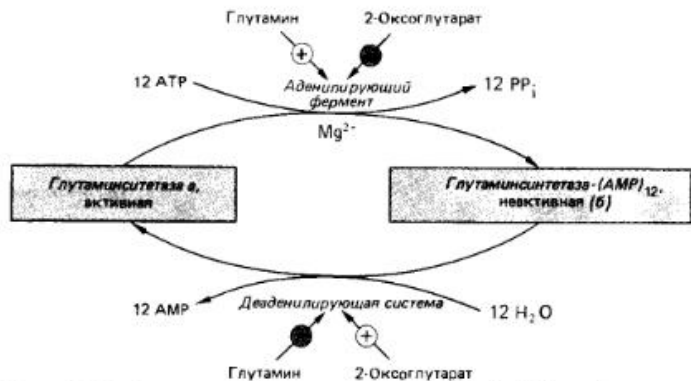


Рис. 16.12. Регуляция глутаминсинтетазы *Escherichia coli* путем химической модификации при участии специального фермента. Знаком «плюс» указан положительный эффектор (стимуляция), знаком «минус» — отрицательный эффектор (торможение). (Holzer H., Duntze W., Ann. Rev. Biochem. 40 [1971], 345.)

Изменение активности ферментов путем ковалентной модификации. Для небольшого числа ферментов известен регуляторный механизм иного типа: они могут изменяться под действием других ферментов. Это изменение может приводить к повышению или снижению активности фермента. Оно может состоять в аденировании, фосфорилировании или ацетиловании. Речь идет об относительно быстром процессе. У млекопитающих под воздействием ферментов активируются и инактивируются гликогенфосфорилаза и гликогенсинтетаза. У *Escherichia coli* не только подавляется образование глутаминсинтетазы, но и активность имеющегося фермента за несколько минут снижается на 80–90%, если в питательную среду добавить ионы аммония. Это снижение активности обусловлено катализируемой особым ферментом химической модификацией: активная глутаминсинтетаза *a* в результате ее аденирования превращается в неактивную глутаминсинтетазу *b* (рис. 16.12). Наличие глутамин в клетке стимулирует аденилирующий фермент, а свободный 2-оксоглутарат оказывает противоположное действие. После удаления из среды ионов аммония в клетках создается недостаток глутамин, и глутаминсинтетаза вновь реактивируется в результате отщепления групп адениловой кислоты (AMP) под действием деаденилирующей системы.

16.2.2 Специфические механизмы регуляции

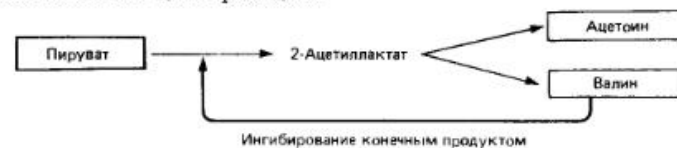
Пути биосинтеза. Как правило, путем ингибирования конечным продуктом регулируется первый фермент данной биосинтетической последовательности реакций. Если в клетке происходит избыточное образование и накопление конечного продукта, то в результате торможения первого фермента деятельность всей цепи тотчас же замедляется. В процессе

биосинтеза изолейцина из треонина таким ферментом служит *треониндезаминаза*:



Регулируемые и нерегулируемые изофункциональные ферменты (изозимы). Следует отметить, что не всякая треониндезаминаза ингибируется изолейцином. Если *Escherichia coli* растет в аэробных условиях на среде с глюкозой и солями аммония, то ее клетки содержат только одну треониндезаминазу, на анаболическую функцию которой указывает аллостерическое торможение изолейцином. Но если клетки растут в анаэробных условиях на среде со смесью аминокислот (пептон и гидролизат казеина), то происходит репрессия синтеза анаболической треониндезаминазы и образуется изозим, обладающий катаболической активностью и подверженный аллостерическому регулированию только со стороны AMP и ADP.

Другим примером может служить образование 2-ацетиллактата в клетках *Enterobacter aerogenes*. Эта реакция, катализируемая синтазой ацетогидроксикислот, с одной стороны, участвует в анаэробном образовании глюкозы с образованием ацетоина (катаболизм); с другой стороны, с нее начинается путь синтеза валина (анаболизм). Таким образом, 2-ацетиллактат является общим промежуточным продуктом разветвленной цепи реакций:

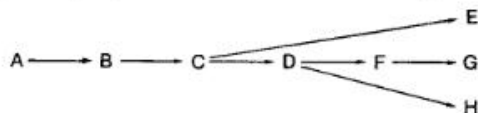


Клетки могут синтезировать два изофункциональных фермента. Один из них образуется только в том случае, если во время брожения снизилось значение pH и конечным продуктом является нейтральный ацетонин. Другой фермент тоже синтезируется в нейтральной и слабощелочной среде; он имеет высокий оптимум pH и подвержен аллостерическому подавлению валином.

Как видно из этих примеров, взаимовлияние двух путей обмена может исключаться в результате образования изозимов, активность одного из которых обычно строго регулируется, тогда как другой не подвергается регуляции того же типа.

Разветвленные пути биосинтеза. Особые проблемы возникают в тех случаях, когда на первый этап биосинтеза действуют два или большее число конечных продуктов. Если в какой-то гипотетической последовательности реакций А превращается в Е, G и H, то первый этап, А → В, будет подавляться и в случае накопления лишь одного конечного про-

дукта (например, Н). Однако это вызовет также снижение синтеза двух других продуктов – G и E. Подобные проблемы, возникающие при регу-

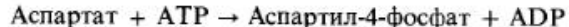


ляции разветвленных путей биосинтеза, разные организмы, видимо, разрешили по-разному. До сих пор было найдено несколько различных типов регуляции для ферментов, функционирующих на расходящихся или параллельных путях метаболизма.

1. Первый этап катализируется несколькими изозимами, каждый из которых регулируется особым конечным продуктом.

2. Первый этап катализируется одним ферментом, при этом возможны разные варианты: а) для ингибирования общего первого этапа все конечные продукты должны присутствовать в избытке; или б) каждый из конечных продуктов действует независимо от остальных (кумулятивное ингибирование), причем общее торможение может превышать сумму отдельных эффектов (кооперативное ингибирование).

Первый этап биосинтеза аминокислот метионина, лизина, треонина и изолейцина («семейство аспарагиновой кислоты») катализируют несколько изозимов (рис. 16.13). У *Escherichia coli* в реакции



участвуют три параллельно действующие аспараткиназы, активность которых регулируется разными конечными продуктами. Аспараткиназу I и гомосериндегидрогеназу I ингибирует треонин. Аспараткиназа III регулируется лизином. Аспараткиназа II не подвержена аллостерической регуляции. В регуляции аспараткиназ участвуют еще дополнительные механизмы, причем в каждом случае первый фермент, специфичный для данного пути биосинтеза, ингибируется конечным продуктом этого пути.

Подобного рода схема регуляции существует и для «семейства ароматических аминокислот» (см. рис. 7.17). Первый этап биосинтеза фенилаланина, тирозина, триптофана и 4-аминобензойной кислоты состоит в реакции эритрозо-4-фосфата с фосфоенолпируватом, в результате которой образуется 3-дезоксид-арабиногептулозо-6-фосфат (ДАГФ). У *E. coli* имеются три ДАГФ-синтазы. Одна из них контролируется тирозином, вторая – фенилаланином, а третий, малоактивный фермент не ингибируется. Дополнительная регуляция и в этом случае осуществляется по принципу ретроингибирования (отрицательной обратной связи).

Фосфофруктокиназа и эффект Пастера. Эффект Пастера – торможение гликолиза дыханием – можно объяснить тем, что между системами фосфорилирования в дыхательной цепи и на уровне субстрата существует конкуренция за АДФ и фосфат (разд. 8.1). Согласно новейшим данным, расщепление гексоз по фруктозобисфосфатному пути контро-

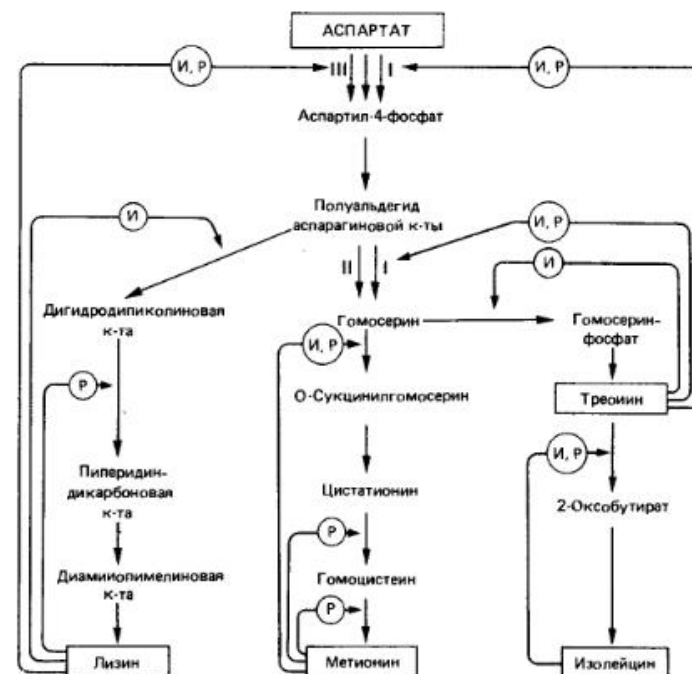


Рис. 16.13. Регуляция биосинтеза аминокислот семейства аспарагиновой кислоты у *Escherichia coli*. Красными линиями показаны воздействия конечных продуктов, ингибирующие ферментативную реакцию (И) или/и репрессирующие синтез данного фермента (Р).

лируется в первую очередь путем аллостерической регуляции активности фосфофруктокиназы (рис. 16.14). Фосфофруктокиназу из пекарских дрожжей аллостерически ингибирует АТФ. В присутствии АТФ увеличивается сигмоидность кривой насыщения фермента субстратом. Очень важно то, что, хотя 5'-трифосфаты инозина, гуанозина и цитозина и могут служить вместо АТФ донорами фосфатных групп, они не выполняют ни ингибирующей, ни регулирующей функции. Это означает, что аллостерический центр фермента обладает высокой специфичностью в отношении АТФ и что его сигнал однозначен. Напротив, специфичность каталитического центра незначительна. АМР действует как положительный эффектор и снимает торможение, вызываемое АТФ. Другие моно- и дифосфаты не действуют совсем или действуют очень слабо. У *Escherichia coli* роль положительного эффектора играет не АМР, а АДФ. Фосфофруктокиназа ингибируется также цитратом; при этом АТФ усиливает этот эффект, а фруктозо-6-фосфат ослабляет его.

Знание аллостерических свойств фосфофруктокиназы позволяет сделать следующий вывод: если аэробно растущие дрожжевые клетки или

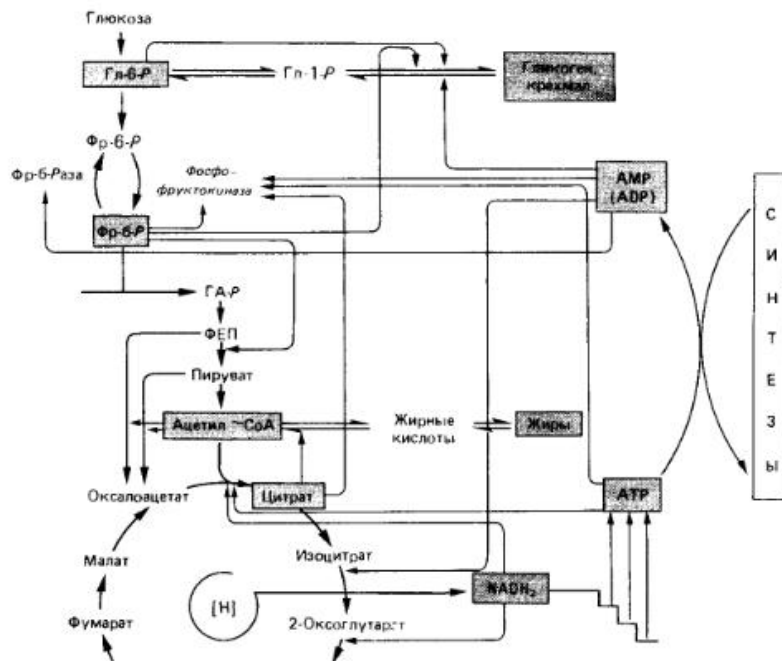


Рис. 16.14. Схема, иллюстрирующая некоторые взаимодействия между ферментами и метаболитами, за счет которых осуществляется регуляция распада гексоз и синтеза запасных веществ. В схеме использованы данные, полученные для дрожжей, животных тканей и бактерий. Метаболиты, выполняющие важные эффекторные функции, выделены красным цветом. Отходящие от них тонкие черные стрелки означают положительные воздействия, а красные стрелки — отрицательные воздействия. Фр-6-Р — фруктозобисфосфат; Фр-6-Р — фруктозо-6-фосфат; Фр-6-Раза — фруктозобисфосфатаза; Гл-6-Р — глюкозо-6-фосфат; ГА-Р — глицеральдегид-3-фосфат; ФЕП — фосфоенолпируват.

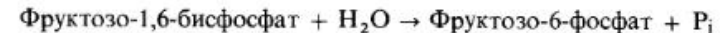
клетки тканевой культуры лишить кислорода и приостановить таким образом окислительное фосфорилирование, то в клетке снизится соотношение концентраций АТФ/АМР, что приведет к повышению активности фермента и соответственно к ускорению реакции. То, что регуляция процессов в живой клетке действительно происходит описанным путем, удалось подтвердить, измеряя внутриклеточные концентрации глюкозы, глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, фруктозо-1,6-бисфосфата и триозофосфатов до и после перехода от анаэробных условий к аэробным. Непосредственно после аэрирования культуры концентрация глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата возрастает, а содержание фруктозобисфосфата и триозофосфатов резко снижается. Таким образом, фосфофруктокиназа действует как клапан, регулируемый аденилатами и другими метаболитами; когда он закрыт, метаболиты, находящиеся «выше» него в цепи, накапливаются, а расположенные «ниже»

продолжают участвовать в реакциях, и их количества уменьшаются. Это позволяет понять, почему при переходе к аэробным условиям потребление глюкозы падает.

Глюконеогенез. Аденилаты АТФ, АДФ, АМР и СоА-производные жирных кислот оказывают регулирующее воздействие на многие реакции, участвующие в катаболизме гексоз, в промежуточном обмене и в синтезе запасных веществ. Регуляция фосфофруктокиназы служит, по-видимому, тем главным клапаном, с помощью которого регулируется поток субстрата, направляемый по фруктозобисфосфатному пути. Соответствующий фермент, контролирующий у некоторых бактерий расщепление субстрата по 2-кето-3-дезоксиглюконоатному пути, — это, очевидно, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Ее тоже в сильной степени ингибируют АТФ и NADH₂.

Образование глюкозы из пирувата или лактата (глюконеогенез) играет определенную роль тогда, когда эти и другие вещества служат источниками углерода в отсутствие углеводов. Синтез идет по фруктозобисфосфатному пути, за исключением трех необратимых реакций (рис. 16.14). Эти этапы катализируются регулируемым ферментом. В животных тканях путь от пирувата к фосфоенолпирувату проходит через оксалоацетат. Первая реакция катализируется пируваткарбоксилазой и зависит от присутствия ацетил-СоА. По-видимому, ацетил-СоА играет в данном случае роль сигнала, свидетельствующего о насыщении всех реакций, использующих это соединение, в особенности реакции конечного окисления через цикл трикарбоновых кислот. Такая регуляция гарантирует получение энергии и допускает синтез глюкозы лишь при избытке ацетил-СоА. Кроме того, зависимость образования оксалоацетата от ацетил-СоА может быть существенной для обеспечения цикла трикарбоновых кислот необходимым количеством оксалоацетата.

При глюконеогенезе реакция с участием *фруктозобисфосфатазы*



дает возможность обойти вторую необратимую реакцию цепи гликолиза. Фруктозобисфосфатазу ингибирует АМР, который служит здесь индикатором степени насыщения клетки высокоэнергетическими соединениями. Избыток АМР означает, что поступление АТФ недостаточно для насыщения реакций, связанных с затратой энергии. Кажется вероятным, что в таких условиях глюконеогенез тормозится для усиления распада глюкозы и увеличения выхода энергии.

Цикл трикарбоновых кислот. У дрожжей АТФ сильно понижает сродство цитратсинтазы к ацетил-СоА. У *E. coli* и других бактерий высокая концентрация NADH₂ сигнализирует о насыщении дыхательной системы и о том, что потребление субстрата в цикле трикарбоновых кислот должно быть снижено. Ингибитором 2-оксoglутаратдегидрогеназы, цитратсинтазы и пируватдегидрогеназы служит NADH₂ (рис. 16.14).

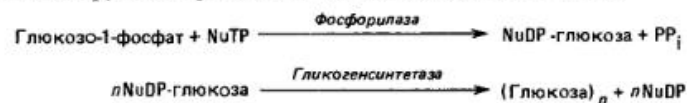
Синтез запасных жиров. Запасные вещества накапливаются, как правило, в тех случаях, когда источники углерода и энергии имеются в из-

бытке, но рост клеток невозможен из-за недостатка соединений азота или серы. Сигнал к образованию **жиров** (жирных кислот) и полисахаридов исходит главным образом от промежуточных продуктов. У дрожжей реакцией, лимитирующей скорость синтеза жирных кислот, является карбоксилирование ацетил-СоА при участии ацетил-СоА-карбоксилазы:



Этот фермент занимает первое место на пути биосинтеза жирных кислот с длинной цепью. Другие процессы синтеза, в которых исходным соединением служит ацетил-СоА (синтез каротиноидов, стероидов, цитрата, малата и др.), не нуждаются в активирующем воздействии малонил-СоА. Ацетил-СоА-карбоксилаза активируется цитратом. Повышение содержания цитрата, способствуя образованию малонил-СоА, тем самым стимулирует синтез жирных кислот с длинной цепью и нейтральных жиров (триглицеридов). Роль отрицательных эффекторов играют при этом СоА-производные пальмитиновой и других жирных кислот. При накоплении СоА-производных происходит ингибирование конечным продуктом.

Синтез запасных полисахаридов. Исходным соединением для синтеза запасных полисахаридов (гликогена и крахмала) служит глюкозо-1-фосфат. Он активируется нуклеозидтрифосфатом (NuTP), после чего глюкозильная группа переносится на полиглюкозную цепь:



В то время как **синтез гликогена** в печени происходит с участием UDP-глюкозы, для синтеза крахмала у зеленых растений и гликогена у различных бактерий используется ADP-глюкоза. Гликогенсинтетаза печени активируется глюкозо-6-фосфатом. Регуляторные системы, имеющиеся у бактерий и растений, сильно отличаются от системы, действующей в клетках печени. Регуляция осуществляется через пиррофосфорилазу. У *Escherichia coli*, *Arthrobacter* и *Rhodospirillum rubrum*, а также в листьях шпината AMP и ADP действуют как ингибиторы, а предшественники (глюкозо-1-фосфат) — как стимуляторы. Пиррофосфорилаза *E. coli* активируется фруктозобисфосфатом, глицеральдегидфосфатом и фосфоенолпируватом; фермент *R. rubrum* активируется пируватом, а фермент из листьев шпината — 3-фосфоглицератом, фосфоенолпируватом и фруктозобисфосфатом. Синтез полисахаридов — прекрасный пример того, как один и тот же результат может достигаться с помощью разных регуляторных систем.

Автотрофная фиксация двуокиси углерода. Фиксация CO_2 в рибулозо-1,5-бисфосфатном цикле — один из метаболических процессов, требующих наибольших затрат энергии. Отсюда понятно, что существуют

регуляторные механизмы, обуславливающие высокую скорость этого цикла лишь в том случае, если обеспечен достаточный приток энергии для поддержания структуры и функций клетки (для синтеза мономеров и полимеров, обновления ферментов и др.). Фосфорibuлокиназа подвержена специфической регуляции: AMP (реже ADP) ингибирует этот фермент, а NADH_2 активирует его.

Энергетический заряд клетки. Приведенные примеры подтверждают предположения о том, что аденилаты выполняют в клетке важные регуляторные функции и что они в известной степени представляют собой общие для катаболизма и анаболизма сигналы, обеспечивающие нужное соотношение между получением энергии и процессами биосинтеза. Внутриклеточное содержание ATP, ADP и AMP (или, точнее, соотношение между этими тремя аденилатами) определяет скорость отдельных реакций, а тем самым и сложных процессов распада и синтеза.

Было принято количественное выражение для «энергетического заряда» (ЭЗ) клетки:

$$\text{ЭЗ} = 1/2 \frac{2\text{ATP} + \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}} = \frac{\text{ATP} + 0,5\text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}$$

Коэффициент 0,5 представляет собой произвольную величину, введенную для удобства (чтобы параметр мог варьировать в пределах от 0 до 1). Таким образом, энергетический заряд клетки служит мерой ее обеспеченности высокоэнергетическими соединениями в расчете на общее число «аденозиновых единиц» (аденилатов). Величина его равна единице, когда весь аденилат представлен в форме ATP, и нулю, когда в клетке имеется только AMP. Для клеток в экспоненциальной фазе роста культуры эта величина обычно близка к 0,8.

Результаты проведенных исследований позволяют предполагать, что аллостерические ферменты активируются или ингибируются тем или иным аденилатом и что именно это обеспечивает согласованную регуляцию всего метаболизма клетки. Если, например, энергетический заряд клетки возрастает, то активность катаболических ферментов снижается, а активность ферментов, участвующих в процессах синтеза, увеличивается. При уменьшении энергетического заряда наблюдается обратная картина.

16.3 Мутанты с нарушенной регуляцией

Выяснение механизмов, регулирующих биосинтез ферментов и их активность, стало возможным благодаря выделению мутантов с дефектами регуляции. Выделены мутанты нескольких типов, в том числе: 1) не образующие функционально полноценного репрессорного белка или содержащие его в сильно повышенном количестве; 2) с оператором конститутивного типа, который не способен связывать репрессорный белок; 3) с аллостерической нечувствительностью, у которых определенный фермент не может распознавать эффектор. Мы опишем некоторые методы, с помощью которых выделяют таких мутантов.

Мутанты, конститутивно образующие катаболические ферменты. Накопительные культуры такого рода мутантов можно получить путем частой смены субстратов. Если клетки конститутивно образуют ферменты, необходимые для использования субстрата А, то после переноса клеточной популяции с субстрата В на субстрат А они тотчас начинают расти с максимальной скоростью; клеткам же индуцибельного дикого типа для достижения максимальной скорости роста необходима определенная лаг-фаза (чтобы синтезировать ферменты для роста на субстрате А). После ряда генераций клетки снова переносят на среду с субстратом В и дают им расти до тех пор, пока ферменты, участвующие в использовании субстрата А, не будут достаточно сильно «разбавлены». После многократного повторения такой процедуры конститутивные мутанты сильно обгоняют в росте клетки дикого типа с индуцибельными ферментами. Таким путем были выделены, например, мутанты *E. coli*, конститутивно образующие ферменты, необходимые для использования лактозы. В других методах отбора пользуются таким приемом, как подавление индукции при помощи структурных аналогов субстрата. Метилтиоолактозид может, например, подавить у *Escherichia coli* индукцию *gal*-оперона, вызываемую галактозой.

Мутанты, конститутивно образующие анаболические ферменты. Эти мутанты, а также мутанты с нарушениями тонкой регуляции процессов биосинтеза могут быть выделены с помощью **антиметаболитов**. Многие антиметаболиты (разд. 6.6), будучи структурными аналогами нормальных конечных продуктов биосинтеза (аминокислот, пиримидинов и т. п.), оказывают бактериостатическое действие. Имитируя конечный продукт, они, с одной стороны, нарушают синтез нормальных метаболитов, а с другой — включаются в белки или нуклеиновые кислоты, в результате чего образуются макромолекулы, неспособные выполнять нормальные функции. Ингибирование таким «ложным» конечным продуктом приводит к остановке роста. Если на агаризованную среду с антиметаболитом высеять популяцию дикого типа (10^8 – 10^{10} клеток), то способность к росту и образованию колоний проявят только отдельные устойчивые мутанты.

В основе подобной **устойчивости к антиметаболитам** могут лежать разнообразные изменения физиологических свойств клетки, обусловленные мутациями. Рассмотрим типы таких мутаций.

1. Мутации, приводящие к «аллостерической нечувствительности». При такого рода мутации ни метаболит, ни антиметаболит не может подавить активность первого (аллостерического) фермента данного пути биосинтеза. В результате образование соответствующего конечного продукта не регулируется.

2. Мутации, приводящие к конститутивной дерепрессии. Следствие такой мутации — неконтролируемое образование ферментов, участвующих в синтезе конечного продукта.

3. Мутации, затрагивающие каталитические центры ферментов, активирующих метаболиты и участвующих в их превращениях. Вслед-

ствие повышения избирательности фермент может утратить способность связывать антиметаболит вместо метаболита. После этого антиметаболит уже не будет оказывать бактериостатического действия.

4. Мутации, приводящие к нарушению транспортных процессов. В результате таких мутаций антиметаболиты перестают поступать внутрь клетки и потому не могут уже влиять на ее метаболизм.

5. Мутации, обуславливающие конститутивное расщепление антиметаболитов. При этом клетка разрушает антиметаболит и тем самым обезвреживает его. С точки зрения отбора мутантов с нарушенной регуляцией интерес представляют только первые два типа мутаций. Дерепрессия синтеза анаболических ферментов и утрата способности подчиняться аллостерическому ингибированию часто приводит к «перепроизводству» и выделению в среду конечного продукта данного биосинтетического пути (метаболита). Для мутантной клетки это существенно потому, что метаболит вытесняет антиметаболит из реакции, обеспечивая таким образом рост клеток и образование колоний. Образующийся в избытке метаболит выделяется, диффундирует в агар и в зоне диффузии устраняет влияние антиметаболита на клетки дикого типа. Такие клетки начинают расти и образуют мелкие колонии; их называют вторичными или сателлитными колониями. Центральную же колонию образуют клетки мутанта, выделяющего метаболит (рис. 16.15). Рост сателлитов указывает на то, что произошла мутация, нарушившая нормальную работу регуляторных механизмов. Но для того, чтобы установить, какого рода дефектом обусловлено накопление и выделение метаболита, в каждом случае требуется специальный анализ.

С помощью метода, основанного на применении антиметаболитов, уже выделено много мутантов с дефектами регуляции. При сравнении различных мутантов выяснилось, что утрата механизма репрессии меньше влияет на скорость синтеза конечного продукта, чем изменение способности к аллостерическому ингибированию. У мутантов, не способных к ингибированию определенного пути биосинтеза, конечный продукт этого пути накапливается в клетке и часто выделяется в среду, несмотря на вполне нормальную репрессию. Напротив, у мутантов со значительной дерепрессией (конститутивностью) отмечается лишь очень небольшое накопление и выделение конечного продукта, если он оказывает нормальное ингибирующее действие. Таким образом, репрессия

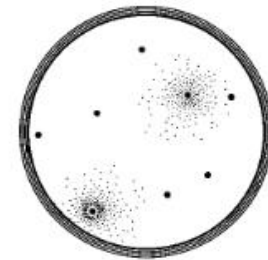


Рис. 16.15. Мутанты, устойчивые к одному из антиметаболитов. Вид чашки Петри, содержащей питательную агаризованную среду с антиметаболитом. Поверхность агара засеяна бактериями (около 10^9 клеток). Сначала выросли колонии только устойчивых мутантов. Ореолы вторичных колоний вокруг двух больших колоний показывают, что клетки последних выделяют метаболит.

важна в первую очередь для уменьшения затрат, связанных с синтезом мРНК и белка, тогда как синтез метаболитов регулируется путем ингибирования конечным продуктом.

Мутанты с измененной чувствительностью к эффектору. Мутантов, у которых изменена чувствительность какого-нибудь аллостерического фермента к эффектору, можно также выделять с помощью совершенно иного принципа, а именно как ревертантов к ауксотрофии. При этом поступают следующим образом. Сначала выделяют мутантов с дефектом регуляции, ауксотрофных в отношении метаболита, который хотят получить как конечный продукт, накапливающийся в среде. Затем среди этих ауксотрофных мутантов отбирают таких, у которых неспособность к синтезу данного метаболита обусловлена дефектом в аллостерическом ферменте соответствующего пути биосинтеза. После этого из полученной мутантной популяции выделяют прототрофных ревертантов, которые не нуждаются в этом конечном продукте, так как сами способны его синтезировать. Среди ревертантов отбирают тех, которые выделяют нужный продукт в среду. Их можно выявить биоавтографическим методом (разд. 10.2.2) или распознать по росту сателлитных колоний. О таком мутанте, полученном в результате двукратного отбора, можно составить себе следующее представление. У него после первой мутации перестал функционировать каталитический центр одного из аллостерических ферментов. Вторая мутация затронула структуру (конформацию) всей белковой молекулы, в результате чего каталитическая активность фермента восстановилась, но аллостерическая чувствительность оказалась утраченной. Как в этом, так и во многих других случаях для выделения желательного мутанта необходим ряд этапов, включающих мутагенез и отбор.

Теоретические и прикладные аспекты. Стратегия отбора мутантов весьма важна для дальнейшего изучения клеточного метаболизма и для выяснения механизмов регуляции. Вместе с тем эта стратегия имеет и практическое значение, так как именно она определяет пути целенаправленного отбора высокоактивных продуцентов всех тех веществ, которые могут быть получены с помощью микроорганизмов.

17. Микроорганизмы и окружающая среда

В предыдущих главах были описаны различные микроорганизмы, сгруппированные по их физиологическим и биохимическим свойствам. Упомянулось и о местах обитания. Полученные сведения позволяют теперь рассмотреть отношения микроорганизмов с окружающей их средой. Мы остановимся сначала на основных понятиях и представлениях **экологии**. Эта наука изучает поведение организмов в их естественных местообитаниях, взаимоотношения их между собой и с окружающей средой.

Первые следы жизни относятся к периоду более 3 млрд. лет назад; это были микроорганизмы, которые преобладали в биосфере Земли до периода около 0,5 млрд. лет назад. Таким образом, прокариоты не только стоят у истоков земной жизни, из них не только развилось все многообразие эукариотических форм, но они и после этого существовали всегда. Высшие формы жизни на протяжении своей эволюции никогда не были одиноки; их постоянно либо теснили, либо поддерживали вездесущие одноклеточные организмы. Среди современных высших форм жизни есть и такие, которые утвердились не только в борьбе с себе подобными, но и во взаимоотношениях с микроорганизмами. У многих организмов в процессе эволюции выработались терпимые, партнерские отношения – мутуалистический симбиоз. Часть этой главы (разд. 17.2) будет специально посвящена микроорганизмам как симбионтам других микроорганизмов, растений и животных.

Микроорганизмы уже существовали, когда поверхность нашей планеты принимала свой нынешний вид; они уже присутствовали в то время, когда сдвигались континенты, создавались отложения толщиной в несколько тысяч метров, земная кора много раз опускалась и сминалась в складки, возникали залежи руд, угля, месторождения нефти и природного газа. Во многих из этих процессов активно участвовали микроорганизмы (о некоторых вопросах геомикробиологии речь пойдет в разд. 17.3).

На протяжении не менее чем 80% всего периода органической эволюции Земля была населена исключительно микроорганизмами. Если ископаемые остатки микробов находят редко, то данные сравнительной физиологии и биохимии служат достаточной опорой для классификации прокариот по типу метаболизма. Однако при чтении раздела об эволюции организмов следует учитывать то, что в этой области еще много пробелов и домыслов.

17.1 Экология микроорганизмов

17.1.1 Введение

Было приложено немало усилий, чтобы выделить и описать отдельные микроорганизмы. Исследования на чистых культурах имеют существенное значение, так как помогают оценить потенциальные возможности и функции отдельных видов в природе. Таксономические, физиологические, биохимические и генетические исследования некоторое время увели микробиологов в сторону от основной цели их науки – от изучения поведения микроорганизмов в их естественных местах обитания.

Взаимоотношениями организмов между собой и с окружающей средой занимается экология. Экология микроорганизмов исследует лишь отдельные части целостных экологических систем. Экология – очень разносторонняя наука, и ее проблемы разрабатываются представителями ряда частных биологических дисциплин и рассматриваются в разных аспектах. В связи с этим даже в употреблении основных экологических понятий нет единства. Мы попытаемся сначала пояснить некоторые общие термины, применяемые в экологии микроорганизмов.

Экосистема. Основной единицей в экологии является экосистема. В нее входят как биотические, так и абиотические компоненты. Биотические компоненты составляют сообщество организмов, или биоценоз. При этом речь идет, как правило, о популяциях микроорганизмов, причем популяция может состоять из клонов одного вида или нескольких различных видов. Под абиотическими компонентами следует понимать физические и химические условия экосистемы, в которой живут организмы. Размеры микробных экосистем очень разнообразны. Это может быть, например, пруд, озеро или корневая система дерева. Возможны и такие малые экосистемы, как ротовая полость человека, рубец жвачного животного или участок кишечника. Все жизненное пространство нашей планеты в совокупности – биосферу – можно рассматривать как гигантскую экосистему. С той или иной экосистемой часто связывают понятие «**окружающая среда**». Эта среда поддерживает взаимоотношения определенного организма (или популяции) с окружающими его (ее) биотическими или абиотическими компонентами экосистемы.

Местообитание. В пределах экосистемы для каждого вида можно описать его местообитание. Это тот участок или жизненное пространство (местность), в котором обычно живет данный организм (индивидуум или популяция). Для каждого организма можно указать как минимум одно местообитание, в котором он обычно встречается, где он благополучно растет и развивается и где его с большой вероятностью можно встретить вновь и выделить. Местообитаниями могут быть донные отложения моря, плодородная гумусная почва, носовая полость или кишечник человека. В рамках определенной экосистемы микроорганизм имеет, как правило, только одно-единственное местообитание; но вообще он может иметь и несколько таких мест, каждое в отдельной

экосистеме. Например, бактерии рода *Rhizobium* растут как в почве, так и в растениях; определенная метанообразующая бактерия может обитать в морских отложениях, в рубце жвачных или в метантенке очистной установки. Иными словами, местообитание – это «улица» и «номер дома» данного организма; некоторые организмы могут иметь по несколько адресов.

Экологическая ниша. В отличие от термина «местообитание» понятие «экологическая ниша» отражает не место в пространстве, а функцию какого-то вида или популяции в сообществе организмов. Экологическая ниша характеризует «профессию» вида. Можно исходить из того, что каждый вид (или популяция) выполняет определенную функцию, которая обусловлена его (ее) потребностями в пище, подвижностью, способом размножения, биохимическими возможностями, структурными особенностями и пределами толерантности к условиям среды. Может или не может какой-либо вид выполнять определенную функцию в определенной экосистеме, зависит от совокупности его свойств. Обычно границы распространения какого-то вида или популяции фактически бывают уже, чем можно было бы ожидать, исходя из свойств этого вида. Иными словами, реальные ниши, как правило, уже потенциальных. Будет ли вид действительно выполнять ту функцию, к которой он потенциально способен, – это часто определяется вторичными, привходящими обстоятельствами.

Поясним это на примере. В рубце жвачных могут расти и выполнять функцию расщепления целлюлозы только те целлюлозолитические бактерии, которые осуществляют это в анаэробных условиях и способны получать энергию в результате брожения. Далее, они должны быть толерантны к температуре внутри желудка, к присутствию жирных кислот, ферментов, аммиака, газов и других продуктов. И наконец, должно быть обеспечено непрерывное удаление определенных продуктов брожения, например H_2 . Таким образом, для выполнения данной функции в определенной экосистеме вид должен обладать целым рядом специфических особенностей.

Обитатели экосистемы. Согласно концепции, выдвинутой Виноградским в 1925 г., микроорганизмы, встречающиеся в экосистеме, можно подразделить на две категории – автохтонные и аллохтонные. **Автохтонные** микроорганизмы являются типичными обитателями данной экосистемы (например, почвы, кишечника) и присутствуют там всегда. Их неизменно можно найти, скажем, в почве независимо от того, вносятся туда извне определенные питательные вещества или нет. Наличие таких видов обусловлено более или менее постоянным присутствием питательных веществ, характерных для данной экосистемы. Под **аллохтонными** (или **зимогенными**) микроорганизмами понимают такие, наличие которых зависит от случайного повышения концентрации питательных веществ или от добавления определенных веществ. Такие виды в известной мере чужды данной экосистеме, присутствуют в ней временно или пребывают в состоянии покоя.

К автохтонным обитателям экосистем относятся обычно высокоспе-

циализированные организмы, такие как нитрифицирующие бактерии, обитатели горячих источников и других экстремальных экосистем. К зиготенным представителям принадлежат многие вездесущие почвенные и водные бактерии (убиквиствы).

Численность и разнообразие микроорганизмов в экосистемах. В нормальных условиях в почве или в воде развивается большое число видов. «Нормальными» условиями мы считаем нейтральное значение pH, обилие питательных веществ и высокое содержание воды. Чем больше условия в экосистеме отклоняются от нормальных, т. е. чем более экстремальными будут химические и физические характеристики среды, тем меньше будет разнообразие видов, но зато выше численность особей, относящихся к одному и тому же виду. Такие взаимоотношения между числом видов и числом особей, с одной стороны, и степенью экстремальности условий – с другой, наблюдаются во многих экосистемах, например в горячих источниках, соленых озерах, кислых шахтных водах, в кишечнике и в сухих почвах. В экстремальных экосистемах преобладают те организмы, которые полностью приспособились к своему местообитанию и не растут, если соответствующий экстремальный фактор проявляется в меньшей степени. Это относится к крайне термофильным, психрофильным, галофильным, алкалофильным, осмофильным и другим «экстремофильным» микроорганизмам.

17.1.2 Водные экосистемы

Во многих экосистемах земной биосферы микроорганизмы занимают важное место или являются единственными формами жизни. Все экосистемы рассмотреть невозможно, поэтому мы должны ограничиться лишь несколькими. В эту небольшую выборку следовало бы включить почву как пример наземной экосистемы и океаны и моря как пример водных экосистем. Изучение плодородного пахотного слоя почвы в высшей степени интересно, но из-за наличия здесь огромного числа весьма разнородных организмов в очень малом пространстве экосистема почвы очень сложна. Поэтому мы сосредоточим свое внимание на водных системах, особенно в связи с тем, что большая часть микробиологических превращений происходит в водной среде. Типичными водными экосистемами являются океаны, моря, озера, пруды и проточные водоемы.

Океаны. Морская микробиология составляет часть биологии моря и как наука еще очень молода. Первичными продуцентами в море служат одноклеточные водоросли – фитопланктон. В пищевую цепь входят бактерии, простейшие, членистоногие и рыбы. Хотя океаны поглощают и накапливают наибольшее количество солнечной энергии, они участвуют в продукции пищи очень слабо; лишь 5–10% производимого на Земле белка образуется в океане. Продуктивность распределена здесь очень неравномерно. Эту неравномерность первичной и вторичной продукции органического вещества можно проиллюстрировать данными об

уловах рыбы. Открытый океан, занимающий 90% водной поверхности нашей планеты, дает только 0,7% всего улова рыбы; на прибрежные зоны, составляющие около 10% площади, приходится 54% улова, а естественные области подъема глубинных вод (0,1% поверхности) дают 44% общего улова. Улов рыбы, очевидно, тесно связан с общей продукцией биомассы. Его распределение позволяет ясно увидеть зависимость первичного образования биомассы от количества питательных веществ, главным образом нитратов и фосфатов. Поэтому поступление богатых питательными веществами сточных вод в мировой океан не приводит к его загрязнению – более того, оно служит предпосылкой для производства биомассы в морях. Без постоянного притока таких веществ даже моря не могут давать больших уловов.

Интересные с точки зрения бактериологии превращения происходят в краевых участках моря, около устьев рек (в эстуариях), в засоленных маршах и в области солоноватых вод. Повсеместное присутствие в морской воде сульфата приводит к тому, что в анаэробных зонах и микростообитаниях благодаря деятельности сульфатредуцирующих бактерий образуется сероводород, который оказывает воздействие на все остальное бактериальное сообщество.

Галофильные бактерии из прибрежных зон морей пока не настолько хорошо изучены, как они того заслуживают. Не только для познавательных целей, но и для решения практических задач необходимо постоянно держать в поле зрения и морские бактерии. В настоящее время большое внимание уделяется микроорганизмам сточных вод и вопросам распада труднорастворимых веществ в таких водах. Сточные воды загрязнены не только органическими примесями, но и значительными количествами солей, в том числе сульфатов. Таким образом, в них создаются условия, сходные с условиями морских экосистем. Эти соображения относительно биологии сточных вод подчеркивают необходимость уделять больше внимания микробиологическим превращениям, происходящим в экосистемах морей.

Озера. Наука об озерах и прудах (лимнология) позволила нам лучше понять частичные кругообороты и их интеграцию. Озера и более мелкие пресные водоемы представляют собой хорошо отграниченные, легко поддающиеся описанию водные экосистемы. В них имеются как аэробные, так и анаэробные зоны. Такие зоны можно обнаружить и в большинстве почв; но если в почве они сосредоточены поблизости друг от друга в очень тесном пространстве и потому их трудно изучать, в озерах такие зоны весьма обширны и легко поддаются исследованию. Однако есть основания полагать, что результаты лимнологических исследований в принципе можно перенести и на почву с ее микрогетерогенностью.

На биологические процессы в озерах и прудах большое влияние оказывают физические свойства воды. Вода имеет наибольшую плотность при 4°C. С увеличением глубины меняется температура воды; может наблюдаться более или менее устойчивая слоистость (**стратифика-**

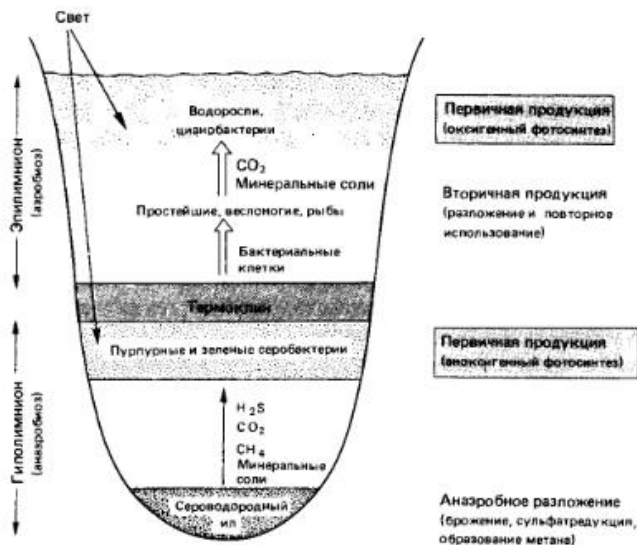


Рис. 17.1. Схематический вертикальный разрез эвтрофного озера—пример водной экосистемы. Слой температурного скачка (термоклон, или хемоклин) отделяет аэробную область от анаэробной. В обеих областях осуществляется первичное образование органического вещества путем фотосинтеза. Анаэробные условия начинают создаваться в результате анаэробного распада в донных осадках.

ция) в зависимости от времени года (рис. 17.1). Стратификация характерна для озер двух типов. К одному типу относятся пресноводные озера умеренных широт. Весной холодная вода озера прогревается солнцем; поверхностный слой воды становится теплым, его плотность уменьшается. Этот слой называют эпилимнионом. Он лежит поверх более холодного слоя воды—гиполимниона. Слои разделены переходной зоной, называемой термоклином или металимнионом; эта граница между слоями иногда бывает очень резкой. В глубоких озерах такое разделение может сохраняться в течение всего лета. В результате процессов аэробного распада растворенный в воде кислород, начиная с придонного слоя, расходуется, и в гиполимнионе создаются анаэробные условия. Эпилимнион соприкасается с кислородом воздуха, перемешивается с помощью ветра, и поэтому, как правило, условия здесь остаются аэробными. Это приводит к образованию градиентов окислительно-восстановительного потенциала и химических параметров в области термоклина, в связи с чем термоклон называют также хемоклином. Осенью происходит охлаждение эпилимниона. Если температура эпилимниона становится ниже температуры гиполимниона, происходит перемешивание обоих слоев, чему способствуют осенние бури. В случае полного перемешивания глубинные слои воды поднимаются вверх и вновь обогащаются кислородом. Благодаря этому ежегодно

восстанавливается равномерное распределение питательных веществ, которыми богаты глубинные воды. Озера с полным перемешиванием воды называют голомиктическими. Зимой может происходить обратное расслоение. Температура воды на глубине составляет 4°C , а над ней находится слой более холодной воды, имеющей меньшую плотность, а иногда и слой льда. Когда весной температура в поверхностном слое поднимается выше 4°C , стратификация снова нарушается.

Если глубинные воды, богатые питательными веществами, попадают на поверхность, начинается массовое размножение цианобактерий и зеленых водорослей («цветение воды»). Масштабы превращений вещества и продукции биомассы зависят от количества питательных веществ в водоеме: в богатых этими веществами (эвтрофных) озерах такие превращения весьма интенсивны, а в бедных (олиготрофных) едва заметны.

От голомиктических отличают меромиктические и амиктические озера, в которых происходит лишь частичное перемешивание или его не происходит вовсе, так что образуется стабильный анаэробный гиполимнион («монимолимнион»), сохраняющийся независимо от времени года. Такая перманентность стратификации свойственна главным образом тропическим озерам, где температура поверхностного слоя воды редко опускается ниже температуры глубинного слоя. Но меромиктические озера встречаются и в умеренных широтах. Стабильность стратификации в них чаще всего поддерживается высокой соленостью глубинной воды (в рукавах фиордов) или особыми географическими условиями.

На примере голомиктического озера можно описать биологические процессы, которые приводят к летнему расслоению и продолжаются несколько месяцев. В пронизанном лучами света эпилимнионе фитопланктон (диатомеи, жгутиковые, зеленые водоросли, цианобактерии) продуцирует биомассу. Обычно из окружающей среды в озеро поступает дополнительный органический материал. Часть этого органического вещества, в особенности частицы, содержащие целлюлозу, опускается на дно озера и разлагается. В начальной аэробной стадии разложения расходуется кислород, и на дне создаются анаэробные условия. В результате анаэробного распада образуются органические продукты брожения H_2 , H_2S , CH_4 и CO_2 . Поскольку конвекции не происходит, эти продукты поступают из донных отложений в толщу воды очень медленно. Один только метан—главный продукт анаэробной цепи питания в донных осадках—выделяется в виде пузырьков газа. На своем пути к поверхности водоема часть метана переходит в раствор и окисляется использующими этот газ аэробными бактериями. Быстрое потребление кислорода в гиполимнионе обусловлено ускоренным распределением метана и ростом метаноокисляющих бактерий. В конце концов во всем гиполимнионе создаются анаэробные условия.

Как только в гиполимнионе исчезает кислород, там снова начинают превращения с участием анаэробных микроорганизмов. Первичные продукты брожения используются для восстановления нитрата и сульфата. Основная масса сероводорода образуется при восстановлении

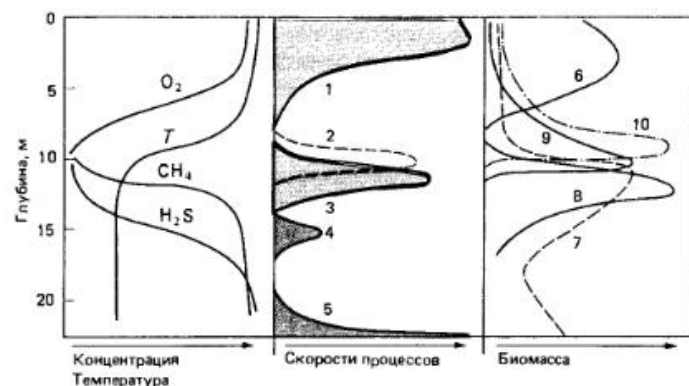


Рис. 17.2. Модельное представление вертикального профиля пресноводного озера умеренных широт с указанием концентраций, скоростей кругооборота и биомасс. В основу этой схемы положены данные Ю. И. Сорокина (1970), В. М. Горленко, Г. А. Дубининой и С. И. Кузнецова (1977), а также Дж. Овербека (1972). T – температура, °C; 1 – фиксация CO₂ на свету путем окисленного фотосинтеза; 2 – фиксация CO₂ в темноте; 3 – фиксация CO₂ на свету путем аноксигенного фотосинтеза; 4 и 5 – сульфатредукция; 6–10 – биомасса (мг/мл); 6 – водоросли и цианобактерии; 7 – общая бактериальная масса; 8 – фототрофные бактерии; 9 – простейшие; 10 – ветвистоусые и веслоногие рачки.

сульфата в толще воды (рис. 17.2). Гиполимнион и термоклин – истинный рай для анаэробных бактерий. При наличии H₂S и достаточной интенсивности света ниже термоклина растут пурпурные и зеленые серобактерии, образующие второй слой с высокой первичной продукцией биомассы. В этой зоне можно найти формы, обладающие газовыми вакуолями, такие как *Lamprocystis*, *Amoebobacter*, *Thiodictyon*, *Thiopedia*, *Pelodictyon* и *Ancalochloris*, а также передвигающиеся с помощью жгутиков виды *Chromatium* и *Thiospirillum*. Образование биомассы за счет аноксигенного фотосинтеза значительно; об этом свидетельствует количество инфузорий, веслоногих и ветвистоусых рачков, которые живут непосредственно над термоклином и питаются там фототрофными бактериями. Образующий серными пурпурными бактериями сульфат быстро снова восстанавливается до H₂S; при этом продукты, выделяемые фототрофными бактериями, вероятно, служат для сульфатредуцирующих бактерий донорами водорода.

Для зоны термоклина тоже характерна высокая биологическая активность. Здесь развиваются некоторые цианобактерии, способные переносить присутствие сероводорода и отсутствие O₂, в том числе *Oscillatoria limnetica*.

Описанные взаимоотношения представлены на рис. 17.1 и 17.2. Из этих схем ясно видно, что в стратифицированном озере имеются два типа водной среды, в которых идет первичное образование биомассы за счет фотосинтеза: в слоях, близких к поверхности эпилимниона, проис-

ходит оксигенный фотосинтез, а в верхнем слое гиполимниона – аноксигенный фотосинтез.

Проточные водоемы. В естественных, незагрязненных проточных водоемах часто бывает так мало одноклеточных организмов, что вода кажется кристально прозрачной. Следует, однако, вспомнить, что суспензия, содержащая 10⁶ бактерий в 1 мл, остается на вид незамутненной. До тех пор пока загрязнение водоемов было незначительным, участок ручья или реки длиной в несколько километров мог минерализовать весь легко разлагаемый органический материал, поступающий из прибрежных селений. Состав микрофлоры и микрофауны в проточном водоеме служит хорошим индикатором степени его загрязнения. Если в водоеме еще встречаются дафнии – значит, вода чистая. Присутствие «гриба сточных вод» *Sphaerotilus natans* указывает на сильное загрязнение органическими веществами, а запах сероводорода свидетельствует об анаэробной сульфатредукции, т. е. служит сигналом тревоги.

Очистка сточных вод. Очистное сооружение в принципе представляет собой проточный водоем, в котором при участии грибов и бактерий (аэробных и анаэробных) происходит разложение органических веществ. Загрязнения в сточных водах могут быть различного рода в зависимости от того, что сбрасывается, – только фекалии и бытовые отходы или также навоз, сточные воды боен или другие промышленные отходы. Во многих случаях сточные воды содержат тяжелые металлы или устойчивые органические соединения. Цель очистки сточных вод состоит в освобождении их от твердых и жидких минеральных и органических веществ, прежде чем эти воды попадут в ручьи и реки. Особые усилия требуются для миурализации органического материала микробиологическим путем.

Содержание органических веществ, разлагаемых микробами, оценивают по так называемому «биологическому потреблению кислорода» (БПК). Это количество кислорода, необходимое микроорганизмам для окисления органического материала в процессе дыхания. Например, БПК 5 – это количество кислорода (мг), которое будет потреблено микроорганизмами в процессе разложения органических веществ за 5 дней. «Химическое потребление кислорода» (ХПК) означает количество кислорода, необходимое для полного химического окисления тех же веществ до CO₂ и H₂O.

Для очистки сточных вод в очистных системах используются различные технические приемы, однако при этом осуществляются в принципе одни и те же основные этапы:

- 1) удаление относительно легко осаждаемых твердых частиц в пескоуловителе и в первичном отстойнике;
- 2) микробиологическое окисление растворенных органических веществ с применением активного ила либо с использованием биофильтра;
- 3) инкубация осадка, удаленного из первичного и вторичного отстойников, в анаэробных условиях в метантенке, где в результате обра-

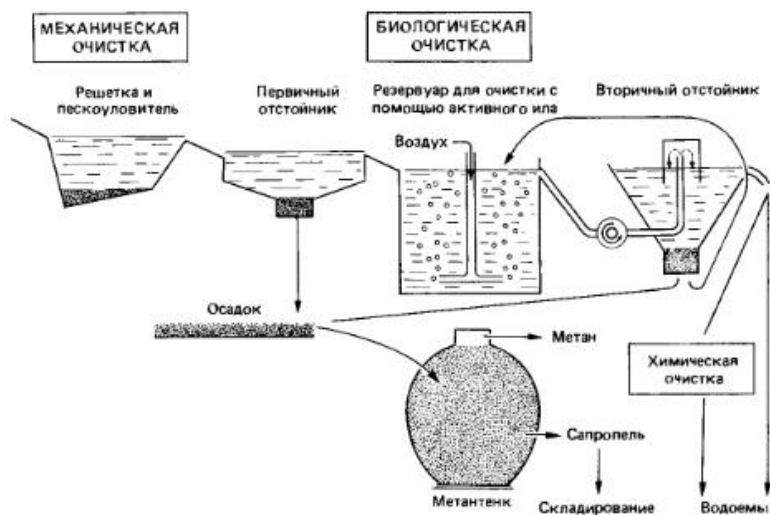


Рис. 17.3. Схема сооружения для механической и биологической очистки сточных вод.

зуются метан и выпадает осадок. После обезвоживания из этого осадка можно получать компост и использовать его в качестве удобрения или сжигать (рис. 17.3).

Затем очищенная, осветленная вода сбрасывается в реки – непосредственно или через водоприемник. Эта вода еще содержит продукты минерализации – ионы фосфата, нитрата, аммония и другие. В результате ее сброса в реке может создаться такой избыток питательных веществ, что это вызовет увеличение первичной продукции. Для того чтобы избежать такой эвтрофикации водоемов, можно либо использовать очищенные сточные воды для орошения полей или удобрения лесных почв, либо добавить к обычной процедуре еще один этап очистки и путем денитрификации освобождать сточные воды хотя бы от связанного азота. Дополнительно их можно очищать путем химического осветления, а именно осаждения ионов фосфата с помощью солей железа. Возможно проведение и других мероприятий по очистке сточных вод.

17.2. Микроорганизмы как симбиотические партнеры

Между разными микроорганизмами существуют взаимоотношения различного типа. В процессе эволюции выработались отношения зависимости, взаимной или односторонней, выходящие далеко за пределы связей, обусловленных пищевыми цепями. После того как прокариоты и многие эукариотические микроорганизмы достигли своего современного уровня развития, появились высшие формы жизни – новые потен-

циальные местообитания для низших. Животные и растения развивались в такой среде, в которой уже существовали почти все типы метаболизма, свойственные прокариотам. Естественно, что создалось множество партнерских отношений между микроорганизмами, с одной стороны, и животными и растениями – с другой. Тесное сожительство двух различных организмов называется **симбиозом**.

Если говорить об относительной пользе, извлекаемой партнерами из симбиоза, то здесь можно выделить несколько вариантов: 1) сожительство создает благоприятные моменты для обоих партнеров (взаимовыгодный симбиоз – **мутуализм**); 2) один из партнеров по симбиозу испытывает вредное воздействие другого (в этом случае говорят о **паразитизме**); 3) во многих случаях партнеры могут не оказывать друг на друга никакого влияния (**нейтрализм**).

Различными могут быть и пространственные отношения между партнерами. Если один партнер находится вне клеток другого, говорят об **эктосимбиозе**, а если внутри клеток – об **эндосимбиозе**. Более крупного из партнеров обычно называют хозяином.

Можно различать функциональные типы симбиоза в зависимости от рода пользы, которую один или оба партнера извлекают из сожительства. Иногда тесная ассоциация улучшает питание, например благодаря тому, что один из партнеров фиксирует молекулярный азот, расщепляет целлюлозу, доставляет основные питательные вещества, витамины и т.п. Симбионт может выполнять сигнальную функцию, как в случае ассоциации светящихся бактерий и рыб. Возможна и защитная роль симбионта. Организм хозяина часто служит просто прибежищем для экто- и эндосимбиотических микроорганизмов; иногда, однако, последние защищают хозяина от других – паразитических или патогенных – микробов (например, в кишечном тракте или на поверхности тела).

Поскольку в разделах, посвященных типам метаболизма, уже говорилось о ряде симбиотических ассоциаций, мы дадим здесь лишь краткий обзор некоторых важных форм симбиоза.

17.2.1 Мутуалистический симбиоз

Ассоциации между микроорганизмами. В мире микробов можно найти многочисленные случаи *синтрофии* – взаимного снабжения необходимыми веществами. Синтрофную ассоциацию образуют, например, *Desulfuromonas acetoxidans* с *Chlorobium* или *Desulfovibrio* с *Chromatium*. В обоих случаях партнер, названный первым, поставляет второму донор водорода, а второй первому – акцептор водорода (разд. 9.3). Синтрофия может касаться и снабжения витаминами или их предшественниками. Гриб *Mucor ramannianus* и дрожжи *Rhodotorula rubra* нуждаются в витамине В₁ (тиамине). Первый из этих видов может синтезировать пиримидиновый компонент, но не способен к синтезу тиазола; второй продуцирует тиазол, но не способен к синтезу пиримидина. Если оба организма выращивать в смешанной культуре, то первый вид будет выделять пи-

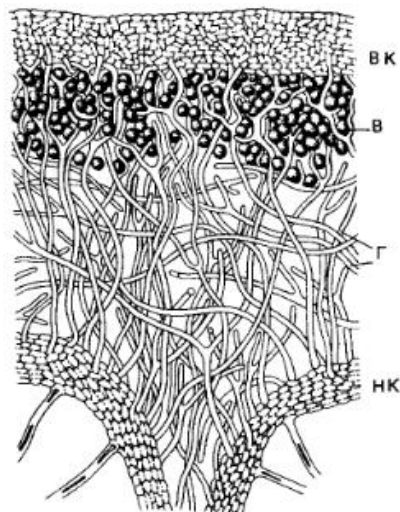


Рис. 17.4. Разрез через таллом лишайника. В – водоросль (фикобионт); Г – гифы гриба (микобионта); ВК и НК – верхний и нижний корковые слои.

римидиновый, а второй – тиазоловый компонент, так что потребности обоих видов будут удовлетворены.

Примером высокоразвитого эктосимбиоза между микроорганизмами могут служить лишайники. В талломе лишайника гриб и водоросль (или цианобактерия) так тесно связаны между собой, что образуют единое растительное тело (рис. 17.4). Из такого симбиоза извлекают пользу оба партнера. Как правило, формообразующим компонентом является грибная часть лишайника – микобионт. Гриб получает от клеток водоросли органические вещества (продукты фиксации CO_2), а сам снабжает водоросль минеральными солями и защищает ее от неблагоприятных воздействий, в особенности от высыхания. Фикобионтами в лишайнике могут быть зеленые водоросли и цианобактерии. Можно разделить партнеров и культивировать их по отдельности, а также создавать искусственные лишайники. Эти комбинированные организмы заселяют экстремальные местообитания, в которых ни один из партнеров не мог бы жить в одиночку.

Если из симбиоза извлекает выгоду только один партнер, не принося вреда другому, то говорят о комменсализме. Поясним это на примере. В приготовлении гарцкого сыра используются один гриб и одна бактерия. Из данной ассоциации пользу извлекает только бактерия; гриб окисляет кислоты, содержащиеся в твороге, и тем самым создает для нее подходящие условия. Еще один пример – ассоциация аэробных и анаэробных бактерий, в которой первые путем быстрого восстановления O_2 делают местообитание пригодным для анаэробов. В других случаях определенные микроорганизмы могут выделять деполимеразы, расщепляющие полисахариды, белки или нуклеиновые кислоты, благодаря чему эти вещества становятся доступны и для других видов.

Микроорганизмы и растения. В ризосфере (зоне, окружающей корни) многих растений часто бывает больше бактерий, чем в остальной почве. По-видимому, росту бактерий способствуют здесь питательные вещества, выделяемые корнями. Полезность для растений этой довольно слабой ассоциации трудно установить. Но все же, поскольку многие почвенные бактерии выполняют важные для растений функции, например связывают азот или делают легко усвояемыми труднорастворимые питательные соли, можно думать о мутуалистических отношениях. В последние годы азотфиксаторами были признаны некоторые бактерии, постоянно сопутствующие определенным травянистым растениям (бактерия *Azotobacter paspali* в ризосфере *Paspalum notatum*; *Azospirillum lipoferum* в прикорневой области *Digitaria* и кукурузы).

У многих растений существует тесная ассоциация корней с грибами – микориза. Многие почвенные грибы, в том числе агариковые, могут проникать в корни растений и внедряться в их клетки; при этом они стимулируют рост корней, выделяя ауксины. Опытные грибники знают, что некоторые съедобные грибы растут только вблизи определенных видов деревьев (ель, лиственница, сосна, дуб), которые в микоризе играют роль растения-хозяина. Гриб, проникший в клетки корневой коры, образует в ней разветвления в виде пузырьков и веточек (везикулярно-арбускулярная микориза). Польза такой ассоциации для гриба состоит в том, что он получает от растения продукты ассимиляции, а для растения – в более эффективном поглощении минеральных веществ (фосфата, связанного азота) из почвы.

Мы уже рассматривали ассоциацию растений с азотфиксирующими эндо- или эктосимбиотическими бактериями (разд. 13.1). Симбиоз видов *Rhizobium* с клетками бобовых растений в корневых клубеньках относится к наиболее дифференцированным симбиотическим взаимоотношениям. Он служит прекрасным примером развития тесной ассоциации внутриклеточного симбионта с клеткой-хозяином; это один из важнейших фактов, подкрепляющих гипотезу об эндосимбиотическом происхождении некоторых клеточных органелл (с. 26).

Микроорганизмы и животные. Существует огромное множество симбиотических связей между микроорганизмами и животными. Лишь в некоторых случаях функция партнеров так же очевидна, как в случае с рубцом жвачных (разд. 14.1). При изучении симбиотических отношений, особенно у низших животных, включая простейших, возникает много трудных проблем. Главный вопрос нередко состоит в том, содержит ли кишечный тракт специфическое микробное сообщество, которое обеспечивает определенную защиту от патогенных микроорганизмов или выполняет специальную пищеварительную функцию. Из массы примеров мы остановимся лишь на некоторых.

Простейшие – как свободноживущие, так и обитающие в пищеварительном тракте жвачных, термитов и тараканов (инфузории, жгутиковые, амёбы) – часто сосуществуют с экто- и эндосимбиотическими бактериями.

Еще на раннем этапе исследований по генетике микроорганизмов стал широко известен феномен «убийцы» у инфузории *Paramecium aurelia*. Как обнаружил Соннеборн, среди штаммов этого вида можно различить две группы: одни штаммы («убийцы») выделяют токсичное вещество, к которому сами они резистентны; другие штаммы чувствительны к этому веществу и погибают от его воздействия. Оказалось, что способность вырабатывать токсичное вещество и убивать другие клетки определяется цитоплазмой, а не генами клеточного ядра. Признак «убийцы» передается при конъюгации, причем чувствительный реципиент тоже становится «убийцей». Было установлено, что это свойство связано с присутствием так называемых «каппа-частиц»; последние в конце концов оказались эндосимбиотическими бактериями. Штаммы-«убийцы» удаётся «излечить» от каппа-частиц, например путем обработки антибиотиками. При микроскопическом исследовании каппа-частицы легко выявить по наличию сильно преломляющих свет включений (R-тельце); такое тельце состоит из свернутой белковой ленты. Вероятно, именно с ним связано токсичное вещество. Ситуация еще более усложнилась, когда в каппа-частицах были обнаружены головки фагов; по-видимому, в бактериях-симбионтах содержатся умеренные фаги. К сожалению, эти несомненно эндосимбиотические бактерии до сих пор не удалось культивировать вне хозяина. Изучение каппа-частиц вновь вступило в активную стадию, когда недавно были выделены почвенные бактерии, содержащие R-тельца.

Многие простейшие служат прибежищем для зеленых, коричневых или желтых одноклеточных водорослей—зоохлорелл и зооксантелл; другие простейшие, например жгутиконосец *Cyanophora*, содержат цианобактерии, называемые цианеллами. Польза фотосинтезирующих партнеров для простейших очевидна: они предоставляют в распоряжение хозяина полный фотосинтетический аппарат для построения углеводов, подобно тому как и в лишайниках фикобионт снабжает микобионт продуктами ассимиляции.

У многих насекомых в кишечнике или в особых его придатках обитают в качестве симбионтов инфузории, дрожжи и бактерии. Они могут быть там внеклеточными симбионтами или же находиться в клетках специализированных тканей. О функции этих микроорганизмов нетрудно догадаться, особенно в тех случаях, когда их хозяева питаются трудно разлагаемыми веществами (как, например, термиты, питающиеся древесиной) или же потребляют несбалансированную пищу (как многие тли и клопы, сосущие соки растений). Симбионты либо выполняют пищеварительную функцию, либо поставляют хозяину необходимые ему дополнительные вещества (стероиды, витамины, аминокислоты). В то время как морфолого-анатомическое изучение симбиоза у насекомых продвинулось далеко вперед (в основном благодаря работам П. Бюхнера), физиолого-биохимические исследования пока мало что дали—в основном из-за того, что не удавалось выращивать симбиотические микроорганизмы вне хозяина.

У многих насекомых содержащие эндосимбионтов органы (мицетомы) образуются из придатков задней кишки. В отличие от этого упоминавшийся уже рубец жвачных представляет собой орган переднего отдела кишечного тракта. Однако придатки заднего отдела встречаются и у млекопитающих: у многих растительноядных животных переваривание пищи с участием микроорганизмов происходит в выростах заднего отдела кишечника. При локализации симбионтов близко к концу кишечного тракта животное не может извлечь всю пользу из симбиоза; становится понятно, почему некоторые животные поедают собственные фекалии (копрофагия): таким образом они полнее используют все питательные вещества.

О составе кишечной флоры человека уже говорилось в разделе 8.2. Мутуалистический характер взаимоотношений между нашим организмом и его бактериальной флорой становится очевидным, когда эти отношения нарушаются и популяции бактерий гибнут под действием антибиотиков и химиотерапевтических средств. Особенно четко выявляется функция кишечной флоры у животных, выращенных в стерильных условиях. При надлежащем питании эти животные развиваются совершенно нормально, но их восприимчивость к инфекционным заболеваниям оказывается резко повышенной. Таким образом, нормальная бактериальная флора играет решающую роль в защите от патогенных и других посторонних микроорганизмов.

Подобного рода взаимоотношения существуют также между организмом человека и его кожной флорой. Нашей коже свойственна характерная бактериальная флора, которая состоит в основном из микобактерий, стрептококков, стафилококков и пропионовых бактерий и потребляет питательные вещества, содержащиеся в поте. Нормальная кожная флора не вызывает никаких нежелательных явлений, если не считать выработки пахучих веществ. Полезные функции кожной флоры становятся очевидными тогда, когда при наружном применении бактериостатических антибиотиков или внутреннем перенасыщении ими организма поражаются и кожные бактерии. В этом случае начинается размножение дрожжей (*Candida albicans*) и других патогенных грибов.

Многие морские рыбы имеют особые светящиеся органы. В морфологическом отношении это очень сильно дифференцированные структуры, в которых растут светящиеся бактерии (*Photobacterium fisheri*).

17.2.2 Антагонистический симбиоз

Симбиотические отношения, при которых хозяину наносится более или менее выраженный вред, существуют между самими микроорганизмами и между микробами, с одной стороны, и животными и растениями—с другой. Мы уже останавливались на различных формах паразитизма, когда говорили, например, о бактерии *Bdellovibrio bacteriovorus*, паразитирующей на других бактериях (разд. 3.14); о риккетсиях и хламидиях—

облигатных внутриклеточных паразитах (разд. 3.18), о возбудителях болезней у растений (*Erwinia*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Uredo*, *Ustilago*, *Puccinia*, *Claviceps*) и у животных. Теоретические аспекты паразитизма и вопросы вмешательства в равновесие между паразитическими микроорганизмами и их хозяевами исследует ветеринарная и медицинская микробиология, а также фитопатология.

17.3 Микроорганизмы и геологическая история Земли

Микроорганизмы сыграли важнейшую роль в построении земной коры. В значительной мере в результате их деятельности произошло частичное разделение химических элементов и соединений, залегающих в коренных породах в виде смесей. Месторождения многих полезных ископаемых, разрабатываемые в настоящее время, своим возникновением полностью или частично обязаны деятельности микроорганизмов.

Отложение железа. Крупнейшие месторождения железных руд представляют собой «полосчатые железорудные формации» (ПЖФ). Осаждение оксидов железа происходило здесь в основном в период от 2,8 до 1,6 млрд. лет назад. До того времени выделявшееся из магматических пород морского дна железо накапливалось в большом количестве в виде ионов Fe^{2+} вместе с другими восстановленными ионами (S^{2-} , Mn^{2+}) в морях. Когда начался окислительный фотосинтез цианобактерий, ионы S^{2-} стали окисляться в SO_4^{2-} , а Fe^{2+} — в Fe^{3+} . Последние труднорастворимы. Осаждение окиси железа на больших площадях происходило в тех местах, где содержащее железо глубинные воды приходили в соприкосновение с кислородсодержащими поверхностными водами. В полосчатых железорудных формациях чередуются слои окиси железа и слои кремнезема (толщиной от 0,2 до 2,0 мм). Как полагают, эта слоистость — результат сезонного ритма фотосинтеза в водоемах, где формировались осадки. Лишь тогда, когда завершилось окисление серы и железа в морской воде, кислород стал накапливаться в атмосфере (начиная с периода 1,6 млрд. лет назад).

В мобилизации железа, содержащегося в гранитных породах, и в его осаждении тоже участвуют микроорганизмы. Когда сера в пирите или марказите под действием *Thiobacillus thiooxidans* и *T. ferrooxidans* окисляется в серную кислоту, железо в виде соли $Fe(II)$ становится растворимым и окисляется под действием *T. ferrooxidans* в соль $Fe(III)$ (о выщелачивании железа см. разд. 11.3).

При нейтрализации воды трехвалентное железо выпадает в осадок в виде $Fe(OH)_3$. В высшей степени вероятно, что многие месторождения очень чистого оксида железа создавались в результате продолжавшегося миллионы лет микробного выщелачивания. В других местах в солиобилизации железа определенно участвуют органические кислоты (гуминовые). Последующее биологическое окисление $Fe(II)$ в $Fe(III)$ может происходить под воздействием железобактерий, таких как *Gallionella*

или *Siderocapsa* (при нейтральном pH). В результате образуется болотная и «луговая» железная руда.

Отложение карбоната кальция. Во многих водоемах кальций присутствует в форме $Ca(HCO_3)_2$ или $CaSO_4$. Вследствие изменения pH или удаления CO_2 фотосинтезирующими организмами бикарбонат превращается в труднорастворимый карбонат кальция и выпадает в осадок. В анаэробных условиях сульфат при участии сульфатредуцирующих бактерий восстанавливается до сероводорода, и при этом выпадает в осадок карбонат кальция:



Большая часть известняка образовалась, вероятно, вследствие того, что гидрокарбонат кальция перемещался в тропические водоемы и там осаждался в виде $CaCO_3$ при выделении CO_2 под действием повышенной температуры:



Отложение серы. Образование пригодных для разработки залежей серы связано с бактериальным восстановлением сульфата. При разложении органических соединений в анаэробных условиях в присутствии сульфата последний служит предпочтительным акцептором водорода. Образующийся сероводород подавляет любые потенциально возможные процессы анаэробного дыхания. Исследования с применением изотопов подтвердили вывод о том, что, например, месторождения серы в штатах Техас и Луизиана имеют биогенное происхождение.

Сера, содержащаяся в морской воде, состоит в основном из двух стабильных изотопов: ^{32}S (95%) и ^{34}S (4%). При бактериальном восстановлении сульфата (которое лимитируется главным образом поступлением доноров водорода) сульфат $^{32}SO_4^{2-}$, содержащий легкий изотоп, имеет больше шансов быть поглощенным клетками и подвергнуться восстановлению, чем сульфат с ^{34}S . Поэтому образующийся сероводород содержит меньше ^{34}S , чем сульфат морской воды. При окислении (биологическом или абиотическом) этого «легкого» сероводорода образуется «легкая» сера. Содержание изотопов серы в упомянутых месторождениях указывает на биогенный характер этой серы. Изотопный состав биогенной серы значительно отличается от состава, найденного при изотопном анализе вулканической серы (на о. Сицилия).

Обсуждение биогеохимических превращений можно было бы продолжить в связи с вопросом об образовании других месторождений — каменного угля, нефти, природного газа, кизельгура, бокситов. В тех или иных превращениях микроорганизмы участвуют благодаря своим метаболическим процессам, таким как окисление, брожение, кислотообразование, восстановление, ассимиляция CO_2 , выделение летучих продуктов. Результатом их являются минерализация, растворение, мобили-

зация и иммобилизация различных веществ. Проблемами участия микроорганизмов в образовании, изменении и разложении горных пород занимается геомикробиология.

17.4 Эволюция микроорганизмов

Биохимическое единство, мысль о котором еще несколько десятилетий назад казалась столь невероятной, в настоящее время — твердо установленный факт. Клетки всех живых существ, от самых примитивных форм до наиболее высокоразвитых животных и растений, состоят из одних и тех же структурных элементов и используют одни и те же механизмы для получения энергии и для роста. По сравнению с этим фундаментальным единством существующие различия и отклонения кажутся незначительными. Можно считать, что все ныне живущие организмы проделали вместе длинный путь развития. Из простейших форм постепенно развились формы более сложные и специализированные, а потом, наконец, и те, которые населяют нашу планету сегодня. Этот процесс эволюционного развития организмов — одна из центральных проблем биологии.

Первичная атмосфера Земли. Наша Земля кардинальным образом отличается от других планет Солнечной системы. По сравнению с Юпитером и Солнцем она содержит лишь незначительные количества инертных газов. По-видимому, она образовалась в результате объединения множества метеоритов; вследствие нагрева и расплавления внутреннего ядра Земли вода и газы были вытеснены к ее поверхности. Первичная атмосфера, вероятно, содержала много водорода, метана, азота и CO_2 , но в ней не было кислорода. При фотоллизе водяных паров, разумеется, освобождался кислород, но он вновь переходил в связанное состояние. Химическая эволюция могла происходить только в бескислородной атмосфере.

Химическая эволюция. Гипотеза, согласно которой жизнь была занесена на нашу планету извне, вряд ли заслуживает в настоящее время серьезного обсуждения. Самовоспроизводящиеся биологические единицы должны были возникнуть на самой Земле в ранний период ее существования. Согласно представлению, выдвинутому Холдейном и Опариным, в то время на Земле накопились большие количества органических веществ, но еще не было организмов, способных их использовать и минерализовать. Когда после первых попыток Миллера удалось неоднократно подтвердить в эксперименте, что из неорганических веществ (H_2 , CO_2 , NH_3 , H_2O) и метана при подходящих условиях могут синтезироваться простые органические молекулы, сомнения в реальности химической эволюции полностью отпали. Как полагают, в восстановительной первичной атмосфере (в которой не было кислорода) под действием солнечной радиации и в результате электрических разрядов образовывались органические вещества, которые затем попадали в воду и в ней накапливались. Когда они накопились в большом количестве,

видимо, возникли условия, при которых мог совершиться переход от химической эволюции к возникновению первых самовоспроизводящихся живых существ.

Биологическая эволюция. Переход от неживой органической материи к живой клетке потребовал длительного времени (от 3,1 до 4,5 млрд. лет). Появившиеся клеточные организмы получили, очевидно, столь большое селективное преимущество, что все предшествующие формы организации оказались вытесненными. Поскольку доклеточные формы жизни (если они существовали) не сохранились даже в ископаемом виде, переход от неживого к живому представляется нам чрезвычайно быстрым.

Эволюция прокариот. Согласно распространенному, хотя и весьма гипотетическому представлению, в восстановительной первичной атмосфере происходило развитие прокариотических организмов (рис. 17.5). Первыми прокариотами, которые могли появиться в водоемах, богатых органическими веществами, были организмы, существовавшие за счет брожения и обладавшие основными функциями анаэробного обмена (фруктозобисфосфатный и пентозофосфатный пути). Если предположить, что в водоемах имелись тогда и сульфаты, то следующим достижением органической эволюции мог быть эффективный транспорт электронов с созданием протонного потенциала как источника энергии для регенерации АТФ. На этом этапе эволюции, вероятно, возникли производные тетрапиррола, содержащие железо или никель, а также автотрофный способ ассимиляции углерода (путь ацетил- CoA). Как реликты тех времен могут рассматриваться метанобразующие и ацетогенные бактерии, а также бактерии, восстанавливающие сульфаты до сульфида, которые, за рядом исключений, могут использовать H_2 , CO_2 и некоторые продукты брожения.

После «изобретения» фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, могла возникнуть также фотосистема I — «протонный насос, приводимый в действие светом», что позволило использовать свет в качестве источника энергии. Реакционными центрами служили магнийпорфирины (хлорофиллы). Первые фототрофные организмы, вероятно, ассимилировали углерод на свету подобно *Rhodospirillaceae*. С приобретением способности фиксировать CO_2 в рибулозобисфосфатном цикле и использовать неорганические доноры электронов (H_2 , H_2S , S) выработался тип метаболизма, характерный для пурпурных серных бактерий (*Chromatiaceae*). К еще большей независимости от растворенных в воде веществ привело затем появление фотосистемы II: стал возможен нециклический перенос электронов с использованием воды в качестве их донора. Этот процесс был неизбежно связан с выделением кислорода. Оксигенный фотосинтез привел к тому, что земная атмосфера приобрела окислительный характер. Представителями первых микроорганизмов, осуществлявших фотосинтез с выделением O_2 , являются цианобактерии.

Переход от первичной восстановительной атмосферы к атмосфере, содержащей кислород, несомненно, был величайшим событием как в эво-

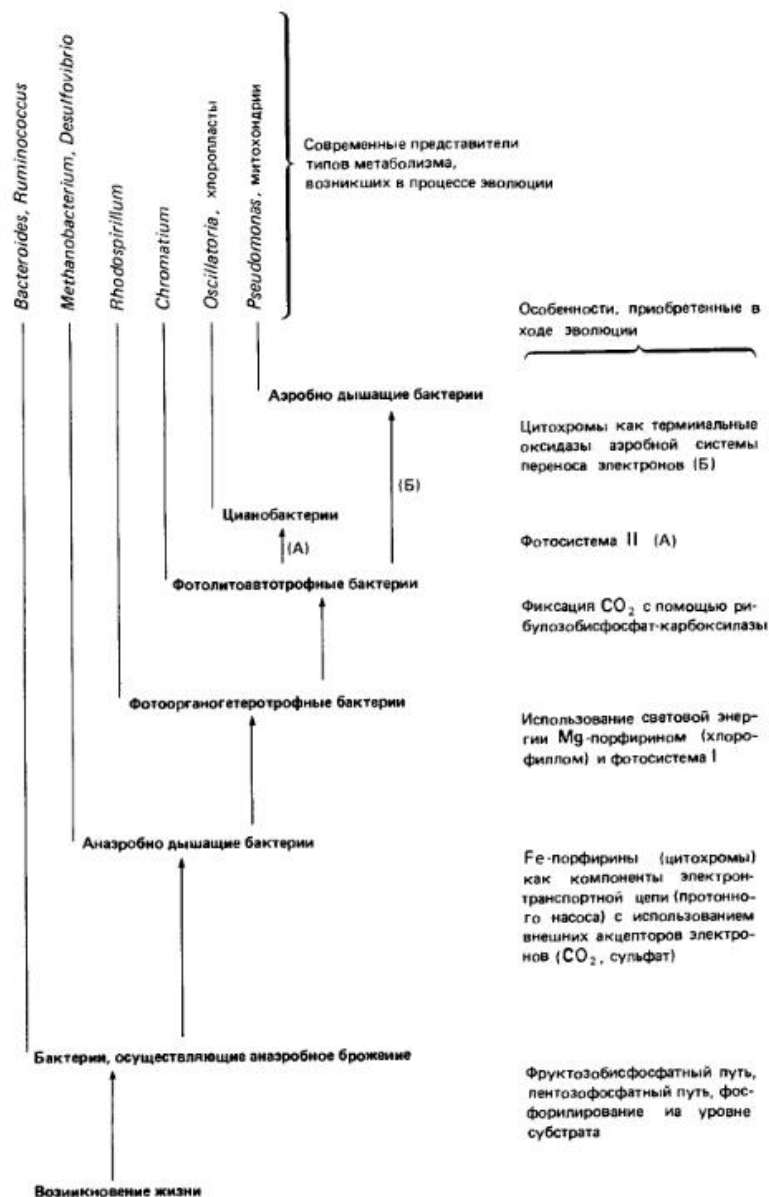


Рис. 17.5. Гипотетические этапы эволюции метаболизма у прокариот.

люции живых существ, так и в преобразовании минералов. В результате превращения цитохромов в терминальные оксидазы и использования молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов у бактерий стал возможным новый тип метаболизма – аэробное дыхание.

Как полагают, 2,1 млрд. лет назад уже существовали все фототрофные дышащие прокариоты, известные в настоящее время. Согласно геологическим данным, уже 2,7 млрд. лет назад имелся в небольшом количестве кислород. На протяжении последних 1,2 млрд. лет вся жизнь на Земле зависит от биологического фотосинтеза и от кислорода, выделяемого растениями. Вызвав накопление кислорода в атмосфере, развитие жизни тем самым – через окисление металлов и минералов – повлияло и на неживую природу.

В период до 0,6 млрд. лет назад содержание кислорода в атмосфере увеличилось, вероятно, всего лишь до 2%. И только после того, как растения завоевали сушу и покрыли ее густым зеленым ковром, концентрация кислорода в воздухе резко повысилась и достигла современного уровня (21%). Накопление O_2 сопровождалось образованием отложений углерода в форме каменного угля, нефти, природного газа и углеродсодержащих осадочных пород.

Ископаемые остатки, относящиеся к раннему докембрию, чрезвычайно редки. Из-за малой величины примитивных организмов и отсутствия у них каких-либо твердых компонентов остатки их могли сохраниться лишь при исключительных обстоятельствах. В штате Миннесота (США) в отложениях, возраст которых оценивают в 2,7 млрд. лет, были обнаружены структуры, интерпретируемые как остатки бактерий (в том числе цианобактерий). Возраст южноафриканских отложений, в которых тоже были найдены структуры, напоминающие бактерии, достигает 3,1 млрд. лет. Это самые древние из всех известных следов жизни.

Бактерии – это сохранившиеся до наших дней живые свидетели ранней эволюции жизни. Многие в прошлом широко распространенные и господствовавшие бактерии в настоящее время ведут весьма скромное существование. В экологических нишах, обеспечивающих им подходящие условия жизни, сохранились также и анаэробные бактерии.

Эволюция эукариот. Эукариотические клетки, видимо, возникли лишь тогда, когда в атмосфере появился кислород. Все эукариоты, за очень малым исключением, – аэробные организмы. Прокариоты занимали много различных экологических ниш. Выработка разнообразных типов метаболизма у прокариот была, по-видимому, обусловлена простой структурой клетки, высокоразвитыми системами регуляции, быстрым ростом и наличием нескольких механизмов переноса генов. На пути дальнейшей эволюции прокариот стояли непреодолимые трудности, связанные прежде всего с малыми размерами генома, его гаплоидным состоянием и малой величиной клеток. Новая окружающая среда с аэробными условиями позволяла получать больше энергии, но для ее использования нужны были более крупные клетки, широкие возможности структурной дифференцировки и соответственно во много раз больший

геном, который обеспечивал бы хранение большого объема информации. Величина генома $5 \cdot 10^9$ Да была, вероятно, верхним пределом молекулярной массы бактериальной хромосомы, состоящей из единственной двойной цепи. Для дальнейшей эволюции требовалось создание новой модели.

Различия между прокариотической и эукариотической клетками (эуцитом и проточитом) огромны. Еще раз перечислим важнейшие особенности клеток эукариот:

1. Носитель наследственной информации (ДНК) отделен от «метаболических пространств» ядерной оболочкой.

2. Вследствие этого транскрипция (в ядре) отделена от трансляции (в цитоплазме).

3. Геном разделен на части – имеется несколько (часто много) линейных хромосом вместо одной кольцевой.

4. Репликация ДНК происходит только в интерфазе; каждая хромосома имеет по несколько репликационных; дочерние хромосомы распределяются путем митоза.

5. Существуют внутриклеточные механизмы с использованием актина и тубулина для перемещения хромосом во время митоза и мейоза, а также структуры типа пузырьков (лизосомы, пероксисомы и другие «микротельца»).

6. В генах имеются некодирующие вставки – интроны.

7. ДНК образует комплекс с гистонами, по структуре напоминающий нитку жемчуга (цепь из нуклеосом).

8. Жизненный цикл включает мейоз, при котором из диплоидных клеток образуются гаплоидные. Это позволяет осуществить половой процесс с рекомбинированием генов и смену гаплофазы и диплофазы.

9. Экзоцитоз: внеклеточные ферменты синтезируются не прямо на плазматической мембране (с одновременным выведением их из клетки), а на внутренних мембранах, после чего в цистернах доставляются на поверхность.

10. Эндоцитоз (в форме фагоцитоза и пиноцитоза), позволяющий приобретать внутриклеточных симбионтов.

11. Наличие митохондрий и хлоропластов, которые служат для получения энергии (ресинтеза АТФ).

12. Жгутики (или реснички) типа $9 + 2$.

Итак, эуцит отличается от проточита многими функциями и структурами. Хотя и известны отдельные эукариоты, у которых тот или иной признак отсутствует, нет таких примитивных форм, по которым можно было бы определить, в какой последовательности появлялись новые признаки. По-видимому, каждый этап эволюции приносил с собой лишь очень небольшое селективное преимущество, по крайней мере по сравнению с ближайшей предшествующей ступенью. Таким образом, промежуточные формы не сохранялись и, вероятно, были такими нестойкими, что сейчас нет даже ископаемых остатков, которые позволяли бы судить об их функциональных особенностях. В настоящее время имеется

лишь небольшое число организмов, которые можно считать развившимися из промежуточных форм. Возможность когда-либо установить последовательность появления перечисленных выше новых признаков следует оценить пессимистически. Но все же можно предположить, что на ранних этапах эволюции эукариотической клетки возникали различные модели ее организации, прежде чем появились многоклеточные организмы.

Следует отметить, что эукариоты специализировались в основном на фотосинтезе и существовании в аэробных условиях, а целый ряд других важных экологических функций остался за прокариотами. К ним относятся фиксация азота, нитрификация, денитрификация, сульфатное и серное дыхание, окисление серы и металлов, образование и использование метана. Круговорот азота и серы полностью или преимущественно находится «в ведении» прокариот. Таким образом, прокариоты могли бы поддерживать круговороты веществ и сохранять биосферу, тогда как эукариоты одни не справились бы с этой задачей.

Если прокариоты в течение миллиардов лет развивались сами по себе, то эукариоты никогда не оставались одни. Им приходилось все время противостоять прокариотам. Они предоставляли последним новые экологические ниши, защиту и были их жертвами. Многоклеточные организмы своими высокоразвитыми защитными и иными приспособлениями отчасти обязаны агрессивности прокариот. С другой стороны, эукариоты научились извлекать пользу из тесной ассоциации с прокариотами и поставили их себе на службу в качестве эктосимбионтов (в кишечном тракте, на коже, у жвачных в рубце) и эндосимбионтов (для фиксации азота, продукции биомассы путем фотосинтеза, использования H_2S , удаления H_2).

Эволюция живых организмов предлагает для решения массу увлекательных проблем. Их исследование только начинается.

1. Учебники микробиологии

- Brock T.D.* (1979), *Biology of Microorganisms*, 3 Aufl., Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S.* (1980), *Microbiology*, 3 Aufl., Harper & Row, New York.
- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B.* (1968), *Principles of Microbiology and Immunology*, Harper & Row, New York.
- Lamanna D., Malette M.F., Zimmermann L.N.* (1973), *Basic Bacteriology. Its Biology and Chemical Background*, 4 Aufl., Williams & Wilkins, Baltimore.
- Pelczar M.J. jr., Reid R.D., Chan E.C.S.* (1977), *Microbiology*, 4 Aufl., McGraw-Hill, New York.
- Salle A.J.* (1973), *Fundamental Principles of Bacteriology*, 7 Aufl., McGraw-Hill, New York.
- Schön G.* (1978), *Mikrobiologie*, Herder Verlag, Freiburg.
- Stanier R.Y., Adelberg E.A., Ingraham J.L.* (1978), *General Microbiology*, 4 Aufl., MacMillan, London.
- Thimann K.V.* (1955), *The Life of Bacteria. Their Growth, Metabolism, and Relationships*, MacMillan, New York.

2. Клетка и ее структура

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.* (1983), *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York. [Имеется русский перевод: Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. и др. Молекулярная биология клетки: в 5-ти томах.—М.: Мир, 1986—1987.]
- Carlile M.J.* (1980), From Prokaryote to Eukaryote: Gains and Losses, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **30**, 1.
- Cavalier-Smith T.* (1981), The Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **32**, 33.
- Czihak G., Langer H., Zieger H.* (Herausgeb.) (1981), *Biologie*, 3 Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gunsalus I.C., Stanier R.Y.* (Herausgeb.) (1960), *The Bacteria*, Bd. 1, Academic Press, New York.
- Kandler O.* (1982), Cell Wall Structures and Their Phylogenetic Implications. *Zentralbl. Bacteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., Abt. 1, Orig. C.*, **3**, 149.
- Kleinig H., Sitte P.* (1984), *Zellbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Lodish H.F., Rothman J.E.* (1979), The Assembly of Cell Membranes, *Sci. Am.* **240** (1), 38.
- Metzner H.* (1970), *Die Zelle*, 2 Aufl., Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

3. Прокариоты. Систематический обзор

- Buchanan R.E., Gibbon N.E.* (Herausgeb.) (1974), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 Aufl., Williams & Wilkins, Baltimore.
- Buchanan R.E., Holt J.G., Lesser jr. E.F.* (1966), *Index Bergeyana*, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Krieg N.R., Holt J.G.* (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. I, Williams & Wilkins, Baltimore.

- Lapage S.P., Sneath P.A.M., Lessel jr. E.F., Skerman V.B.D., Seeliger H.P.R., Clark W.A.* (1975), *International Code of Nomenclature of Bacteria*, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Rippka R., Dernelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.* (1979), Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1.
- Schejfer K.H., Stackebrandt E.* (1983), *Molecular Systematics of Prokaryotes*, *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 143.
- Skerman V.B.D.* (1967), *A Guide to the Identification of the Bacteria*. 2 Aufl., Williams & Wilkins, Baltimore.
- Sneath P.H.A., Sokal R.R.* (1973), *Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification*. Freeman, San Francisco.
- Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G.* (Herausgeb.) (1981), *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*, Bd. I und II, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Waksman S.A., Lechevalier H.A.* (1962), *The Actinomycetes*, Bd. I—III, Williams & Wilkins, Baltimore.

4. Вирусы: распространение и структура

- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S.* (1980), *Microbiology*, 3 Aufl., Harper & Row, New York.
- Glass R.E.* (1982), *Gene Function. E. coli and its Heritable Elements*, Croom Helm, London.
- Hershey A.D.* (Herausgeb.) (1971), *The Bacteriophage Lambda*, Cold Spring Harbor Monograph Series, Cold Spring Harbor, New York.
- Luria S.E., Darnell jr. J.E., Baltimore D., Campbell A.* (1978), *General Virology*, 3 Aufl., Wiley, New York.

5. Грибы

- Esser K.* (1982), *Cryptogams. Cyanobacteria, Algae, Fungi, Lichens*, Cambridge University Press, London.
- Smith J.E., Berry D.R.* (1975), *The Filamentous Fungi, Industrial Mycology*, Bd. I, E. Arnold, London.
- Smith J.E., Berry D.R.* (1976), *The Filamentous Fungi. Biosynthesis and Metabolism*, Bd. II, E. Arnold, London.
- Smith J.E., Berry D.R.* (1978), *The Filamentous Fungi. Developmental Mycology*, Bd. III, E. Arnold, London.
- Webster J.* (1980), *Introduction to Fungi*, 2 Aufl., Cambridge University Press, London.

6. Рост микроорганизмов

- Gunsalus I.C., Stanier R.Y.* (Herausgeb.) (1962), *The Bacteria*, Bd. IV, Academic Press, New York, London.
- Ingraham J.L., Maaløe O., Neidhardt F.C.* (1983), *Growth of the Bacterial Cell*, Sinauer Ass. Inc., Sunderland, Mass.
- Malek I., Fencel Z.* (1966), *Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms*, Academic Press, New York, London.
- Mandelstam J., McQuillen K., Dawes J.* (Herausgeb.) (1982), *Biochemistry of Bacterial Growth*, 3 Aufl., Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Schlegel H.G., Kröger E.* (Herausgeb.) (1965), *Anreicherungskultur und*

- Mutantenauslese, Zentralbl. Bakteriol. 1. Abt. Suppl. 1, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Starr M. P., Stolp H., Trüper H. G., Balows A., Schlegel H. G. (Herausgeb.)* (1981), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Stouthamer A. M.* (1977), *Energetic Aspects of the Growth of Microorganisms, in Microbial Energetics* (Haddock B. A., Hamilton W. A., Herausgeb.), Cambridge University Press, London.
- Veldkamp H.* (1976), *Continuous Culture in Microbial Physiology and Ecology*, Meadowfield Press, Durham.
7. Основные механизмы обмена веществ и преобразования энергии
- Gottschalk G.* (1979), *Bacterial Metabolism*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gottschalk G.* (1981), *The Anaerobic Way of Life of Prokaryotes, in the Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* (Starr M. P., et al., Herausgeb.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gunsalus I. C., Stanier R. Y. (Herausgeb.)* (1961, 1962), *The Bacteria*, Bd. II und III, Academic Press, London, New York.
- Ingladew W. J., Poole R. K.* (1984), *The Respiratory Chains of Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.* **48**, 222.
- Jones C. W.* (1982), *Bacterial Respiration and Photosynthesis*, Nelson, Walton-on-Thames.
- Karlsen P.* (1984), *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, 12 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Lehninger A. L.* (1975), *Biochemistry, the Molecular Basis of Cell Structure and Function*, 2 Aufl., Worth, Publ., New York.
- Mahler H. R., Cordes E. H.* (1971), *Biological Chemistry*, 2 Aufl., Harper & Row, New York.
- Morris J. G.* (1974), *A Biologist's Physical Chemistry*, 2 Aufl., Arnold, London.
- Stryer L.* (1981), *Biochemistry*, 2 Aufl., Freeman, San Francisco.
8. Типы брожения
- Casida L. E.* (1968), *Industrial Microbiology*, Wiley, New York.
- Gunsalus I. C., Stanier R. Y. (Herausgeb.)* (1961), *The Bacteria*, Bd. II, Academic Press, New York, London.
- Nelson K. H., Hastings J. W.* (1979), *Bacterial Bioluminescence: its Control and Ecological Significance*, *Microbiol. Rev.* **43**, 496.
- Reed G.* (Herausgeb.) (1982), *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*, The Avi Publ. Comp., Inc., Westpoint.
- Rehm H. J.* (1980), *Industrielle Mikrobiologie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Rehm H. J.* (1971), *Einführung in die industrielle Mikrobiologie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Ziegler M. M., Baldwin T. O.* (1981), *Biochemistry of Bacterial Bioluminescence*, *Curr. Top. Bioenerg.* **12**, 65.
9. Перенос электронов в анаэробных условиях
- Blaut M., Gottschalk G.* (1984), *Coupling of ATP Synthesis and Methane Formation*

- from Methanol and Molecular Hydrogen in Methanosarcina barkeri*, *Eur. J. Biochem.* **141**, 217.
- Iverson W. P.* (1974), *Microbial Corrosion of Iron*, in: *Microbial Iron Metabolism* (Neilands J. B., Herausgeb.), Academic Press, New York, London.
- Postgate J. R.* (1984), *The Sulphate-Reducing Bacteria*, 2 Aufl., Cambridge University Press, London.
- Steiter K. O.* (1984), *New Isolates of Methanogenic Bacteria and Studies of RNA Polymerases and Sulfur Metabolism in Methanogens*, in: *Microbial Growth on C₁ Compounds* (Crawford R. I., Hanson R. S., Herausgeb.), *Am. Soc. Microbiol.*, Washington.
- Thauer R. K., Morris J. G.* (1984), *Metabolism of Chemotrophic Anaerobes: Old Views and New Aspects*, *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **36** (II), 123.
- Thauer R. K., Jungermann K., Decker K.* (1977), *Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria*, *Bacteriol. Rev.* **41**, 100.
10. Неполные окисления
- Corcoran J. W., Hahn F. (Herausgeb.)* (1975), *Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents*, Bd. III, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Foster J. W.* (1949), *Chemical Activities of Fungi*, Academic Press, New York, London.
- Gutcho S. J.* (1973), *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corp., Park Ridge.
- Kieslich K.* (1976), *Microbial Transformations*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Mann J.* (1978), *Secondary Metabolism*, Clarendon Press, Oxford.
- Peppler H. J., Perlman D.* (1979), *Microbial Technology*, Bd. I und II, Academic Press, New York, London.
- Präve P., Faust U., Sukatsch D. A.* (1982), *Handbuch der Biotechnologie*, Akadem. Verlagsges., Wiesbaden.
- Rose A. H. (Herausgeb.)* (1979), *Secondary Products of Metabolism*, Academic Press, New York, London.
- Smith J. E., Berry D. R.* (1975), *The Filamentous Fungi*, *Industrial Mycology*, Bd. I, E. Arnold, London.
- Sutherland I. W.* (1982), *Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides*, *Adv. Microb. Physiol.* **23**, 79.
- Terui G.* (1972), *Fermentation Technology Today*, *Proceed. 4. Int. Fermentation Symposium Kyoto Soc. Ferm. Techn. Japan*.
- Zähner H.* (1965), *Biologie der Antibiotica*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
11. Использование неорганических доноров водорода: аэробные хемолитотрофные бактерии
- Collins V. G.* (1969), *Isolation, Cultivation and Maintenance of Autotrophs*, in: *Methods in Microbiology* (Norris J. R., Ribbons D. W., Herausgeb.), Bd. 3B, Academic Press, New York, London.
- Matin A.* (1978), *Organic Nutrition of Chemolithotrophic Bacteria*, *Annu. Rev. Microbiol.* **32**, 433.
- Postgate J. R.* (1982), *The Sulphate-Reducing Bacteria*, 2 Aufl., Cambridge University Press, London.
- Schlegel H. G.* (1975), *Mechanisms of Chemo-autotrophy*, in: *Marine Ecology, a Comprehensive, Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters*. Bd. II: *Physiological Mechanism*. Part I (Kinne O., Herausgeb.), John Wiley and Sons, New York, London, S. 9-60.

12. Фототрофные бактерии и фотосинтез

- Clayton R. K., Siström W. R. (Herausgeb.) (1978), *The Photosynthetic Bacteria*, Plenum Press, New York.
- Jones C. W. (1982), *Bacterial Respiration and Photosynthesis*, Nelson, Walton-on Thames.
- Jones O. T. G. (1977), Electron Transport and ATP Synthesis in the Photosynthetic Bacteria, in: *Microbial Energetics* (Haddock B. A., Hamilton W. A., Herausgeb.), Cambridge University Press, London.
- Renger G. (1977), Photosynthese, in: *Biophysik – ein Lehrbuch* (Hoppe W., et al., Herausgeb.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Richter G. (1982), *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*, 4 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Witt H. T. (1979), Energy Conversion in the Functional Membrane of Photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 355.

13. Фиксация молекулярного азота

- Bergersen F. J. (1971), Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation in Legumes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 121.
- Hardy R. W. F., Bottomley F., Burns R. C. (Herausgeb.) (1979), *A Treatise on Dinitrogen Fixation*, Wiley, New York.
- Postgate J. R. (1982), *The Fundamentals of Nitrogen Fixation*, Cambridge University Press, London.
- Quispel A. (Herausgeb.) (1974), *The Biology of Nitrogen Fixation*, North-Holland, Amsterdam.
- Schaede R., Meyer F. H. (1962), *Die pflanzlichen Symbiosen*, 3 Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

14. Разложение природных веществ

- Beck T. (1968), *Mikrobiologie des Bodens*, Bayr. Landw. Verlag, München.
- Bonner J., Varner J. E. (Herausgeb.) (1965), *Plant Biochemistry*, Academic Press, New York, London.
- Giesecke D., Henderickx H. K. (Herausgeb.) (1973), *Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung*, BLV Verlagsgesellschaft, München.
- Gray T. R. G., Parkinson (Herausgeb.) (1967), *The Ecology of Soil Bacteria*, Liverpool University Press.
- Hungate R. E. (1966), *The Rumen and Its Microbes*, Academic Press, New York, London.
- McLaren A. G., Peterson G. H. (Herausgeb.) (1967), *Soil Biochemistry*, Arnold, London.
- McLaren A. D., Skujins (Herausgeb.) (1971), *Soil Biochemistry*, Dekker, New York.
- Parkinson D., Waid J. S. (1960), *The Ecology of Soil Fungi*, Liverpool University Press.
- Watkinson R. J. (Herausgeb.) (1978), *Developments in Biodegradation of Hydrocarbons*, Appl. Sci. Publishers, London.

15. Постоянство, изменение и передача признаков

- Bachmann B. J. (1984), Linkage Map of *Escherichia coli* K 12, *Microbiol. Rev.* **47**, 180.
- Birge E. A. (1981), *Bacterial and Bacteriophage Genetics*, an Introduction, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Birge E. A. (1984), *Bakterien- und Phagengenetik, eine Einführung*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Boyer H. W., Nicosia S. (1978), *Genetic Engineering*, Elsevier, Amsterdam, New York.
- Bresch C., Hausmann R. (1972), *Klassische und molekulare Genetik*, 3 Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Glass R. E. (1982), *Gene Function. E. coli and its Heritable Elements*, Croom Helm, London.
- Goodenough U. (1978), *Genetics*, 2 Aufl., Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Kaudewitz F. (1973), *Molekular- und Mikrobengenetik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kaudewitz F. (1983), *Genetik*, Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Knippers R. (1985), *Molekulare Genetik*, 4 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Lewin B. (1974), *Genes*, Wiley & Sons, New York, London. [Имеется русский перевод издания 1983 г.: Льюин Б. Гены. – М.: Мир, 1987.]
- Lewin B. (1974 und 1977), *Gene Expression*, Bd. I: Bacterial Genomes, Bd. III: Plasmids and Phages, Wiley & Sons, New York, London.
- Smith H. O., Danner D. B., Deich R. A. (1981), Genetic Transformation, *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 41.
- Starlinger P., Saeder H. (1976), IS-Elements in Microorganisms, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **75**, 111.
- Stent G. S., Calendar R. (1978), *Molecular Genetics, an Introductory Narrative*, Freeman, San Francisco.
- Watson J. D. (1976), *Molecular Biology of the Gene*, 3 Aufl., Benjamin, New York.
- Winkler U., Rüger W., Wackernagel W. (1972), *Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Winnacker E. L. (1984), *Gene und Klone: eine Einführung in die Gentechnologie*, Verlag Chemie, Weinheim.

16. Регуляция метаболизма

- Beckwith J. R., Zipser D. (Herausgeb.) (1970), *The Lactose Operon*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
- Cohen G. N. (1968), *The Regulation of Cell Metabolism*, Hermann, Paris.
- Englesberg E., Wilcox G. (1974), Regulation: Positive control, *Annu. Rev. Genet.* **8**, 219.
- Jungermann K., Möhler H. (1980), *Biochemie*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Pastan I., Adhy S. (1976), Cyclic AMP in *Escherichia coli*, *Bacteriol. Rev.* **40**, 527.
- Umberger H. E. (1978), Aminoacid Biosynthesis and its Regulation, *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 533.
- Wilson A. C., Pardee A. B. (1964), Comparative Aspects of Metabolic Control, in *Comparative Biochemistry*, Bd. VI (Florkin M., Mason H. S., Herausgeb.), Academic Press, New York, London.

17. Микроорганизмы и окружающая среда

- Alexander M. (1971), *Microbial Ecology*, Wiley, New York.
- Atlas R. M., Bartha R. (1980), *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, Addison-Wisley Publ. Comp., Reading, Mass.
- Brock T. D. (1978), *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Broda E.* (1975), *The Evolution of the Bioenergetic Processes*, Pergamon Press, Oxford, New York.
- Carlile M.J., Skehel J.J.* (1974), *Evolution in the Microbial World*, 24, Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press, London.
- Cavalier-Smith T.* (1981), *The Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell*, Symp. Soc. Gen. Microbiol. 32, 33.
- Ellwood D.C., Hedger J.N., Latham M.J., Lynch J.M., Slater J.H.* (Herausgeb.) (1980), *Contemporary Microbial Ecology*, Academic Press, New York, London.
- Holland H.D., Schidlowski M.* (Herausgeb.) (1982), *Mineral Deposits and the Evolution of the Biosphere. Report of the Dahlem Workshop on Biospheric Evolution and Precambrian Metallogeny*, Berlin 1980, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Kaplan R.W.* (1978), *Der Ursprung des Lebens*, 2 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Kushner D.J.* (Herausgeb.) (1978), *Microbial Life in Extreme Environments*, Academic Press, New York, London.
- Odum E.P.* (1971), *Fundamentals of Ecology*, 3 Aufl., Saunders, Philadelphia.
- Odum E.P.* (1983), *Grundlagen der Ökologie*. Bd. I: Grundlagen. Bd. II: Standorte und Anwendung, 2 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Oparin A.* (1957), *Die Entstehung des Lebens auf die Erde*, 3 Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin.
- Padan E.* (1979), *Impact of Facultatively Anaerobic Photoautotrophic Metabolism on Ecology of Cyanobacteria (Blue-Green Algae)*, *Adv. Microb. Ecol.* 3, 1.
- Riley M., Anilionis A.* (1978), *Evolution of the Bacterial Genome*, *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 519.
- Savage D.C.* (1977), *Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract*, *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 107.
- Schlegel H.G., Jannasch H.W.* (1981), *Prokaryotes and Their Habitats, Isolation and Identification of Bacteria* (Starr M.P., et al., Herausgeb.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Schopf J.W.* (Herausgeb.) (1983), *Earth's Earliest Biosphere, its Origin and Evolution*, Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Shilo M.* (Herausgeb.) (1979), *Strategies of Life in Extreme Environments*, Dahlem Konferenzen, Berlin, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
- Tait R.V.* (1981), *Meeresökologie*, 2 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Tardent P.* (1979), *Meeresbiologie, eine Einführung*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Van den Hoek Ch.* (1978), *Algen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Wartenberg A.* (1979), *Systematik der niederen Pflanzen*, 2 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
18. *Руководства*
- Florkin M., Mason H.S.* (Herausgeb.) (1960–1962), *Comparative Biochemistry*, Bd. I–IV, Academic Press, New York, London.
- Frolkin M., Stotz E.H.* (Herausgeb.) (1962 ff), *Comprehensive Biochemistry*, Bd. I ff, Elsevier, Amsterdam, New York.
- Gunsalus I.C., Stainer R.Y.* (Herausgeb.) (1960–1964, 1978, 1979), *The Bacteria*, Bd. I–VII, Academic Press, New York, London.
- Starr M.P., Stolp H., Trüper H.G., Balows A., Schlegel H.G.* (Herausgeb.) (1981), *The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Bd. I und II, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

19. *История*

- Bolle F.* (1954), *Mensch und Mikrobe*, Safari, Berlin.
- Bullock W.* (1960), *The History of Bacteriology*, Oxford University Press, London.
- De Kruif P.* (1927 und spätere Auflagen), *Mikrobenjäger*, Orell-Füssli, Zürich.
- Dobell C.* (1958), *Antonie van Leeuwenhoek und His Little Animals*, Russel und Russel, New York.
- Freund H., Berg A.* (1963, 1964, 1966), *Geschichte der Mikroskopie*, Bd. I–III, Umschau Verlag, Frankfurt.
- Grainger T.H.* (1958), *A Guide to the History of Bacteriology*, Ronald, New York.
- Kamp A.F., La Rivière J.W.M., Verhoeven W.* (Herausgeb.) (1959), *A.J. Kluyver, His Life and Work*, North-Holland, Amsterdam.
- Lafar F.* (1904–1905), *Handbuch der technischen Mykologie*, Bd. I–V, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Lechevalier H.A., Solotarovsky M.* (1974), *Three Centuries of Microbiology*, Dover Publishers, New York.
- Nicolle J.* (1961), *Louis Pasteur, the Story of His Major Discoveries*, Basic Book, New York.
- Tomsik I.* (1964), *Pasteur und die Generatio spontanea*, Huber, Bern.
- Van Iterson G., Den Dooren De Jong L.E., Kluyver A.J.* (Herausgeb.) (1921–1940), *Verzamelde Geschriften van. M.W. Beijerinck*, Bd. I–VI, Martinus Nijhoff, Delft.
- Waksman S.A.* (1953), *Sergei N. Winogradsky, His Life and Work*, Rutgers University Press, New Brunswick.

20. *Микробиологические методы*

- Bergmeyer H.U.* (Herausgeb.) (1974–1984), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3 Aufl., Bd. I–VI, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.
- Colowick S.P., Kaplan N.O.* (Herausgeb.) (1970 ff.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, London.
- Cohn H.J.* (1957), *Manual of Microbiological Methods*, McGraw-Hill, New York.
- Cowan S.T., Steel K.J.* (1965), *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, London.
- Drews G.* (1983), *Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler*, 4 Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Esser K.* (1976), *Kryptogamen, Praktikum und Lehrbuch*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gerhardt P.* (Herausgeb.) (1981), *Manual of Methods for General Microbiology*, Amer. Soc. for Microbiol., Washington, D.C.
- Gibbs B.M., Shapton D.A.* (Herausgeb.) (1968), *Identification Methods for Microbiologists*, Teil B, Academic Press, New York, London.
- Gibbs B.M., Skinner F.A.* (Herausgeb.) (1966), *Identification Methods for Microbiologists*, Teil A, Academic Press, New York, London.
- Hartman P.A.* (1968), *Miniaturized Microbiological Methods*, Academic Press, New York, London.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.* (1982), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Meynell G.G., Meynell E.* (1970), *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*, Cambridge University Press, London.
- Norris J.R., Ribbons D.W.* (Herausgeb.) (1970 ff), *Methods in Microbiology*, Academic Press, New York, London.
- Primrose S.B., Wardlaw A.C.* (Herausgeb.) (1982), *Sourcebook of Experiments for the*

- Teaching of Microbiology, Academic Press, New York, London.
 Sykes G. (1965), Desinfection and Sterilisation, Spon, London.
 Wallhäuser K. M. (1984), Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Keimidentifizierung, Betriebshygiene, 3 Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Журналы

- Angewandte Chemie
 Annales de L'Institut Pasteur
 Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology and Serology
 Applied Microbiology
 Archives of Microbiology
 Biotechnology and Bioengineering
 Canadian Journal of Microbiology
 Current Microbiology
 European Journal of Applied Microbiology
 Folia microbiologica
 International Journal of Systematic Bacteriology
 Journal of Applied Bacteriology
 Journal of Bacteriology
 Journal of General and Applied Microbiology
 Journal of General Microbiology
 Journal of General Virology
 Journal of Molecular Biology
 Journal of Virology
 Microbiological Reviews
 Микробиология
 Molecular and General Genetics
 Mycologia
 Trends in Biochemistry
 Trends in Microbiology
 Virology
 Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie
 Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde I. II. und III. Abteilung.

Другие периодические издания

- Advances in Applied Microbiology
 Advances in Microbial Ecology
 Advances in Microbial Physiology
 Annual Review of Biochemistry
 Annual Review of Microbiology
 Critical Reviews in Biochemistry
 Critical Reviews in Microbiology
 Current Topics in Cellular Regulation
 Developments in Industrial Microbiology
 Ergebnisse der Biologie
 Fortschritte der Botanik
 Progress in Industrial Microbiology
 Symposia of the Society for General Microbiology

Предметный указатель

- Абквоза 59
 Abortивная трансдукция 466
 Автоклав 208
 Автолиз 79
 Автотрофные бактерии 10, 106, 180, 318, 351
 – организмы 177, 185, 316, 320, 348, 351
 Автотрофы облигатные и факультативные 353
 Автохтонные микроорганизмы 96, 114, 419, 503
 Агар 179, 414
 Агароза 347, 414
 Агаронектин 414
 Агматин 430
 Адаптация 20
 – фенотипическая 440
 Аденилат 290
 Аденилаткиназа 224, 354
 Аденилирование 490
 Адениловая кислота (AMP) 490, 491, 493, 496, 947. *См. также* Аденозинмонофосфат
 Аденин 33–35, 44, 436, 442–444
 Аденовирусы 136, 139, 141
 Аденозин 222
 Аденозиндифосфат (ADP) 222, 223, 269
 Аденозинмонофосфат (AMP) 222–224
 Аденозинтрифосфат (АТФ) 184, 198, 220, 490–497. *См. также* АТРаза; АТФ-синтаза; АТФ-сульфуриллаза
 – как кофермент 223
 – как продукт фотосинтеза 384
 – регенерация 26, 109, 131, 132, 222–224
 – в дыхательной цепи 234, 235, 243–246, 357
 – при брожении 261–266
 Аденозин-5'-фосфосульфат (АФС) 311, 354
 Аденодоксин 237, 238
 Адсорбция 142, 143, 145
 Азахиноны 81, 84
 Азид 186, 401
 Азот 176–178, 331. *См. также* Фиксация азота
 – в гумусе 418
 – в морской воде 17
 Азотистые основания 33, 443
 – спаривание 149, 435
 Азотфиксация *см.* Фиксация азота
 Азотфиксирующие бактерии 104, 105, 513
 – цианобактерии 127, 129, 131–133
 Акинеты 128, 132
 Акониатаза 204, 331
 Аконитат 233, 234
 Аконитатгидратаза 233, 234
 Акразин 161
 Акразиомицеты 158–161
 Акрилиновые красители 459, 452
 Акрилоил-СоА 283
 Акстиль 113, 114
 Активный транспорт 257–260
 Актиномикоз 98
 Актиномицеты 18, 73, 90, 94, 98–101, 261, 335, 343, 405
 – симбиоз с растениями 398
 Актиномицин 206, 342, 343
 Акцепторы водорода (электронов) 178, 220, 248, 265, 304, 385, 387, 391, 392
 – конечные 178, 234
 Аланин 53, 123, 254, 255, 298
 Аланиндегидрогеназа 253
 Алифатические углеводороды *см.* Алканы
 Алкалоиды 172, 345
 Алкан-1-гидроксилаза 424
 Алканоксигеназа 423, 424
 Алканы 238, 422–424
 Алкилбензол 428
 7-Алкилгуанин 444
 Алкилирующие агенты 148, 444
 Алкилфенол 428
 Алкогольдегидрогеназа 221, 267, 272, 327, 424
 Аллели 434
 Аллостерические ферменты 218, 488, 498
 – центры 487
 Аллофиоцианин 129
 Аллохтонные (зимогенные) микроорганизмы 503
 Альгинат 346
 Альдегиддегидрогеназа 424
 Альдегидоксидаза 247

Альдозо-1-фосфат 222
 Альдозы 229, 326, 327, 362
 Аманитоксин 344
 Амебы (слизевиков) 158, 164
 Амид никотиновой кислоты 221
 Амилазы 18, 271, 347, 410, 411
 Амилловый спирт (пентанол) 271
 Амило-1,6-глюкозидаза 411
 Амилодекстриназа 410
 Амилоза 71, 409, 410
 Амилопектин 71, 409
 Аминирование 253, 254, 335
 Аминоацил-АМР 437
 Аминоацил-тРНК 206
 Аминоацил-тРНК-синтетазы 437
n-Аминобензойная кислота 177, 205, 368, 369, 492
 Аминогруппы 177
 Аминокислоты 177, 214–215, 255, 302, 436–439, 485. *См. также* Ароматические аминокислоты
 – биосинтез 253–257
 – дезаминирование 430–431
 – декарбоксилирование 430, 432
 – как факторы роста 273
 – образование 328, 333–335
 – пул 254
 – сбраживание 94, 293, 294
 – семейства 255
 – серусодержащие 17
 – трансаминирование 431
 6-Аминопенициллановая кислота 336, 341
 2-Аминопурин 443, 444
 Аминосахара 60
 Амитал 242
 Аммоний (аммиак) 348, 350, 490
 – как источник азота 178, 306, 480
 – нитрификация 14–15, 254, 349–352
 – образование из нитрата 306, 308
 Аммонификация 308, 430
 Ампициллин 341, 463
 Амфиболизм 214
 Анаболизм 215, 473, 491, 498
 Анаэроботические реакции 216, 234, 248, 252, 333
 Анаэробная пищевая цепь 266
 Анаэробное дыхание 103, 109, 248, 304, 305, 320, 323
 Анаэробные бактерии 69, 265–266, 291, 509
 – симбиоз с аэробными бактериями 512
 – систематика 89–92, 94
 – спорообразующие 103–104
 Аэробы облигатные 178, 309
 – строгие 184, 239, 299, 317, 406–407
 – факультативные 72, 76, 107, 178, 184, 308
 3,6-Ангидрогалактоза 414
 Аноксигенные бактерии 92
 Антагонистический симбиоз 515–516
 Антенны *см.* Светособирающие пигменты
 Антеридии 157, 163, 164, 167
 Антибиотики 98, 336
 – влияние на симбиотическую флору 514, 515
 – на синтез белков 206
 – образование 337–344
 – полипептидные 102, 343
 – промышленное производство 18
 – устойчивость к ним 452, 463–464
 – чувствительность к ним 85, 108
 Антибиотикообразующие организмы (продуценты) 337–338
 Антигены 58, 59, 68, 153, 345
 Антииндуктор 452
 Антикодон 437
 Антиметаболиты 204, 206, 443, 453, 498–500
 Антимидин А 204, 242
 Антимонит 355
 Антипорт 259
 Антисептика 207
 Антоцианы 81
 Антранилат (антраниловая кислота) 428, 476
 Антрацен 427–428
 Апатит 15
 Апорепрессор 481, 484, 485
 Апотеции 168, 172–173
 Арабиногалактан 97
 Арабино-3-гексулозо-6-фосфат 421
 Арабиноза 408, 482–484
 Арабинозный (*ara*) оперон 484
 Аргинин 205, 255, 298, 430, 477–478, 482
 Аргининовый оперон 478
 Ароматические аминокислоты 255, 478, 492
 – углеводороды 424–429
 Ароматическое кольцо 424, 425
 Арсенат 204
 Артробактер 96
 Артроспоры 156, 399
 Археобактерии 53, 88, 90, 91, 108–110
 Асептика 207
 Аск (сумка) 166–167
 Аскогены 167
 Аскокарпы 168
 Аскомицеты (сумчатые грибы) 51, 159, 160, 166–173, 344, 415, 417
 – гомоталлические 167
 L-Аскорбиновая кислота 326

Аскоспоры 166–167, 169, 170, 172
 Аспарагин 255
 Аспарагиновая кислота 255, 431, 492–493
 Аспартаза 431
 Аспараткиназа 492
 Аспартил-4-фосфат 492, 493
 Асфальт 428
 Атмосферный воздух, атмосфера 12–14, 519, 521
 Аттрактанты 68, 69
 Ауксины 513
 Ауксотрофные мутанты 254–257, 334, 447–452, 500
 – организмы 177
 Ауреомицин (хлортетрациклин) 100, 343
 Аутогамия (самооплодотворение) 157
 Аутогенная регуляция 484–485
 Афлатоксины 211, 344
 АФС *см.* Аденозин-5'-фосфосульфат
 АФС-киназа 311
 АФС-редуктаза 311, 354
 Ацетальдегид 221, 232
 – активный (гидроксиэтиламинширофосфат) 288, 336
 – как промежуточный продукт брожения 232, 266, 272, 295, 297, 302
 Ацетальдегиддегидрогеназа 272
 Ацетат (уксусная кислота) 94, 232–234, 296–297
 – и брожение 263, 268, 276, 287, 290, 293–302, 407
 – как источник углерода 250–251, 315
 – образование 107, 321–322
 – разложение в рубце 407
 Ацетаткиназа 223, 264, 277, 288, 300
 2-Ацетилгидроксибутират 479
 N-Ацетилглюкозамин 51–53, 277, 415
 N-Ацетилглюкозаминлактат 51
 N-Ацетилглюкозамин-1-фосфат 55
 6-S-Ацетилдигидролипоат 232
 Ацетилен 401
 Ацелирование 490
 Ацетилкофермент А *см.* Ацетил-СоА
 2-Ацетиллактат 288, 289, 491
 Ацетиллактатдекарбоксилаза 289
 Ацетиллактатсинтаза 288
 Ацетилметилкарбинол 289
 Ацетилмурамидаза 54
 N-Ацетилмурамовая кислота 51–53
 N-Ацетилнейраминавая кислота 138
 Ацетилфосфат 222, 264, 272, 276
 Ацетил-СоА (ацетилкофермент А) 231–232, 256, 264–266, 287, 294–297, 301, 320, 333, 421, 424, 426, 432, 494–496

Ацетил-СоА-дегидрогеназа 424
 Ацетил-СоА-карбоксилаза 496
 Ацетил-СоА-пути 109, 301, 363, 364
 Ацетил-СоА-синтаза 424
 Ацетоацетат 295, 432
 Ацетоацетил-СоА 293, 295, 296
 Ацетогенные бактерии 317, 321–322
 – фиксация CO₂ 364
 Ацетогидроксиизомераза 479
 Ацетогидроксинсинтаза 479
 Ацетон 275, 286, 288–289, 293, 302, 336, 491
 Ацетон 18, 103, 291, 294–296
 Ацетоно-бутиловое брожение 291–300
 Ацидофильные бактерии 355
 СоА-Ацилаза 234
 Ацил-АМР 222
 Аэрация 181–184
 Аэробные бактерии 90, 91
 – окисляющие водород 358–360
 – спорообразующие 102–103
 – кокки 91–94
 Аэробное дыхание 243, 305
 Аэробы облигатные 178
 Аэротаксис 68, 69
 Аэрофильные бактерии 69
 ADP *см.* Аденозиндифосфат
 АМР *см.* Адениловая кислота; Аденозинмонофосфат
 АТР *см.* Аденозинтрифосфат
 АТРаза 245
 АТР-синтаза 26, 46, 109, 223, 235, 243–245, 260
 АТР-сульфуридаза 311
 Базальное тельце (блефаропласт) 27
 Базидии 173–174
 Базидиомицеты 51, 159, 173–175, 344
 Базидиоспоры 173–175
 Бактериальная клетка 28, 29, 40
 – масса 190, 192
 – хромосома 27, 32, 33, 40, 459–462
 – интеграция с фагами 148–151
 Бактериальное ядро 30–42
 Бактерии «лягушачьей икры» 61
 – номенклатура 85–92
 – форма 29–31
 Бактериологический кодекс 85
 Бактериородопсин 394
 Бактериофаги (фаги) 54, 135–137, 142–151. *См. также* Колифаги
 – адсорбция 145
 – в капша-частицах 514
 – как векторы 447
 – лямбда (λ) 139, 144–151, 454, 455,

- 466, 468
 – мутанты 145, 445
 – мио (мутаторы) 447, 455–456
 – специфичность 468
 – умеренные 147–151, 455
 – P1 469
 – P22 143
 – fd 137, 144
 – fr 143, 144
 – M13 137
 – T1 143
 – T2 137, 142–146
 – T3 143
 – T4 137, 143, 146, 445
 – T5 143
 – T6 137, 143
 – T7 144
 – фX174 137
 Бактериофеофитин 391
 Бактериохлорофилл 49, 83, 369, 372, 375–377, 391
 Бактериоцины 464
 Бактерицидные агенты 203, 337
 Бактериоиды 358, 396–398
 Баллистоспоры 175
 Бацитрацин 57, 204, 343
 Белая гниль 416
 Белки 42–43, 58, 206, 215, 293, 317, 429–433
 – биосинтез 435–471, 485
 – в рубце 407
 – в гумусе 418
 – интегральные 45
 – регуляторные 481
 – репрессоры 148, 485
 – трансмембранные см. Порины
 – транспортные 257, 260
 Белок CAP 482–483
 – P870 391
 Бензальдегид 336
 Бензилпенициллин см. Пенициллин G
 Бензоат (бензойная кислота) 313, 425, 426, 428
 Беоциты 127, 132
 Берги руководство 88, 89, 108
 Бесполое размножение 155–157, 164–165
 Бесспоровые бактерии 94
 Бетабактерии 275
 Биливердины (желчные пигменты) 397
 Бинарная номенклатура 86, 158
 Бинарное деление 28, 127, 156
 Биоавтографический метод 333
 Биогаз 321
 Биогенные амины 430
 Биокатализаторы 217
 Биолуминесценция 289–291
 Биомасса 17, 19, 30, 317, 507–508, 523
 Биосфера 13, 501
 Биотехнология 347
 Биотин 177, 282, 289, 334, 369, 432, 496
 Биотиновый локус 150
 Биохимическое единство 214–215
 Биоэлементы 17, 30
 Бисульфид 268
 1,3-Бисфосфоглицерат 225–227, 264
 Бифенил 428
 Бифидобактерии 277–278
 «Бляшки» 135, 147–149
 Бляшкообразующие единицы 146
 Бобовые растения 357–358, 395–398
 Бородавki 136
 Ботулизм 300
 Бродильный метаболизм 291
 Брожение (ферментация) 267. См. также
 Ацетоно-бутиловое брожение;
 Гомоацетатное брожение; Дрожже-
 вое брожение; Маслянокислое бро-
 жение; Молочнокислое брожение;
 Пропионовокислое брожение; Спир-
 товое брожение
 – окислительное (аэробная фермента-
 ция) 325
 Бромная вода 211
 Бромурцил 443, 444
 Бронхопневмония крыс 125
 Бурая гниль 416
 Бутан 422
 2,3-Бутандиол 18, 102, 263, 286–289
 Бутандиолдегидрогеназа 289
 Бутанол 18, 103, 263, 271, 294–296
 n-Бутанол 291
 Бутират (масляная кислота) 103, 107, 263, 291, 293–297, 317, 407
 Бутирил-CoA 294, 295, 297
 Бутирил-CoA-дегидрогеназа 294
 Бутирилфосфат 264
 Вакуоли 22, 73
 – в клетках грибов 155, 169
 – газовые 28, 74, 131, 369, 508
 Вакцины 141
 Валериановая кислота 407
 Валин 255, 283, 298, 343, 442, 478, 479, 491
 – в сивушном масле 271
 Валиномицин 260, 343
 Ванадий 17, 401
 Ванильная кислота 425, 428
 Ванкомицин 57
 Варбург – Диккенс – Хореккера путь
 см. Пентозофосфатный путь
 Вегетативное тело (таллом) 155
 Вейля болезнь 115
 Веретено деления 23, 24
 Вибрионы 29, 30, 110–112
 Вино 271
 Виноградского колонка 382–383
 Виолацелин 82, 84
 Вирионы 134, 136, 138, 141
 Вириоды 154
 Вирулентные фаги 143–147
 Вирус герпеса 136, 141
 – гриппа 136–140
 – желтой лихорадки 137
 – карциномы 137
 – лейкозов 137
 – лесов Семлики 137
 – опоясывающего лишая 137
 – оспы 137, 141
 – папилломы 137
 – парагриппа 137
 – полиомиелита 136, 137, 141
 – полиомы 136, 137
 – полидроза насекомых 136
 – саркомы 137, 153
 – табачной мозаики 135–138
 – энцефалита 137
 – эпидемического паротита 136
 – Эпштейна – Барр (инфекционного
 моноклеоза) 137
 – SV40 137, 139, 141, 153
 Вирусы 134–154
 – бактерий см. Бактериофаги
 – влияние антибиотиков 343
 – онкогенные 439
 – растений 130–135
 Витальные красители 83
 Витамин B₆ 433
 – B₁₂ 369, 382
 Витамины 177, 218, 344–345, 369, 382, 432, 433
 Влагалища 62
 Влажный жар 207–209
 Внутренние мембраны 378
 Внутриклеточные паразиты 92, 122–124. См. также Риккетсии; Плазмидии
 Вода питьевая 285–286
 – потребность микроорганизмов в ней 181
 Водород 94, 241, 287. См. также Акценторы водорода; Доноры водорода
 – концентрация ионов (pH) 179–180
 – образование 380
 – окисление 357–360
 Водородные бактерии см. Водород-
 окисляющие бактерии
 – связи 34–35
 Водородный полуэлемент 241
 Водородоокисляющие (водородные)
 бактерии 105, 358–359
 Водоросли 26, 345, 375, 376, 381, 385, 506, 508
 Воздушная микрофлора 81
 Волютин 73, 110
 Воска 77, 404, 418
 Восковница 398
 Воспаление мозговых оболочек 93
 Восстановительная сила [NAD(P)H₂] 383, 384, 392, 401
 Восстановительные эквиваленты (про-
 тоны, электроны) 235, 264, 301, 352, 356, 384
 Восстановление 220, 361–362
 Восстановленные продукты 263
 Время генерации 191–194
 Вторичные метаболиты 336–337, 344–345, 420
 Высокоэнергетические связи 222, 243
 – фосфаты 269
 Высшие грибы 158, 159
 Выщелачивание металлов 355–356
 Газовая гангрена 299
 – фаза 180
 Газообразующие бактерии 285–286
 Галактоза 50, 59, 131, 273, 408, 414, 474
 – катаболизм 482
 β-Галактозидаза 474–475, 479, 482, 483
 Галактозид-пермеаза 461
 α-D-Галактозид-β-1,4-D-глюкоза 482
 Галактозный (gal) оперон 150, 454, 498
 Галактуроновая кислота 413
 Галоктобактерии 109, 393–394
 Галогены 429
 Галофильные бактерии 109, 181, 505
 Гаметангии 157, 158, 165
 Гаметангиогамия 157, 165, 166
 Гаметы 24–25, 157, 162, 163, 453
 Гамма-лучи 210
 Гаплоидные клетки 24–25, 169–170
 Гардена – Йонга уравнение 267, 270
 Гастеромицеты 159, 174
 Гастронтерит 284
 Гваяцилглицерол-β-конифероловый
 эфир 416
 Гексадекан 423
 1-Гексадеканол (цетиловый спирт) 423
 Гексан 424
 Гекситол 327
 Гексозилтрансфераза 62
 Гексозоизомераза 347
 Гексозокиназа 224, 230, 249
 Гексозомонофосфатный путь 224

Гексозы 45, 216
 – биосинтез 301
 – катаболизм 224–225, 230, 474, 492–494
 Гексоны 140, 141
 Гексулозофосфат-изомеразы 421
 Гексулозофосфат-синтаза 421
 Геминеллы пигменты *см.* Цитохромы
 Гемиллюлоза 292, 408
 Гемоглобин 186
 Ген *hut* 485
 – *src* 154
 Генетическая карта 460–463, 469
 – рекомбинация 24, 453–471
 –– негомологичная 455
 –– сайт-специфическая 150, 151, 154
 Генетический код 435–439
 Генная инженерия 19
 Геномы 40, 77, 522
 Генотип 439, 440, 442
 Гены 434, 443, 447, 455. *См. также*
 Перенос генов
 – регуляторные 455, 481, 483, 484
 – структурные 483, 485
 Геосмин 98
 Гептан 424
 Гептоза 58, 59
 Геранил-гераниол 377
 Гербициды 429
 Гетеробазидиомицеты 159, 174
 Гетеродуплексные молекулы (ДНК)
 41, 455–456
 Гетерокарионы 175
 Гетерополисахаридные цепи 58, 59, 61,
 106
 Гетероталлические грибы 157
 Гетеротрофное питание 10, 359–360
 Гетеротрофные бактерии 180, 185
 –– нитрифицирующие 351
 –– грибы 155
 Гетероферментативное молочнокислое
 брожение 275–278
 Гетероцисты 128, 131–133, 399
 Гидрид-ион 221
 Гидрирование 220
 Гидрогеназы 265, 312, 320, 358–360, 464
 Гидрогениазная система 265
 Гидрокортизон 335
 Гидроксаматы 261
 Гидроксиацил-СоА-дегидрогеназа 424
 Гидроксibenzoат (гидроксibenзойная
 кислота) 425, 428, 476
 β-Гидроксibутрил-СоА 294, 295
 β-Гидроксibутрил-СоА-дегидрогена-
 за 293–295
 2-Гидрокси-4-карбоксимуконной кис-
 лоты полуальдегид 427

3-Гидрокси-3-оксопропанат 251
 Гидроксикислоты 97
 Гидроксиламин 350, 444
 Гидроксиламин-оксидоредуктаза 350
 Гидроксил-СоА-гидро-лиаза 424
 Гидроксилирование 425
 Гидроксил-радикал 247
n-Гидроксимеркурибензоат 204
 3-Гидрокси-3-метилглутарил-СоА 432
 5-Гидрокси-3-метилглутарил 145
 2-Гидроксимуконной кислоты по-
 луальдегид 427
 2-Гидрокси-3-оксопропанат 251
 Гидроксипироват 421
 Гидроксипироватредуктаза 421, 422
 Гидроксиэтилглицерофосфат (ак-
 тивный ацетальдегид) 232, 288, 336
 Гидролазы 413
 Гидролиз 335, 409–411
 Гидротаксис 161
 Гименоцисты 159, 173–175
 Гимза окраска 30–31
 Гиперболические ферменты 486, 487
 Гиоксантии 444
 Гиполимнион 506
 Гипохлорид кальция 211
 Гистадаза 479–480
 Гистидин 255, 293, 481, 482, 485
 Гистоны 25, 522
 Гифы 99–101, 155–157
 Гликоген 28, 71–72, 130, 293, 359, 494,
 496
 Гликогенсинтаза 496
 Гликозидные связи 51, 71
 Гликозиды 222, 345
 Гликолевая кислота 327, 361
 Гликолевый альдегид 327, 362
 Гликолиз (фруктозо-1,6-бисфосфатный
 путь; Эмбдена–Мейергофа–Парна-
 са путь) 215, 224–227, 230
 Гликопротеины 397
 Глина 183
 Глиоксилат 251–253, 421
 Глиоксилат-карболигаза 251, 480
 Глиоксилатный цикл (цикл Кребса–
 Корнберга) 233, 250, 251, 333
 Глицеральдегид-3-фосфат 225, 228, 229,
 269–270, 276–278, 362, 363, 494, 496
 Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа
 221, 226, 361–362
 Глицераткиназа 251
 Глицератный путь 251, 252
 Глицерол 18, 53, 226, 268, 281, 293, 327
 Глицерол-3-фосфат 225–227, 268
 Глицерол-1-фосфатаза 225, 226
 Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа 226,
 227
 Глицин 255, 294, 298, 421, 422

Глутамат (глутаминовая кислота) 18,
 52, 53, 97, 254, 255, 297, 298, 333–334,
 477
 – сбраживание 94
 Глутаматдегидрогеназа 253, 431
 Глутаматсинтаза 253, 402, 490
 Глутаматсинтаза 402
 Глутамин 102, 254, 255, 490
 Глутаминовая кислота *см.* Глутамат
 Глутатионпероксидаза 247
 1,6-α-Глюкоан *см.* Декстран
 α-1,4-Глюкоанфосфориллазы 409
 Глюканы 61, 409–412
 Глюкоамилаза 410
 Глюкозаминдисахарид 59
 Глюкоза 14, 58, 59, 62, 71, 79, 80, 94,
 107, 131, 177, 222–227, 248–249, 293
 – в питательной среде 176
 – как репрессор 483
 – катаболизм 334, 360, 474, 479, 480
 – окисление 326–329, 333
 – роль в катаболитной репрессии 484
 – сбраживание 267, 269
 – химическая структура 408
 UDP-Глюкоза 222
 β-D-Глюкоза 51
 Глюкозидаза 404
 Глюкозилирование 468
 Глюкозодегидрогеназа 327
 Глюкозооксидаза 247, 327, 329
 Глюкозо-1-фосфат 410
 Глюкозо-6-фосфат 224–229, 275, 494
 Глюкозо-6-фосфатаза 226
 Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа
 227–229, 277, 360, 495
 Глюкозофосфат-изомеразы 225, 226
 Глюконат (глюконовая кислота) 104,
 231, 325, 327, 329–330
 Глюконат-дегидратаза 230
 Глюконогенез 248–253, 495
 Глюконовая кислота *см.* Глюконат
 Глюконолактон 329
 Глюконолактоназы 329
 Головневые грибы 174
 Гольджи аппарат 25
 Гомоацетатное брожение 300–301
 Гомобазидиомицеты 159, 174
 Гомологичная рекомбинация 454
 Гомологичные хромосомы 24
 Гомосерин 255, 493
 Гомосеринфосфат 493
 Гомоталлические грибы 157
 Гомоферментативное молочнокислое
 брожение 274–275
 Гонидии 116
 Гонококки 55
 Гонорея 93

Гормогонии 127–128
 Гормоны 470
 Градиент плотности 37–38
 Грамицидин S 343
 Грам-отрицательные бактерии 50–54,
 57–59, 67, 104–107, 112, 343
 – прокариоты, номенклатура 88–91,
 93–94, 127
 Грам-положительные бактерии 50–51,
 53–54, 57–59, 68, 88–95, 101, 176
 Гранитные породы 516
 Гранулоза 71
 Графит 428
 Грибной атропин 344
 Грибы 155–175, 335, 346, 347, 409, 513.
См. также Головневые грибы
 – ассимиляция нитрата 305
 – дробянки 85
 – номенклатура 158, 159
 – образование α-амилазы 411
 –– антибиотиков 337–338
 –– гумуса 418
 –– кислот 328–333
 –– токсинов 344
 – разрушающие лигнин 417
 – роль в разложении белков 430
 ––– целлюлозы 404
 – симбиоз 511–513
 – способность к свечению 291
 Гризеофульвин 339
 Гуаниловая кислота 335
 Гуанин 33, 35, 44, 206, 436, 442, 444
 Гуанозин 493
 Гуминовые кислоты 415
 Гумус 96, 158, 417–418

ДАГФ *см.* 3-Дезокси-D-арабиногепту-
 лозо-6-фосфат
 ДАГФ-синтазы 492
 Двуокись углерода (CO₂) *см.* Углекис-
 лота
 ДДТ *см.* Дихлордифенилтрихлорэтан
 Дегидрирование 220–221, 263
 СО-Дегидрогеназа 300, 321
 НАДН-Дегидрогеназа 241, 242
 Дегидрогеназы 220, 425
 Дезаминирование 298, 335, 430–431
 Дезинфекция 207
 3-Дезокси-D-арабиногептулозо-6-фос-
 фат (ДАГФ) 492
 11-Дезоксикортизол (вещество S Рейх-
 штейна) 335
 Дезоксирибоза 33, 256
 Дезоксирибонуклеаза *см.* ДНКазы
 Дезоксирибонуклеиновая кислота *см.*
 ДНК

Декарбоксилирование 335, 430–432
 Декстран (α -1,6-глюкан) 61, 63, 346, 411, 412
 Декстрановый гель *см.* Сефадекс
 Декстрасахароза 60, 412
 Декстрин 293, 411
 Делецин 443
 Денитрификация 304–309, 324, 510
 Денитрифицирующие бактерии 15, 104, 120, 248, 304–309, 472
 -- накопительная культура 307
 Деполимеразы 60, 413
 Дерматоз 101
 Деструкторы 12
 Десульфатирующие бактерии 309
 Десульфуробидин 312
 Десульфуразы 16
 Диазидифенохиноны 84
 Диазорибофлавиновые производные (F_{420}) 109, 319
 Диалкилглицерол-дифир 108
 Диалкилглицерол-тетрафир 108
 Диаминоасляная кислота 52
мезо-Диаминопимелиновая кислота 52–55, 57, 123, 493
 Диауксия 195–196
 Диацетил 279, 289, 464
 1,2-Дигидродигидроксибензол 425
 Дигидроксиацетонфосфат 225, 226, 362
 Дигидролипоамид-дегидрогеназа 232
 Дигидролипоамид-трансацилазы 232
 С₄-Дикарбоновые кислоты 234, 251
 Дикарион 156, 167
 2,5-Дикетоглюконовая кислота 327
 Диктиосомы 22, 25, 169
 1,10-Диметил-9-декалол 98
 Диметиловый эфир 420
 Диметилсульфат 444
 Диметил-*л*-фенилдиамин (*N,N*-диметил-1,4-диаминобензол) 94
 2,4-Динитрофенол (ДНФ) 204, 269, 270
 Диоксигеназа 425
 Дипколиновая кислота 77, 78, 80, 101, 103
 Диплания 162, 163
 Диплоидные амебы 161
 -- клетки 24
 -- поколения 25
 Диплококки 30
 Дискомицеты 159, 168, 172–173
 Дисульфовиридин 312
 Дифосфат 311
 Дифтерийная палочка 95
 Дифтерийный токсин 108
 Дифтерия 95
 Дифференциальное центрифугирование 23

Диффузионный тест 339, 341
 Дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) 429
 2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота 464
 Дизитлипрокарбонат 210, 211
 ДНК 33–42. *См. также* Репарация ДНК
 -- бактерий 27–28, 30
 -- бактериофагов 32, 33, 41, 145, 150–151
 -- биосинтез (репликация) 36–40, 206, 435, 443
 -- гибридизация 37–38, 41–42, 85
 -- гиперхромный эффект 35
 -- денатурация (плавление) 35, 41
 -- как генетический материал, история вопроса 467
 -- модификация 468–469
 -- шектонемическая двойная спираль 28
 -- химерная 470. *См. также* Гетеродуплексные молекулы (ДНК)
 -- чужеродная 455, 469–470
 -- эволюция 522
 -- экстрахромосомная 27–28, 469
 ДНКаза (дезоксирибонуклеаза) 31, 32, 34
 ДНК-лигаза 39
 ДНК-полимераза 38, 39
 ДНК-содержащие вирусы 136, 137, 151, 153
 ДНФ *см.* 2,4-Динитрофенол
 Доноры водорода (электронов) 184, 185, 220, 379–380, 384–386
 -- неорганические 348–365
 -- углерода 184, 185
 Древесина 14
 Дробянки 85, 127
 Дрожалковые грибы 174
 Дрожжевики 174
 Дрожжевое брожение 18
 Дрожжи 18, 72, 73, 168–171. *См. также* Кормовые дрожжи; Пекарские дрожжи; Пивные дрожжи
 -- использование 270–271
 -- симбионты 524, 515
 Дыхание 20, 182, 185, 258, 304, 305. *См. также* Анаэробное дыхание; Аэробное дыхание; Железное дыхание; Карбонатное дыхание; Фосфорилирование
 Дыхательная цепь 215. *См. также* Электрон-транспортная цепь
 Дыхательные пути 125

Енолаза 226

Жвачные животные *см.* Рубец
 Жгутки бактерий 28, 29, 63–68
 -- амфитрихальное расположение 64, 67
 -- перитрихальное расположение 95, 105, 107
 -- прикрепление к мембране 46
 -- эволюция 522
 -- зооспор 156
 -- зукариотических клеток 27
 Жгутиковые 114
 Желатина 179
 Железное дыхание 305
 Железо 106, 122, 261–262
 -- анаэробная коррозия 313, 314
 -- в морской воде 17
 -- в питательной среде 329–331
 -- восстановление 324, 356
 -- окисление 314, 355–357
 -- отложение 516–517
 -- транспорт ионов 261–262
 Железобактерии 105, 122, 355–357
 Железопирит (FeS_2) 355, 356
 Железопорфириновые соединения 312
 Железо-серные ($Fe-S$) бактерии 26, 45, 236–238, 244, 387, 389
 Желтуха 115
 Желудочно-печеночный цикл 407
 Животные 10
 Жирные кислоты 256–257, 283, 326
 --- биосинтез 256–257, 407, 496
 --- в рубце 407, 408
 --- β -окисление 424
 Жиры и жироподобные вещества 72–73, 256–257, 317. *См. также* Липиды; Нейтральные жиры
 ---- в гумусе 418
 ---- запасные 494–496

Закваски микробные 279
 Замены (пар оснований) 443, 444
 Запасные вещества 30, 70–76, 257
 Зеленые бактерии 75, 315, 366, 372–376, 379, 381
 -- серобактерии 364, 506
 -- растения 10, 12, 274, 360, 392, 403. *См. также* Фиксация азота; Фиксация CO_2 ; Фотосинтез
 Зигмицеты 51, 159
 Зигоспоры 166
 Зигота 25, 171, 453
 Зимогенная флора 419
 Зооксантеллы 514
 Зооспоры 156
 Зоохлореллы 514

Изоаллоказиновая система 236, 237
 Изоамиловый спирт (триметилбутанол) 271
 Изовалерил- CoA 432
 Изогаметы 157
 Изолейцин 271, 283, 298, 478, 479, 491–493
 -- в сивушном масле 271
 Изониазид 98
 Изопrenoиды 108
 Изорениератин 377
 Изофункциональные ферменты 491
 Изоцитрат 234, 251, 364, 494
 Изоцитратдегидрогеназа 233, 234
 Изоцитрат-лиаза 233, 250, 251, 421, 422, 480
 Икосаздр 140–141
 Ил 107, 114
 -- активный 321, 509
 Иммуитет 148
 Инвертаза 347
 Ингибирование конечным продуктом 473–474
 Индигоидин 84
 Индикаторные бактерии 338
 Индол 286
 Индуктор 481
 Индукция фага λ 148–150
 -- ферментов 473–476, 482–483
 Инозин 493
 Инозиновая кислота 335
 Инсектициды 429
 Инсерционные мутанты 443, 447, 470
 -- (вставочные) последовательности 455–456
 λ -Интеграза 151, 454
 Интеграция 148–151, 454–455, 459
 -- вируса 154
 Интеркаляция 444
 Инулин 293, 412
 Инфекционные нити 397
 Инфузории 514
 Иодинин 82, 84
 Ионизирующая радиация 445
 Ионофоры 260, 343
 Истинные слизевики *см.* Миксомицеты
 Итаконовая кислота 331–332
 Кадаверин 430
 Кал 107
 Калий 17
 Кальций, ионы 54
 Каменный уголь 403, 419, 501
 Канаванин 205
 Канамицин 451, 455, 463
 Каппа-частицы 514
 Капронат 263, 293

- Капсид 134, 136, 137, 140
 Капсомеры 136, 138, 140, 141
 Капсулы (бактерий) 28, 60, 61
 Карбамоилфосфат 364
 Карбенициллин 341
 Карбоксибиотин 364
 Карбоксидобактерин 260
 Карбоксилирование 249, 321, 361–364
 3-Карбоксимуконат-циклоизомеразы 427
 3-Карбокси-*цис, цис*-муконовая кислота 426
 4-Карбоксимуконolakтон 427
 4-Карбоксимуконolakтон-декарбоксилаза 427
 Карбоксисомы 28, 75–76, 131
 Карбомицин А 343
 Карбонат 304, 316–321
 – кальция 180, 517
 Карбонатное дыхание 304, 305, 318, 322
 Кариес 62
 Кариогамия 156, 157, 166, 169, 170, 173, 175
 β-Каротин 129, 377
 γ-Каротин 377
 Каротиноиды 49, 81–83, 129, 302, 375, 377–378, 385, 391, 433, 496
 – получение 345
 Картофель 135
 Катаболизм 214, 476, 491. *См. также*
 Катаболическая репрессия; Ферменты
 – углеводов 215–216
 Катаболическая репрессия 253, 405, 473, 474, 478–480
 Каталлаза 247, 281, 283, 329
 Каучук 419
 Квашеная капуста 278
 Кельвина–Бассамы цикл. *см.* Рибулозобисфосфатный цикл
 Кетоглюконат 327
 2-Кето-3-дезоксигалактоновая кислота 60
 2-Кето-3-дезоксиглюконат 231
 2-Кето-3-деоксиоктоновая кислота (КДО) 58, 59
 2-Кето-3-деокси-6-фосфоглюконат (КДФГ) 229, 230
 2-Кето-3-деокси-6-фосфоглюконатный путь (Энтнера–Дудорова путь; КДФГ-путь) 104, 215, 224, 226, 229–231, 272, 380, 495
 Кетозы 327
 Кетоны 326
 Кинуренин 476
 Кислое тесто 190
 Кислород в атмосфере 516, 519, 521

- в клубеньках 397
 – в озерах 506
 – потребление 509
 – токсичность 246–247
 Кислотообразующие бактерии 278–280, 283–285, 325–327
 – грибы 328–333
 Кислотоустойчивые бактерии 97, 129, 179, 274, 325
 – грибы 179
 Кистевидная плесень 171
 Китайская тушь 60, 61
 Кишечная флора 107, 274, 283–289, 513–515
 -- насекомых 514, 515
 -- жвачных 513. *См. также* Рубец
 -- человека 274, 277–278
 Кишечник 514–515
 Классификация организмов 86–87
 Клейстотеции 168, 171
 Клетки 22–84
 – повреждение 204
 – спирохет 113
 – цианобактерий 129
 Nfr-Клетки 457–458
 Клеточная стенка 28, 29, 47–60, 85, 155, 206–207, 317
 -- при спорообразовании 80
 -- у архебактерий 108
 Клеточное деление 203
 – ядро 22–25
 Клеши 123
 Клонирование (клоны, чистые культуры) 439, 449, 457
 – молекулярное 469–471
 Клопы 514
 Клостридии 71, 76, 103–104, 291–300, 302, 404
 – и брожение 265, 266, 272
 – сахаролитические 411
 Клубеньковые бактерии 395–398
 Кобальт 400
 Кодон 436
 Кожистая пленка 62
 Кожная флора 515
 Кокки 89, 92–94, 101–104
 – брожение 275
 Колистин 204, 451
 Колитоза 59
 Колифаги 137, 142–144
 Колиформные бактерии 107
 Колицины 464
 Колонии бактерий, строение 62, 106
 Кометаболизм 429
 Комменсализм 190, 512
 Компартиментализация 25, 27
 Компетенция 467–468
 Компост 510
 Кональбумин 262
 Конго красный 60
 Конидии 101, 167, 172. *См. также*
 Баллистоспоры
 Конидиоспоры 156
 Кониферилловый спирт 415, 416
 Конкуреентное ингибирование 204–205
 Консервирование 80, 209, 211–212
 Константа скорости деления 191
 Конститутивные гены 473
 – ферменты 452, 472, 498–500
 Консументы 12
 Контаминация 207
 Коньюгация 454, 456–462
 Кооперативные взаимодействия 487–489
 Копроген 165
 Копротилы 172
 Копуляция 169, 170
 Коринебактерии 60, 95–96
 Коринеформные бактерии 30, 90, 91, 95–97, 281, 405
 Кормовые дрожжи 271
 Корневые волоски 396–397
 – клубеньки 395–398
 Корриноиды 345
 Кортизон 335
 Корь 135
 Косубстрат 429
 Кофермент А (CoA; CoA-SH) 218, 219, 232, 234, 282
 -- химическая структура 219
 – В₁₂ (цианкобаламин) 218, 282, 283, 297, 301, 400
 – М (меркаптоэтанол) 109, 319
 Коферменты 218–220
 Крахмал 71, 292, 293, 494, 496
 – в рубце 407
 – осахаривание 271, 347, 411
 Креатинфосфат 222
 Кремнезем 516
 Кремний 17
 Криофильные бактерии 181
 Кроссинговер 24
 Кротоноаза 294, 295
 Кротонил-CoA 294, 295
 Крысы 123
 Крючок 167
 Ксантаны 345–346
 Ксантин 293, 444
 Ксантиноксидаза 247
 Ксантомонады 105
 Ксенобиотики 429
 Ксилан 299, 405, 407–409
 Ксиланаза 429
 Ксилоза 131, 327, 408

- Ксилоновая кислота 327
 Ксилулозо-монофосфатный цикл 422
 Ксилулозо-5-фосфат 228, 264, 272, 275, 277, 362, 484
 Кукурузный настой 179
 Культивирование микроорганизмов 21
 -- элективные методы 185–190
 Кумаровый спирт 416
 Курдланы 346
 Куропаточья трава 398
 Лабораторная посуда 183
 Лакказы 247
 Лактат (молочная кислота) 94, 107, 249, 261, 276, 296, 325, 326, 407
 – получение и применение 280, 288
 Лактатдегидрогеназа 220, 221, 275, 282
 Лактатрацемазы 275
 Лактил-CoA 283
 Лактобациллы 107, 179, 180
 Лактоза 94, 273, 286, 474, 475, 482–484
 Лактозный (*lac*) оперон 482, 483
 Лактоназа 228
 Лактотрансферрин 262
 Ламеллы 28, 46–49
 Лаурилсульфат 32
 Левансахараза 412
 Леваны 63, 412
 Левомецетин 206
 Леглемоглобин 397, 398
 Леичная плесень 171
 Лейцин 252, 298, 432, 449, 478, 479
 – в сивушном масле 271
 Лектины 397
 Лептоспирозы 114
 Лесные грибы 173
 Лигаза 150
 Лигнин 415–418, 428
 Лигнопротеин 418
 Лизин 52, 53, 56, 220, 255, 430, 492, 493
 Лизогеия 147–151
 Лизогенные бактерии 95, 147
 Лизоцим 32, 44, 52, 54, 93, 146
 – чувствительность к нему 122
 Ликопин 377
 Лимнология 505
 Лимонная кислота (цитрат) 18, 180, 232–234, 250, 325, 330–331, 333, 421.
См. также Цикл трикарбоновых кислот
 -- использование для анализа воды 286
 Лимфогранулома 123
 Лиофилизация 80
 Липаза 347
 Липид А 59

- Липиды 30, 44, 45, 54, 57, 58, 73, 256
 Липосевая кислота (липоат) 218, 219, 232, 234
 Липополисахаридные токсины 284
 Липополисахариды 54, 57–59, 73, 85
 Липопротеины 54, 57, 58, 73, 145
 Липофильные красители 72
 Литический цикл 143–147, 149
 Литотрофные организмы 185
 Лихорадка 123
 Лишайники 129, 400, 514
 Лох 398
 Лучистый грибок 98
 Люцифераза 290
 Люцеферин 290
- Магнетит** (ферромагнитная окись железа) 70
Магнитосомы 70
Магнитотаксис 68, 70
Макролиды 343
Макромолекулы 214
Малат (яблочная кислота) 233, 250, 252, 282, 328, 332, 333, 421
 – как добавка к питательной среде 310
 – роль в фиксации CO₂ 364
Малатдегидрогеназа 220, 233, 234, 250, 251, 282
Малатсинтаза 233, 251, 480
Малаттхиокиназа 421, 422
Малил-СоА 421
Малил-СоА-лиаза 421, 422
Малонат 204–206
Малонил-СоА 257, 364, 496
Малоновая кислота 205
Мальтаза 411
Мальтоза 271, 410, 411
Мальтозный оперон 484
Маннаны 413
Маннитол 53, 276, 293, 327
Манноза 59, 131, 408
Марганец 330, 356
Масляная кислота см. Бутират
Маслянокислое брожение 263, 283–289, 291–300
Матричные РНК (мРНК) 42, 435, 437
Мегациты 464
Медвяная роса 171, 172
Мель 329, 331, 355
Мезаконовая (метилмурамовая) кислота 297
Мезосомы 28, 46
Мезофильные бактерии 181
Мейоз (редукционное деление) 24–25, 166, 169, 173, 175, 453
 – у грибов 157, 162
- эволюция 522
Меланины 399
Мембранные белки 257
 – паразиты 125
 – пузырьки 243, 244, 385, 392
Мембраны 42–44. *См. также* Плазматическая мембрана
 – внутриклеточные 27, 46–49. *См. также* Тилакоиды
 – роль в дыхательной цепи 236, 242
Менингококки 55
Месельсона–Сталл эксперимент 37, 38
Местообитание микроорганизмов 502–503
Метаболизм (обмен веществ) 20, 214, 215, 520
Метаболиты 220, 223
 – вторичные 84, 336–337
 – выход из клетки 261, 499
Метаболические пути 214, 215
Метан 13, 407, 420–422, 523
 – образование 316–321
 – в донных осадках 506, 507
 – в очистных сооружениях 510
 – роль в синтезе органических молекул 518
Метанобразующие бактерии 91, 108–110, 248, 266, 301, 305, 316–321
 – местообитание 503
 – фиксация азота 399
 – CO₂ 364
Метанокисляющие бактерии 420–422
Метаноксигеназа 420
Метанол 317, 320, 420, 421
Метанолдегидрогеназа 422
Метанопртерин 109, 319
Метанофуран 319
Метантенк 509
Меташирокатахеаза (катехол-2,3-диоксигеназа) 427
Мегафосфаты 73–74
Метахромазия 73–74
Метгемоглобин 308–309
Метиламин 317
Метиласпарагиновая кислота (метиласпарат) 297, 298
Метилглиоксаль 268
3-Метилглутаконил-СоА 364, 432
Метиленовый синий 74, 84
Метилирование 335, 468
Метилкофермент 319
3-Метилкротонил-СоА 432
2-Метилмалат 298
Метилмалонил-СоА 283, 364
Метилмалонил-СоА-карбокситрансфераза 280
Метилмалонил-СоА-мутаза 282, 400
- Метилмалонил-СоА-путь** 281–283
Метилметансульфонат 444
Метил-N'-нитро-N'-нитрозогуанин 444
Метиловый красный 286
Метилотрофные организмы 399, 420
2-Метилпропанол 271
Метилредуктаза 319
N⁵-Метилтетрагидрофолиевая кислота 301
2-Метилфумарат 298
Метионин 252, 298, 492, 493
Метициллин 341
Метоксантин (пирролохинолинон) 327, 422
Мигрень 345
Микобактерии 73, 97–99, 261, 422, 515
Микобионты 512, 514
Миколовые кислоты 97
Микориза 513
Микотоксин 211, 344
Микроаэротолерантные бактерии 92, 93
Микроаэрофильные бактерии 95, 178
Микробиологические производства см. Промышленная микробиология
Микрококки 27, 30
Микроорганизмы на службе человека 17–19
 – общие свойства 19–21
 – роль в круговороте веществ 12–17
 – численность и разнообразие в экосистемах 504
Микроспоры 119
Микротрубочки 22
Микрофлора кишечника 114. *См. также* Рубец
 – почва 417–419
Микроциты 118, 399
Микроэлементы 176, 400–401
Миксобактерии 116–120, 404
Миксоциты 161
Миксомицеты (истинные слизевики) 158–162
Микоспоры 80–81, 118–119
Миксотрофное питание 359–360
Миксофлагелляты («бродажки») 161
Миנדальная кислота 425, 428, 476
Минерализация 12–14, 213, 308, 316, 517. *См. также* Аммонификация
Минеральное питание 176–177
Митоз 23–24, 522
Митомицин С 148, 206, 462
Митохондрияльные мембраны 235, 236, 243, 244
Митохондрии 22, 25–26, 43, 88, 206, 242
 – дрожжей 169
 – эволюция 522
- Михаэлиса–Ментен** константа 486
Мицелиальные грибы 18
Мицелий 94, 98–101, 155, 164, 165
Мицетома 515
Многоатомные спирты 302
Многоядерные бактерии 448–449
Молибден 176, 400
Моллюски 114
Молоко 274, 280
Молочная кислота 62, 280, 287, 325, 326, 407. *См. также* Лактат
 – сыворотка 179
Молочнокислое брожение 263, 272–280
Молочнокислые бактерии 18, 60, 94, 272–280
 – продукты 274, 278–280
Молочный сахар см. Лактоза
Молчащие мутации 442
Мономорфизм 439
Моноксигеназа 291, 424
Морская вода 17
Морские бактерии 181, 289
Мочевая кислота 103, 293
Мочевина 103, 407, 431
цис,цис-Муконовая кислота 426, 427
Муконолактон 427
Мукопротеины 138
Мукоровые плесени 164
Мультивалентная репрессия 480
Мультиферментный комплекс 232, 320
Муравьинокислое брожение 232, 283–300
Мураמידаза 52
Мурамовая кислота 51, 55, 122, 123
Мурейн 29, 51–55, 58, 97
Мурейновый мешок 52–53
Мурозидопептидаза 52, 55
Мускарин 344
Мутагены 443
Мутации (мутанты) 434, 439–474, 497–500
 – двойные 445, 456
 – индуцированные 441, 443–447
 – конститутивные 452–453, 498–500
 – летальные 147, 445
 – отбор 440–441, 449–453
 – продукция антибиотиков 344
 – с биохимическим дефектом 449–453, 456–457
 – с нарушенной регуляцией 497–502
 – со сдвигом рамки 445
 – спонтанные 441–443
 – типы 498–499
 – устойчивости к антиметаболитам и др. 450–451, 498–499
 – чувствительности к температуре (условно летальные) 451, 452

- Мутуалистический симбиоз 190, 501, 511–515
 Мучнистая роса 171
 Мхи 25
 Мясной экстракт 179
 Мясные продукты 212
- Навоз 95, 116, 164, 165, 179, 321
 Накопительные культуры 21, 93, 185–188, 382–383
 Наружная мембрана 57–60
 Насекомые 75, 513–515
 – переносчики 126, 134–135, 172
 Натрий-калиевый насос 260
 Нафталин 427–428, 464
 Нафтохинон 238
 Нейраминидаза 138, 140
 Нейтрализма гипотеза 511
 Нейтральные жиры (триглицериды) 44, 73, 256
 Нектар 170
 Нематоциды 429
 Ненасыщенные жирные кислоты 256
 Неоминин 206, 463
 Неорганический фосфат (P_i) 269
 Непермиссивные клетки 153
 Неперсистентные вирусы 135
 Непрерывная культура 199–203
 Несовершенное плононошение см. Ко-видии
 Несовершенные грибы (дейтеромицеты) 159, 175
 Несовместимость 158, 464
 Неспецифическая (общая) трансдукция 464–466
 Неспорообразующие бактерии 299
 Нефть 419
 – загрязнение среды 428–429
 Нефтяные отстойники 186
 Нигеран 412
 Нигрозин 60
 Низшие грибы 158, 159
 Никельтетрапиррольный фактор F₄₃₀ 319
 Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) 218, 220, 221, 241
 – восстановленный (NADH₂) 221, 364, 369
 – окисление 235, 244, 245
 Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP) 220, 221, 241
 Никотиновая кислота 177, 369
 Нитрат 177, 304–309, 330, 331, 349
 Нитратное дыхание 15, 104, 304–309
 Нитратредуктаза 305–306, 324
 Нитратредукция (восстановление нитрата) 15, 185, 248, 254, 304–309, 349–351, 357
 – ассимиляционная 15, 304
 – в гиподимнионе 507
 – диссимиляционная 304
 Нитрит 305–306, 308, 349–352. См. также Нитрифицирующие бактерии
 – как мутаген 444
 Нитритобразующие бактерии 47
 Нитритредуктаза 305, 306
 Нитрифицирующие бактерии 14–15, 349–352, 504, 523
 Нитрогеназа 131–133, 358, 380, 398–402
 Нитрогруппы 429
 Нитчатые (нитевидные) бактерии 106, 116, 310, 374
 Новоблоцин 451
 Нокардии 73, 98, 99
 Нуклеазы 60
 Нуклеиновые кислоты 256. См. также ДНК; РНК
 – биосинтез 206, 228, 229
 Нуклеоид 28, 29, 31
 Нуклеокапсид 134, 136–139
 Нуклеоплазма 31
 Нуклеосомы 25
 Нуклеотидредуктаза 400
 Нуклеотиды 256, 485
 Нумерическая таксономия 87
- Облегченная диффузия 257, 258
 Облепиха 398
 Облигатно-паразитические бактерии 92, 122–124
 Облучение 209–212. См. также Ультрафиолетовое облучение
 Обрастание 183
 Обратная транскриптаза 153–154, 439
 Обратные мутации 442–443
 Озера 266, 505–509
 Оказки фрагменты 38
 Океан 13–14, 504–505
 Океон 377
 Окисление 220
 – и восстановление, сопряженная реакция 298
 – конечное 234
 – неполное 325–347
 – полное 325
 Окислительно-восстановительные катализаторы 239
 Окислительно-восстановительный потенциал 237–242, 312, 322, 324, 351, 385–387, 391
 Окислительное фосфорилирование 305, 322, 357, 519

- в анаэробных условиях 357
 – в дыхательной цепи (сопряженное с транспортом электронов) 45, 204, 215, 220, 222, 234–248, 312–313, 492–494
 – механизм 235–236
 – нарушение 269
 Окись углерода (CO) 14, 238, 242, 301, 316, 321
 – окисление 358, 360
 – подавление дыхания 204
 – этилена (этиленоксид) 210
 Окрашивание по Граму 50–51, 85, 88–89, 359
 Окружающая среда 502
 Оксалоацетат 232–234, 248–252, 254, 332, 421
 – и фиксация CO₂ 364
 Оксалоацетатгидролаза 332
 Оксалоацетатдекарбоксилаза 250
 Оксалосукцинат 233, 234
 Оксаминин 56
 3-Оксиадионат-еноллактон 427
 3-Оксиадионат-еноллактонгидролаза 427
 Оксигеназы 303, 335
 Оксигенные фототрофные бактерии 92
 Оксидазная реакция 93, 94
 H₂: NAD-Оксидоредуктаза 359
 Оксизокапроновая кислота 432
 Окситетрациклин (тетрациклин) 343
 Оксихлорофитин 84
 3-Оксодипонат-сукцинил-СоА-трансфераза 427
 3-Оксодипил-СоА 427
 3-Оксодипил-СоА-тиолаза 427
 3-Оксодипиновая кислота 426, 427
 2-Оксобутират 491, 493
 2-Оксоглутарат 233, 243, 254, 332, 334, 364, 431, 490
 2-Оксоглутаратдегидрогеназа 234, 334, 357, 480, 495
 2-Оксоглюконовая кислота 104
 2-Оксозокапроновая кислота 432
 Октадр 143
 Олигопептиды 429, 430
 Оляха 398
 Онкогенез 151–154
 Онкогены 153, 439
 Оогонии 157, 163
 Оомицеты 159, 162–164, 166
 Ооспоры 164
 Оосферы 163
 Оператор 481
 Оперон(ы) 481–485
 – ara см. Арабинозный оперон
 – hut 485

- lac см. Лактозный оперон
 – trp см. Триптофановый оперон
 Опоясывающий лишай 137, 141
 Опухоли растений 105, 152–153
 Органические кислоты 302, 312, 325, 327–335, 345, 380, 420
 Органотрофные организмы 185
 Орнитин 52, 255, 430, 477
 Орнитин : карбомил-трансфераза (ОКТаза) 477
 Орнитозы 123
 Ортофосфорная кислота (H₃PO₄) 15
 Осморегуляция 50, 60
 Осмотическое давление 181
 Осмотолерантность 181
 Оспа 137, 141
 Отпечатков метод 333
 Охровые бактерии 106
- Палиндром 469
 Палочки 29–30, 90–91, 94–95, 101–104, 107
 – грам-отрицательные и грам-положительные 90, 94–95
 – изогнутые 91
 – типы брожения 275
 Пальмитат (пальмитиновая кислота) 423
 Пальмитил-СоА 257
 Пальмитиновый альдегид 423
 Пантотенат 177
 Папаин 346
 Папоротники 25
 Паразитические бактерии 110–112, 122, 124–125, 171, 515
 Парасексуальность 175, 453
 Парафизы 171, 173, 174
 Парафины 98, 419, 423, 424
 Пастера эффект 227, 267, 268, 492–495
 Пастеризация 207, 209
 Патока 179
 Пекарские дрожжи 20, 169, 270
 Пектин 293, 404, 413
 Пектиназы 18, 347
 Пектинэстераза 413
 Пектолитические ферменты 413
 Пенциллин 18, 54–57, 171, 336, 341, 455, 464
 – подавление синтеза пептидогликанов 206
 – применение для отбора ауко-трофных клеток 186
 – чувствительность к нему 93, 123, 126, 450–452
 – G (бензилпенициллин) 336, 339, 341
 Пенциллиназа 341, 451, 464

- Пентаглицин 53
 Пентапептид 56
 Пентитол 327
 Пентозофосфат 272, 363, 421, 422
 Пентозофосфат-изомеразы 228, 421
 Пентозофосфаткетоплаза 275
 Пентозофосфатный (Варбурга-Диккенса-Хореккера) путь 224, 226-229, 272, 275, 363
 Пентозы 302
 Пентоны 140, 141
 Пепсин 32, 346, 429
 Пептидаза 430
 Пептидилтрансфераза 206
 Пептидогликаны 29, 51, 53, 55, 77, 85, 133, 206
 Пептолитические клостридии 103
 Пептон 179, 429-430
 Переваривание 515. *См. также* Кишечная флора; Рубец
 Перевиваемые культуры 184
 Перекись водорода 247
 Перенос генов 459-462
 - групп 222
 Периодий 162
 Периодическая культура 194-197, 203
 Периплазматическое пространство 58, 60
 Перитеций 168, 171-172
 Перколятор 182
 Пермеаза 257, 258, 261, 411, 482, 483
 Пермиссивные клетки 153
 Пероксид, ион (O_2^-) 247
 Пероксидаза 247
 Пецица 172
 Печеночники 399
 Пивное сусло 179
 Пивные дрожжи 169, 270-271
 Пигменты 81-84
 - как результат симбиоза 397
 - фотосинтеза 375-378, 385-389. *См. также* Бактериохлорофилл; Каротиноиды; Меланины; Светособирающие пигменты
 Пиерицидин 242
 Пикомицин 343
 Пикорнавирусы 137
 Пили 28, 68-69, 458
 Пинорезинол 416
 Пиноцитоз 26, 135
 Пиоцианин 82, 84, 104
 Пиоцины 464
 Пиразиновый пигмент 83
 Пиреномицеты 159, 168, 171-172
 Пиридин-2,6-дикарбоновая кислота *см.* Диникотиновая кислота
 Пиридиннуклеотиды 220-221, 246, 351
 - восстановленные 246, 383, 391
 Пиридоксальфосфат 432, 433
 Пиридоксамин 177
 Пиримидины 33, 34, 177, 214, 292, 302
 Пировиноградная кислота *см.* Пируват
орто-Пирокатехазы (катехол-1,2-дезоксигеназа) 426, 427
 Пирокатехин (катехол) 425-428, 476
 Пирофосфат 223
 Пирофосфорилаза 496
 Пирролохинолинхинон *см.* Метоксантин
 Пирролы 81
 Пируват 60, 225, 249-250, 254, 260, 421, 478, 479
 - дегидрирование 231-232
 - окисление 229-232
 - сбраживание 249-251, 267, 293, 297-298
 Пируватдегидрогеназа 231, 232, 495
 Пируваткарбоксилаза 232, 249, 250, 267
 Пируваткиназа 223, 226, 249, 264
 Пируват, ортофосфат-киназа 250
 Пируватсинтаза 321
 Пируват : ферредоксин-оксидоредуктаза 232, 265, 295, 300
 Пируват : формиат-лиаза 232, 265, 287
 Питание микроорганизмов 176-212
 - типы 184
 Питательные среды 21, 176-180
 Питьевая вода 308
 Пищевые цепи 266, 317
 Плаучесть 75
 Плазматическая мембрана 44-46, 58, 73. *См. также* Наружная мембрана
 -- архебактерий 108
 -- галобактерий 394
 -- локализация пигментов 372-373, 378
 -- прикрепление жгутика 67
 -- роль в окислительном фосфорилировании 235, 236
 --- в транспорте веществ 257
 --- «тени» 54
 Тi-Плазмида 152-153
 Плазмиды 28, 41-42, 151-154, 402, 455, 469-470
 - опухолеродные 151-152
 Плазмагамия 156, 157, 160, 167, 173, 175
 Плазмодии 160, 161
 Плазмодиз 29, 50
 Планогаметы 157
 Пластмассы 429
 Пластохинон 238, 387-389
 Пластоцианин 388, 389
 Плеврокапсовые цианобактерии 127
 Плектенхима 155
 Плектоницеты 168, 171
 Плеоморфизм 96, 439
 Плодовые тела 118, 161
 Пневмококки 55, 60
 Поверхностно-активные вещества 211
 Повлика 134
 Подвижность бактерий 63, 64
 Подвижные элементы (Is, Tn) 447, 455
 Полиароматические соединения 427-428
 Полигалактуроновая кислота 413
 Поли- β -гидроксимасляная кислота 28, 70-73, 130, 359, 380
 Полиглутаминовая кислота 60
 Полиизопреноиды 302
 Полимеры 30, 214
 Полимиксин 204, 343
 Полинуклеотид-лигаза 150
 Полинуклеотиды 44, 214
 Полипептиды 42, 43, 429, 430, 436-438
 Полиплоидные расы 169
 Полипрониллен 429
 Полисахаридные гранулы 48
 Полисахариды 30, 61, 63, 71-72, 302, 317, 345, 397. *См. также* Экзополисахариды
 - в рубце 407
 - как запасные вещества 380
 - капсульные 60
 - синтез 496
 Полисомы (полирибосомы) 43, 437
 Полифосфаты 28, 30, 70-71, 73-74
 - в дрожжах 169
 - в цианобактериях 130
 - как запасные вещества 380
 Полифруктозы 62
 Полиэдрические вирусы 136, 137, 140-141
 Полиэтилен 429
 Полиэтиленгликоль 471
 Половое размножение 156-158
 Полукопсервативный механизм 37-40
 Порины 58-60
 Порфирины 273, 302
 Последовательная модель 488, 499
 Постековые бактерии 120-122
 Почкование 29
 - у бактерий 91, 120-122, 372
 - у грибов 155, 164, 169, 170, 177
 - у цианобактерий 127
 Премутационные изменения 447
 Проактиномицеты 98
 Прогеноты 88
 Продигиозин 82-84
 Прокариотическая клетка (протоцит) 23, 27-84
 Прокариоты 11-12, 85-133
 - номенклатура 85-89
 - эволюция 519-521
 Пролин 255, 298
 Промежуточный обмен (амфиболизм) 214, 473
 - продукт 473
 Промотор 481, 482, 484
 Промышленная микробиология 18-19
 Пропан 422
 Пропанол 18, 103, 271, 294-296
 2-Пролил- β -тиогаляктозид 474
 β -Пропиолактон 210
 Пропионат (пропионовая кислота) 94, 263, 280-283, 293, 309, 317, 323-324, 407
 - как конечный продукт темного метаболизма 380
 Пропионил-CoA 282
 Пропионовая кислота *см.* Пропионат
 Пропионовокислое брожение 263, 280-283
 Пропионовые бактерии 97, 280-283, 515
 Простая диффузия 257, 258
 Простейшие 513-514
 Протестические группы 109, 218, 219, 397
 Протеазы 346, 429
 Протеиназы 18, 60
 Протеолиз 15
 Протеолитические ферменты 430
 Протисты 10-11
 Протоаскомицеты 159, 168
 Протогем 103, 397
 Протокатехины 425-428
 Протокатехоат-3,4-дезоксигеназа 426, 427
 Протокатеховая кислота 425
 Протоксин 75
 Протонный градиент 389-392, 394
 - насос 235, 245, 320, 390, 392
 - потенциал 243-245, 259-260, 320, 390, 394
 Протонодвижущая сила 244
 Протоны, транспорт 235, 236, 243-245, 392
 Протоплазма 155
 Протопласты 23, 27, 50-51, 54, 77, 471
 - микоплазм 124, 126
 - слияние 165
 Прототрофные организмы 177, 449, 456
 Протохлорофиты 133

- Протоцит *см.* Прокариотическая клетка
- Профаги 147–149, 151, 454
- Профлавины 444, 445
- Прохлорон 133
- Пряжка 173, 174
- Псевдомонады 69, 84, 104–106, 180, 411, 413, 423, 424
- Псевдомуреин 108
- Псевдоплазмодий 160
- Псевдоурацил 44
- Пситтакоз 123
- Психрофильные бактерии 181, 212
- Птицы 123
- Птомаины 430
- Пуллудан 346, 412
- Пульхерримин 82
- Пурины 33, 34, 177, 214, 292, 302
- Пурпурная мембрана 393–394
- Пурпурные бактерии 45–48, 70, 73, 75, 126, 189, 366–372, 376–382, 506
- распространение 381–382
- серобактерии 61, 126
- Путидаредоксин 238
- Путресцин 430
- Пчелы 83
- Пшеничный затор 270
- Пыль 81–82, 92
- Радиоавтография 31–33
- Рак древесных пород 172
- картофеля 172
- Рамноза 59, 60
- Растения 10
- болезни 95–96, 516
- опухоли 152–153, 172
- Реверсин (ревертанты) 443, 456, 500
- Регуляторные ферменты 487–488
- Редукционное деление *см.* Мейоз
- Рекомбинация *см.* Генетическая рекомбинация
- Рентгеновые лучи 211, 445
- Рентгеноструктурный анализ 34, 404
- Реовирусы 137
- Репарация ДНК 445, 447
- Репеллент 69
- Реплик метод (метод отпечатков) 440–441
- Репликативные (репликационные) вилки 39, 40
- Репликация (синтез) ДНК 36–40, 206, 435–443
- матричная цепь 39
- Репрессия конечным продуктом 473, 478–479
- lac*-Репрессор 482
- Реснички 27
- Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) EcoRI, HindIII 60, 468–469
- Рестрикция 468–469
- Ретровирусы 137, 153
- Рецепторы 60. *См. также* Хеморецепторы
- Рецессивные мутации 448
- Ржавчинные грибы 174
- Рибитол 53
- Рибоза 44
- Рибозо-5-фосфат 223, 228, 254, 256, 362
- Рибонуклеаза 31, 32
- Рибосомная РНК *см.* рРНК
- Рибосомные белки 43, 44
- Рибосомы 22, 25, 27–29, 43, 44, 87, 131, 203, 317, 463
- роль в синтезе белка 434, 437–439
- Рибофлавин 344
- Рибулозо-1,5-бисфосфат 361, 362
- Рибулозобисфосфат-карбоксилаза 26, 76, 357, 360–362
- Рибулозобисфосфатный (Кельвина-Бассамы) цикл 348, 360–364
- эволюция 519
- Рибулозомонофосфатный цикл 420, 421
- Рибулозо-5-фосфат 228, 275, 277, 363, 420–421
- Рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза 228
- Ризобии *см.* Клубеньковые бактерии
- Ризоиды 165
- Ризоморфы 155, 173
- Ризофера 513
- Риккетсии 122–124, 343, 515
- Ристоцетин 57, 343
- Рифампицин 206
- РНК 30–32, 42–44. *См. также* Матричная РНК; рРНК; тРНК
- РНК-полимераза ДНК-зависимая 206, 482
- РНК-праймер 38–40
- РНК-содержащие вирусы 135, 136, 143, 153–154
- Роданеза 354
- Родопин 377
- Родоиналь 377
- Родоспириллы 379
- Рост микроорганизмов 194–197, 200–207
- Ротенон 242
- рРНК 25, 43, 85, 87–88, 317
- биосинтез 485–486
- Ртутная лампа 446
- Рубец жвачных животных 14, 94, 104, 107, 114, 266, 280, 299
- микробиологические процессы 405–408, 503
- Рубнера* правило 20
- Рубредоксин 238
- Рудничные воды 355
- Рыбы 120
- Салициловая кислота (салицилат) 425, 428, 464
- Сальварсан 115
- Саркомы 154
- Сарциноксантин 82
- Сарцины 29, 30
- Сателлитные колонии 453, 499, 500
- Сахара 14, 223
- Сахароза 54, 60, 222
- Сахаролитические клостридии 103, 104
- Светособирающие пигменты (антенны) 372, 378, 385, 386, 391. *См. также* Бактериохлорофилл; Каротиноиды
- Светящиеся бактерии 289–291
- органы 515
- Седогептулозо-1,7-бисфосфат 362, 363
- Седогептулозо-7-фосфат 362, 363
- Секреторные пузырьки 22
- Селективные условия 21
- Селитра 349
- Сенная палочка 102
- Сенной отвар 179
- Септитол 327
- Сера 74, 176–177
- в водоемах 17, 516
- восстановление 315
- как акцептор водорода 380
- круговорот 16–17
- накопление 116
- орторомбическая 380
- отложения 517–518
- Серобактерия (серные бактерии) 16–17, 74, 105, 352–355. *См. также* Сульфатредуцирующие бактерии
- зеленые 126
- пурпурные 126
- Сероводород 16–17, 309, 354–355
- в кале 384
- образование 315
- Серотрансферрин 262
- Серин-гидроксиметил-трансфераза 421
- Сериновый путь 421–422
- Сефадекс (декстраиновый гель) 60, 61, 102–104, 310
- Сибирская язва 102
- Сивушные масла 271
- Сидерофоры 261, 262
- Симбиоз 85, 299, 501, 511–523. *См. также* Лишайники; Мутуалистический симбиоз
- антагонистический 518
- ассоциации 511–512
- в рубце 406–407
- межвидовая передача водорода 265, 318
- фиксация азота 395–399, 513
- Симбиотические бактерии 514
- свечение 291
- фиксация азота 15, 395–399
- Симметричная модель 488, 489
- Симпорт 259, 260
- Сине-зеленые водоросли *см.* Цианобактерии
- Сифилис 114, 115
- Склероции («маточные рожки») 172
- Скользящее движение 91, 115–120, 132, 310, 374–375
- Скрининг 339
- Слепая кишка 104
- Сливочное масло 279, 289
- Слизевики 158, 159. *См. также* Акразиомицеты; Миксомицеты
- Слизи 60–62, 102, 120, 122, 129, 400, 410
- растительные 345
- Слизистые колонии 400
- Смешанные культуры 190, 299, 315
- Сморчки 172
- Совершенное плодоношение *см.* Аск
- Соевые бобы 179
- С₃-Соединения 249, 251
- Соки 179, 271–272
- Солод 271
- D-Сорбитол 326–327
- D-Сорбоза 326–327
- Сорокарп 160
- Сорофор 160
- Специфическая трансдукция 464, 466
- Спириллоксантин 377
- Спириллы 29, 30, 66, 69, 70, 110
- Спирохеты 111–112, 343
- Спиртовое брожение 266–272, 287, 293, 294, 296, 302, 328
- Спирты 326, 407
- Спорангии 98, 99, 160–162
- Спорангиолы 165
- Спорангоспоры 101, 156, 164–165
- Спорообразование (споруляция) 77–79, 102–104
- у грибов 155–156, 160, 163
- Спорообразующие бактерии 90, 102–104, 310
- Спорофоры 98, 99
- Споруляция *см.* Спорообразование
- Споры 50–51, 76–81, 98, 101–102, 209. *См. также* Экзоспоры; Эндоспоры
- грибов 160, 161
- радиорезистентность 79

- терморезистентность 76–78, 207
- Спорынья 172, 345
- Стартовые культуры 279
- Стафилококки 29, 30, 55, 211, 515
- Стебельковые бактерии 91, 120–122
- Стеригма 175
- Стерилизация 76, 207–211
- Стероиды 96, 302, 335, 433, 496
- Стикланда реакция 293, 297–298
- Столбняк 299
- Сточные воды 190, 505
 - очистка 321, 509–510
- Стратификация 505–506
- Стрептобактерии 275
- Стрептококки 29, 30, 515
 - в кале 107
- Стрептомицеты 98, 100, 337, 345, 411, 414
- Стрептомицин 98, 206, 342, 463
- Стрептомициноустойчивые бактерии 457
- Сукцессия 190
- Сукцинат (янтарная кислота) 107, 205, 233–234
 - в рубце 407
 - образование 250–252, 263, 299, 317, 322–324
 - роль в брожении 282, 288
 - химическая структура 205, 251
- Сукцинатдегидрогеназа 205, 206, 232–234, 241
- Сукцинаттиокиназа 233
- Сукцинил-СоА 233, 234
- О-Сукцинилгомосерин 493
- Сукцинил-СоА : пропионат-СоА-трансфераза 282
- Сулема 211
- Сульфамиды 123
- Сульфаниловая кислота 206
- Сульфат 16–17, 76, 177, 304, 309–314, 330, 331
 - активация 233, 310, 312
 - в составе агара 415
 - восстановление см. Сульфатредукция
 - как продукт окисления 352
- Сульфатаденилтрансфераза (АТР-сульфурилаза) 311
- Сульфатное дыхание 305, 309
- Сульфатредукция (восстановление сульфата) 309–311, 313–314, 407, 508
 - ассимиляторная 16, 310, 311
 - диссимиляторная 16, 309, 311
- Сульфатредуцирующие бактерии 16, 103, 239, 266, 313–314, 505, 517
 - в сточных водах 507–508
 - фиксация CO_2 364
- Сульфидрильные группы 177, 204
- Сульфид(ы) 16, 116, 310, 311, 348
 - металлов 314, 356
- Сульфидобразующие бактерии 309, 364
- Сульфит 311, 348
- Сульфитредуктаза (бисульфитредуктаза) 311
- Сульфитредукция (восстановление сульфита) 237, 311–312
- Сульфонамид 205–206, 463
- ADP-Сульфурилаза 354
- Сумчатые грибы см. Аскомицеты
- Супероксиддисмутаза 247
- Супероксид-ион (супероксид-радикал; O_2^-) 247
- Супрессорные мутации 443
- Сусло 271
- Сферические бактерии 29
- Сфероиденон 377
- Сфероидин 377
- Сферопласты 55, 57
- Счетчики клеток 191
- Сыры 171
- Таллом (вегетативное тело) 155
 - ценоцитный 162
- Така-амилаза 411
- Така-диастаза 411
- Таксисы 68
- Тараканы 513
- Тартронатсемиальдегид-редуктаза 251
- Тартронатсемиальдегид-синтаза 251
- Тейхоевые кислоты 53, 54, 85
- Темновой метаболизм 380
- Терминатор 481
- Термиты 114, 513, 514
- Термоацидофильные бактерии 109–110
- Термоклин 75, 383, 506
- Термостабильный белок 258, 260
- Термофильные бактерии 181, 275, 405
- Тетрациклин (окситетрациклин) 343
- Тестостерон 359
- Тетрагидрофолиевая кислота (тетрагидрофолат; FH_4) 205, 301, 421
- Тетратерпеноиды 377
- Тетрациклин 100, 206, 343, 455, 463
- Тетритол 327
- Тетрозы 302
- Тиамин 177, 369
- Тиаминпирофосфат (ТПФ) 218, 232, 234, 267, 289
- Тилаконды (тилакоидные мембраны) 26, 28, 48, 49, 83, 367–370, 378, 385, 388–390
 - цианобактерий 129–131
- Тимидин 31
- Тимин 33–35, 44, 436, 442, 443
- Тиминовые димеры 447
- Тиогалактозид-трансацилаза 461
- Тиолаза 295
- Тиосульфат 312, 348, 379
- Тирозин 255, 492
- Тирозиназа 247
- Тиф 114, 122, 123, 285
- Тли 514
- Тогавирусы 137
- Токсины 75, 95, 299–300, 343
- Толуидиновый синий 74
- Толуилат 428
- Толуол 425
- Точечные мутации 443
- ТПФ см. Тиаминпирофосфат
- Транзция 444
- Трансальдолаза 362
- Трансальдолазные реакции 228, 229, 256, 362, 363, 421
- Трансаминаза 479
- Трансаминирование 254, 431–432
- Трансацилаза 482, 483
- Трансгидрогеназа 229
- Трансгликозилаза 411
- Трансгликозилирование 409, 411–412
- Трансдукция 454, 464–466
- Транскетолаза 362
- Транскетолазные реакции 228, 229, 256, 362, 421
- Транскрипция 435, 480–483
 - обратная 435, 439
- Транслоказы 257
- Транслокация группы 258, 260–261
- Трансляция 435, 437–439
- Транспентидирование 57
- Транспозиция 443
- Транспозоны (Тп) 444, 447, 455–456
- Транспорт веществ 60, 257–262
 - (перенос) электронов в анаэробных условиях 304–324
 - обратный 243, 244, 347, 351–352, 391
 - при фотосинтезе 385–392
- Транспортные РНК см. тРНК
- Трансфекция 147
- СоА-Трансфераза 282, 294, 426
- Трансформация 454, 466–468
 - веществ 335–336
 - опухолевая 152
- Трахома 123
- Треонин 255, 293, 491, 492
- Треониндезаминаза 491
- Трепонемы 115
- Третичная конформация 43, 204, 436, 442
- Триглицериды см. Нейтральные жиры
- Трикарбоновых кислот цикл 204, 215, 232–234, 252, 332, 495, 356–357, 364, 495
- Триозофосфат 267, 363, 364
- Триозофосфат-изомераза 225, 226, 362
- Триокиназа 422
- Триплеты 436–437, 442, 445
- Трипсин 346
- Триптофан 255, 298, 428, 476, 482, 492
- Триптофановый оперон 484
- Тритрионат 312
- Трихогина 167
- Трихомы 115, 116, 127–128
- тРНК 25, 42, 437
 - биосинтез 485–486
- Тростниковый сахар 60
- Трофосома 355
- Трюфели 168, 172
- Туберкулез 98
- Турбидиметрия 192
- Турбидостат 202–203
- Тяжелые металлы 204, 356
- Убигидрохинон 237
- Убиквины 504
- Убихинон (коэнзим Q) 49, 234, 237, 238, 242, 244, 391
- Углеводороды 186, 303, 419–420
- Углеводы 405, 407, 419–420
 - из нефти 98
 - катаболизм 274
 - сбраживание 263, 299
- Углекислота (двуокись углерода, углекислый газ, CO_2) 13–14, 94, 287, 288. См. также Фиксация CO_2
 - ассимиляция 320–321
 - в питательных средах 180–181
 - как акцентор водорода 300–301
 - источник углерода 177, 180–182, 360
 - парциальное давление 180–181
- Углерод 176
 - в морской воде 17
 - источники 184
 - круговорот 12–14, 185, 213
- Уксус, производство 327
- Уксусная кислота 60
- Уксуснокислое брожение 263, 299–300
- Уксуснокислые бактерии 105, 325–327
- Ультрафиолетовое облучение 35, 81, 148, 151, 445, 446, 462
- Ундекапренил 56
- Ундекапренилдифосфат 56, 63
- Ундекапренилмонофосфат 57
- Унипор 260

- Уотсона-Крика модель 34-35
 Урацил 44, 436, 443
 Уреаза 103, 431
 Уридиндифосфат (UDP) 56, 63
 Уридинтрифосфат (UTP) 63
 Уроканат 485
 Уроновые кислоты 60, 414
 Успулун 211
- Фагорезистентность 145
 Фагоцитоз 26, 58, 60, 135, 158, 161
 Фактор(ы) роста 177, 273-274
 - F 68, 457-458, 462, 463
 - R 463-464
 - RTF 463-464
 Фармацевтическая промышленность 18
 Фарнезол 377
 Фельгена окраска 30
 Феназин-1-карбоновая кислота 84
 Феназиновые красители 81
 Фенетициллин 341
 Фенилаланин 255, 425, 428, 492
 Фенилацетилкарбинол 336
 Фенол 425, 428
 Фенолоксидаза 417
 Феноляты 261
 Фенотип 439, 440, 447, 448
 ФЕП см. Фосфоенолпируват
 Ферментация 325. См. также Брожение
 - поверхностная 327
 Ферментеры 321, 325
 Ферментные препараты 346-347
 Ферменты 204, 216-218, 434. См. также Аллостерические ферменты
 - анаболические 473, 498
 - биосинтез 474-476, 478-479, 490-492
 - ингибирование 480-482, 499-500
 - индуцибельные 20, 474
 - катаболические 452-453, 473, 474, 476, 479, 498
 - каталитические центры 486
 - ковалентная модификация 490
 - комплекс с субстратом 216-217
 - «простые» 486
 - регуляция 442, 473-474, 490-492
 - рестрикции (рестриктазы) 60, 468-469
 Ферредоксин (Fd) 231, 237, 265, 299, 300, 364, 379, 387-389, 392
 Ферредоксин:Н₂-оксидоредуктаза 265
 Ферредоксин-NADP-редуктаза 388
 Ферриоксалины 261
 Феррихромы 261
- Ферри-энтерохелин 261, 262
 Физические методы 22
 Фикобилин 120
 Фикобилипротеины 129, 375, 385
 Фикобилисомы 129-131
 Фикобионт 512, 514
 Фикомицеты 158, 159, 162-166, 329
 Фикоцианин 129, 130
 Фикоцианобилин 129
 Фикозитрин 129, 130
 Фикозитробилин 129
 Фиксация азота 15, 359, 395-402
 -- роль плазмид 464
 - СО₂ 12-14, 26-27, 105, 109, 288, 320, 360-365, 379, 385
 -- автотрофная 281, 364
 -- в гипolimнионе 508
 -- водородокисляющими бактериями 358
 -- эволюция 520
 Фильтрация 210, 211
 Фимбрии 68
 Фитол 377
 Фитопатогенные вирусы 134-135
 Фитопланктон 504
 Флавинадениндинуклеотид (FAD) 218, 219, 233, 236, 237, 241
 - восстановленный (FADH₂) 233, 243
 Флавинаденинмононуклеотид (FMN) 218, 236, 237, 291
 Флавины 26, 83
 Флавопротеины 234, 236, 241
 Флагеллин 67
 Флеи-ксантофилл 82
 Фоботаксис («реакция испуга») 70
 Фогес-Проскауэра реакция 286
 Фолиевая кислота 123, 205
 Формальдегид 420-422
 Формиат 107, 231, 261, 265, 287, 293, 300, 301, 310, 316, 420
 - в рубце 407
 Формиат-гидроген-лиаза 287
 Формиатдегидрогеназа 287, 300
 Формилкинуренин 476
 Фосфатидилглицерол 256
 Фосфатидилинозитол 256
 Фосфатидилэтаноламин 256
 Фосфаты 180. См. также Высокоэнергетические фосфаты
 - в сельском хозяйстве 15-16
 Фосфоаденозин-5'-фосфосульфат 311
 Фосфогликолат 361
 2-Фосфоглицерат 225
 3-Фосфоглицерат 225-227, 251, 269, 361, 362, 421
 Фосфоглицераткиназа 223, 225, 226, 264, 361
- Фосфоглицератмутаза 227
 6-Фосфоглюконат 227-228
 Фосфоглюконатдегидратаза 229
 Фосфоглюконат-дегидрогеназа 228, 229, 277, 278
 6-Фосфоглюконолактон 228
 Фосфоенолпируват (ФЕП) 222, 225, 226, 234, 249, 250, 258, 260, 264, 421, 494-496
 - и фиксация СО₂ 364, 365
 Фосфоенолпируват-карбокиназа 250
 Фосфоенолпируват-карбоксилаза (ФЕП-карбоксилаза) 249-251
 Фосфоенолпируват-карбокситрансфосфорилаза 250
 Фосфоенолпируват-синтетаза (ФЕП-синтетаза) 249, 250
 Фосфо-2-кето-3-дезоксиглюконат-альдолаза 230, 231
 Фосфокетолаза 264, 272, 276-278
 Фосфолипиды 44, 45, 57, 58
 Фосфор 15-17, 330, 331
 Фосфорибозилдифосфат 223
 Фосфорибозилизомераза 228
 Фосфорibuлокиназа 361, 363, 497
 Фосфорилызы 409-410
 Фосфорилирование см. также Окислительное фосфорилирование
 - в пурпурной мембране 394
 - на уровне субстрата 220, 225, 246
 - фотосинтетическое см. Фотофосфорилирование
 Фосфорная кислота 33, 73
 Фосфорные эфиры 222
 Фосфороллиз 409-410
 Фосфотрансацетилаза 264, 294, 300
 Фосфотрансферазная система 260
 Фосфофруктокиназа 225, 226, 249, 270, 493-495
 Фосфотанололамин 59
 Фотавтотрофия см. Фототрофные бактерии
 Фотогетеротрофия 375
 Фотоокисление 83, 378, 385
 Фотореактивация 447
 Фотореакции 385-388, 390-392
 Фотосенсибилизация 83
 Фотосинтез 177, 184, 213, 366-394, 401
 - аноксигенный 366, 390-393, 508
 - в водоемах 355, 506, 516
 - в накопительных культурах 383
 - оксигенный 366, 506
 - первичные процессы 383-393
 - у миксотрофов 360
 - у цианобактерий 127, 129, 366
 - у эндосимбионтов 514
 - Z-схема 387, 388
- Фотосинтетическая единица 385
 Фотосинтетические пигменты 26, 48, 49
 - продукты 384
 Фотосинтетический аппарат см. Пигменты; Тилакоиды; Хлоропласты
 Фотосистемы (I, II) 129, 132, 133, 386-389, 522
 Фототаксис бактерий 70, 133
 - плазмодиев 161
 Фототрофные бактерии 16, 48, 70, 75, 92, 126-133, 184, 185, 187-188, 315, 399, 472. См. также Зеленые бактерии; Пурпурные бактерии; Фотосинтез
 --- анаэробные 381
 --- распространение 381-382, 508
 Фотофосфорилирование 223, 383, 392-393
 - циклическое 132
 Фотохимический реакционный центр 391
 Фрамбезия 115
 Фруктаны 412
 Фруктоза 61, 104, 276, 293, 327
 Фруктозаны 405-407, 412
 Фруктозо-1,6-бисфосфат 224, 225, 267, 270, 362, 495
 Фруктозобисфосфатаза 362, 494
 Фруктозобисфосфат-альдолаза 225, 362
 Фруктозо-1,6-бисфосфатный путь см. Гликолиз
 Фруктозорибозилфосфат 496
 Фруктозо-6-фосфат 225, 228, 229, 270, 362-364, 421, 494
 Фукоза 59, 62
 Фуксин 76
 Фульвокислоты 419
 Фумараза (фумаратгидратаза) 233, 234, 282
 Фумарат 204, 206, 233, 254, 282, 299, 323, 332, 431. См. также Фумаратное дыхание
 - восстановление 322-324
 Фумаратное дыхание 305, 323-324
 Фумаратредуктаза 248, 282, 323
 Фунгициды 337, 429
- Халькозит (Cu₂S) 356
 Хемномотическая гипотеза 244, 245, 390
 Хемоклин 506
 Хемолитоавтотрофы 104, 105, 185, 187, 322, 348, 355, 399
 --- облигатные 349-350, 352, 356-357

- факультативные 358, 359
 Хемолитогетеротрофные организмы 312
 Хемолитотрофные бактерии 90, 184, 348–365
 Хемоорганотрофные бактерии 104, 185–188, 289, 323, 349, 374
 Хемостат 200–202, 477
 Хемотаксис 60, 68–69, 161
Хендерсона–Хассельбальха уравнение 180
Хилла коэффициент 488
 Химические элементы 176
 Хиноны 26, 232, 238, 241
 Хитин 51–53, 183, 414–415
 Хитиназа 415
 Хитобиазы 415
 Хитобиозы 415
 Хитотриозы 415
 Хитридиомицеты 159, 162
 Хламидии 92, 123–124, 515
 Хламидобактерии 62, 105, 356
 Хламидоспоры 156, 157
 Хлебная плесень 164
 Хлорамфеникол *см.* Хлоромидетин
 Хлоробактин 377
 Хлоромидетин 100, 206, 342, 463
 Хлоропласты 22, 25–26, 43, 206, 385, 389
 -- эволюция 522
 Хлоросомы 28, 372, 374, 375, 378
 Хлорофилл 375
 -- *a* 375, 377, 385
 -- комплекс с белком 385
 -- цианобактерий 127, 129, 130, 133
 -- эволюция 519
 -- *b* 385
 -- *k* 133
 Хлортетрациклин *см.* Аууреомидин
 Холера 110, 285
 Хроматиновые тельца *см.* Нуклеоид
 Хроматическая адаптация 130
 Хроматофоры 28, 48, 83, 370, 378, 392
 Хромосомы 23–25, 369, 372, 434, 453, 461. *См. также* Гомологичные хромосомы; Кроссинговер
 Хромофоры 48, 49
- Цветение воды 129, 131, 400, 507
 Целлюбиоза 404
 Целлюлоза 177, 183, 347, 403–408
 -- в клеточной стенке 51, 57
 -- разложение 100, 266, 292, 299, 317, 403–408, 503
 -- склеивание колоний 62, 345
- Целлюлозолитические бактерии 118, 503
 Ценозигота 157
 Центриоли 27
 Цетиловый спирт *см.* Гексадеканол
 Цетилпальмитат 423
 Цефалоридин 342
 Цефалоспорины 57, 206, 342
 Цефалотин 342
 Цианеллы 514
 Цианиды 186, 204, 238, 401
 Цианобактерии (сине-зеленые водоросли) 75, 85, 88, 89, 92, 115–118, 127–133, 186, 379
 -- в озерах 506, 508
 -- номенклатура 127–128
 -- симбиоз 514
 -- фиксация азота 398–400
 -- CO_2 360
 -- фотосинтез 366, 376, 381, 385, 392
 -- хроококковые 127
 -- «чернильные полосы» 129
 Цианкобаламин 177
 Цианофидин 130, 131
 Цикл трикарбоновых кислот 204, 215, 232–234, 252, 332, 356–357, 364, 495
 Циклический АМР (аденозин-3',5'-фосфат; сАМР) 161, 483, 484
 Циклосерин 56, 451
Циля–Нельсена метод 97
 Цинк 176, 329–331
 Цистеин 236, 255
 Цистофор 119
 Цисты 80–81, 119, 399
 Цитозин 33–35, 44, 436, 443, 493
 Цитоплазма 22, 25, 27, 28
 Цитохром aa_3 (цитохромоксидаза) 204, 238, 242
 -- *a*₁ 350
 -- *b* 387, 391, 312
 -- *c* 46, 94, 309, 312, 353, 391
 -- *c*₂ 392
 -- *c*₃ 312
 -- *c*₇ 315
 -- *f* 387
 Н₂: Цитохром-*c*₃-оксидоредуктаза 312
 Цитохром-*c*-редуктаза 204, 242
 Цитохромы 92–94, 237–239, 241–244, 281–283, 312, 388–391
 -- как фотосенсибилизаторы 83
 -- синтез 273
 -- эволюция 519
 Цитрамалевая кислота 297, 298
 Цитрат *см.* Лимонная кислота
 Цитратсинтаза 232, 233, 495
 Цитруллин 255, 477
 сАМР-рецепторный белок 483

- Чайный гриб 190
 Черви 324
 Четвертичная конформация 43, 204, 436, 442
 Чистые культуры (чистые расы) 188–190
 Чума 285

- Шикимат 428
 Шиффово основание 220, 433
 Шляпочные грибы 155
 Шпиннат 308
 Штриховой тест 338–339

- Шавелевая кислота 330, 332
 Шавелевоуксусная кислота *см.* Оксиалоацетат

- Эволюция 215, 464, 501
 -- прокариот 519–521
 -- фотосинтез 366, 392
 -- эукариот 521–522
 ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) 54
 Экзергоническая реакция 302
 Экзоамилаза 411
 Экзонуклеаза 39
 Экзополисахариды 63, 129, 132, 345–346
 Экзоспории 77
 Экзоспоры 77, 80–81
 Экзотоксины 95, 211
 Экзоферменты 93, 118
 Экзохелины 261
 Экзоцитоз 25
 Экологическая ниша 503
 Экология микроорганизмов 501
 Экосистемы 354–355, 502–504
 Экспоненциальный рост 192–194, 196–197, 199, 467
 Экспрессия гена 481
 Экстинкция 192
 Эксцизия (выключение) 460
 Эктосимбиоз 374, 511, 523
 Электронная вакансия («дырка») 386–388
 Электронный ток (поток электронов) 386, 387
 Электрон-транспортная цепь (система) (дыхательная цепь) 26, 45, 220, 234–248, 306, 309, 318, 327, 348, 357, 520
 -- в тилакоидной мембране 389
 -- фотосинтетическая 49, 385–386

- Электроны 235, 236. *См. также* Акцепторы водорода (электронов); Доноры водорода (электронов); Транспорт электронов
 Электрохимический градиент 235, 236 – потенциал 243–244
 Элементарная мембрана 44, 45
Эмбдена–Мейергофа–Парнаса путь *см.* Гликолиз
 Эндоамилаза 410
 Эндопептидаза 55
 Эндоплазматический ретикулум 22, 25, 169
 Эндосимбиоз 105, 122, 355, 395–398, 511, 513, 523
 Эндосимбиотическая гипотеза 26–27
 Эндоспоры 76–80, 101–104
 Эндотоксин 59
 Эндоцитоз 26
 Энергетические источники 184–185
 -- паразиты 124
 Энергетический баланс 242–243
 -- заряд 497
 Энергия 177, 214, 222–224
 -- излучения 213
 -- получение 155, 319–320, 323
 -- преобразование 108, 213–262, 383, 390
 -- свободная 220, 240–241, 319–320
 Энтеробактерии 55, 261, 265, 323, 462
 Энтеротоксины 93, 211, 284
 Энтерохелин 261, 262
Этнера–Дудорова путь *см.* Кето-3-дезоксиглюкоконатный путь
 Энтропия 214
 Эозин 286, 452
 Эпилимнион 506
 Эпимеразные реакции 228, 277, 421
 Эргобазины 172
 Эрготамины 172, 345
 Эрготоксины 172, 345
 Эритритол 53
 Эритрозо-4-фосфат 254, 278, 362, 363, 492
 Эритромицин 206, 343
 Эстуарии 505
 Этан 422
 Этанол (этиловый спирт) 164, 221, 232, 263. *См. также* Спиртовое брожение
 -- бактериостатическое действие 204
 -- как донор водорода 309, 318
 -- пути образования 271–272
 Этиленглимин 444
 Этиленоксид *см.* Окись этилена
 Этилметансульфонат 444

- Этиловый спирт см. Этанол
 Этилирование 125–126
 Эуаскомицеты 159
 Эубактерии 88, 404
 Эукариотическая клетка (эуцит) 23–27
 Эукариоты 11–12, 40, 88
 – эволюция 521–522
 Эумицеты 158, 159
 Эуцит см. Эукариотическая клетка
 Эфедрин 336
 Эффекторы 217–218, 481, 487, 489–490, 500
 – аллостерические 218
 – отрицательные и положительные 473, 487, 493
 Яблочная кислота см. Малат
 Ядерная мембрана 25
 – оболочка 23, 25
 Ядро см. Клеточное ядро
 – бактериальной клетки см. Нуклеоид
 Ядрышко 25
 Яды 204, 242, 345, 440
 Яичный белок 54
 Янтарная кислота 180, 287. См. также сукцинат

Указатель латинских названий

- Acetobacter* 90, 105, 179, 325–327
Acetobacterium 322, 357
 – *aceti* 51, 62, 249
 – *pasteurianus* 71
Acholeplasma 92, 124, 125
Achromatium 27, 74, 91, 115, 354
Acidaminococcus 89
Acinetobacter 89, 93, 423, 467, 476
Actinomyces 90, 98
Actinoplanes 90, 99
Aeromonas 90, 289
Agrobacterium 90, 105, 152, 417, 464
Alcaligenes 90, 105, 358, 359, 399, 414
 – *eutrophus* 72, 236, 352, 360, 449, 451, 476
Allomyces 329
Alysiella 91, 115
Amanita 344
Amoebobacter 92, 508
 – *roseus* 61
Anabaena 92, 129, 379
Ancalochloris 508
Ancalomicrobium 91, 122
Aphanizomenon 75
Aquaspirillum 65, 91, 105, 110, 358, 359
Archangium 91, 405
Arthrobacter 72, 81, 84, 90, 96, 351, 496
Aspergillus 171, 181, 330, 331, 334, 404, 411, 412
 – *niger* 18, 411
Asticcacaulis 91
Azomonas 90
Azospirillum 91, 399, 513
Azotobacter 20, 81, 90, 186, 237, 345, 399, 400, 412, 513
 – *chroococcum* 40, 61
Azotomonas 400

Bacillus 29, 60, 76, 90, 101
 – *anthracis* 102
 – *cereus* 31, 79, 80, 102, 103, 208, 412, 430
 – *circulans* 80, 102
 – *coagulans* 20, 80
 – *laterosporus* 75
 – *licheniformis* 80, 102, 307
 – *macerans* 102, 411, 413
 – *medusa* 75
 – *megaterium* 20, 31, 54, 61, 67, 73, 80, 102, 121
 – *pasteuri* 431
 – *polymyxa* 72, 102, 289, 399, 411, 413
 – *stearothermophilus* 20, 102, 103, 181, 208, 411
 – *subtilis* 20, 79, 80, 101, 147, 208, 289, 411, 412, 467, 485
 – *thuringiensis* 75, 102
Bacterioglodea 62
Bacteroides 91, 283, 323, 403
Bdellovibrio 66, 91, 110–112, 515
Beggiatoa 74, 91, 115, 116, 354
Bejerinckia 90, 105, 400
Beneckea 290
Bifidobacterium 90, 276–277, 283
Blakesleea 164, 345
Blastobacter 91, 92
Borrelia 91, 114, 115
Brevibacterium 90, 97
Brucella 90
Butyrivibrio 91, 369, 407
Byssoschlamys 209

Caldariella 353
Calothrix 92
Campylobacter 91, 357
Candida 73, 82, 83, 170, 339, 345, 422, 424, 515
Caryophanon 90
Caulobacter 64, 91, 121
Cellulomonas 90, 96, 405
Chlamydia 92, 123
Chlorobium 92, 315, 364, 368, 373–377, 379, 380, 382, 511
Chlorochromatium 374
Chloroflexus 92, 115, 126, 368, 374–377, 380
Chloroherpeton 92, 374
Choanephora 164, 345
Chondromyces 91, 119
Chromatium 47, 64, 70, 92, 237, 368–371, 379, 381, 508–511
 – *okenii* 27, 48, 66, 73

- Chromobacterium* 82, 84
Citrobacter 284
Citromyces 330
Claviceps 172, 344, 345
Clostridium 71, 76, 80, 88, 90, 101, 103, 229, 237, 239, 291–300, 345, 405, 413
 – *aceticum* 103, 322
 – *acetobutylicum* 103, 293–296
 – *acidi-urici* 103
 – *botulinum* 211
 – *histolyticum* 103
 – *pasteurianum* 103, 291
 – *propionicum* 281, 283
Collybia 157
Corynebacterium 30, 81, 90, 98
 – *diphtheriae* 186
 – *glutamicum* 18, 333, 334
 – *insidiosum* 84
Coxiella 92, 123
Crenothrix 90
Cribraria 161
Cristispira 91, 114
Cystobacter 91
Cytophaga 36, 91, 115, 118, 404, 405, 414, 415

Dermatophilus 90, 99, 101
Dermocarpa 92, 127
Derxia 90, 105
Desulfobacter 310
Desulfococcus 310
Desulfonema 310
Desulfosarcina 310
Desulfotomaculum 76, 90, 101, 103, 310, 314, 407
Desulfovibrio 91, 238, 310, 312, 315, 357, 511
 – *gigas* 40
Desulfurococcus 91, 110
Desulfuromonas 315, 380, 511
Dictyostelium 158–161
Diplococcus 29

Ectothiorodospira 92, 370, 375
 – *mobilis* 48, 49
Endomyces 156, 169, 271
Endomycopsis 169
Enterobacter 90, 284–288, 308, 412, 472
 – *aerogenes* 284–286, 480, 491
Erwinia 90, 284, 413
Erysipelothrix 90
Erysiphe 171
Escherichia coli 283–288
 -- генетическая карта 460, 461
 -- ДНК 34, 37
 -- дыхание 20
 -- и фаги 145, 146, 147–150
 -- клеточная стенка 52, 55
 -- жгутики 67
 -- запасные вещества 72
 -- мутанты 186, 450, 455–457
 -- половые типы и перенос генов 68, 458–462
 -- регуляция метаболизма 474, 477–479, 483–485, 490–496.
 -- рестрикция 468
 -- рост 196, 198
 -- синтез бактериоцинов 464
 --- лизоцима 54
 -- систематика 90, 284
 -- тонкая структура 29, 31–34
 -- трансдукция 465, 466
 -- трансформация 467
 -- устойчивость к антибиотикам 463
Eubacterium 90, 294

Fischerella 92
Flavobacterium 414, 415, 417, 422
Flexibacter 91, 115, 118, 120
Franckia 90
Fuligo 161
Fusarium 157, 404, 413
Fusobacterium 91, 249

Gallionella 62, 92, 122, 181, 356, 516
Gloeobacter 92, 127, 130
Gloeocapsa 92
Gloeotheca 92, 127
Gluconobacter 90, 105, 325–327

Haemophilus influenzae 147, 467
Halobacterium 91, 109, 393
 – *halobium* 75, 393, 394
Halococcus 91, 109
Hansenula 413, 422
Helvella 172
Herpetosiphon 91
Hyphomicrobium 91, 120, 421/422
Hyphomonas 91
Hypoxylon 172

Klebsiella 90, 198, 284, 323, 399, 402

Lactobacillus 90, 274–270
 – *brevis* 347
 – *fermentum* 46
 – *plantarum* 289

- *viridescens* 46
Lamprocystis 75, 92, 508
Lampropedia 62, 89
Legionella 90
Leptomitus 156, 162
Leptosira 91, 114, 115
Leptothrix 62, 90, 356
Leptotrichia 91
Leuconostoc 89, 92, 179, 276, 277, 289, 412
Leucothrix 91, 115, 116
Listeria 90
Lycogala 161
lyngbia 92, 128

- Megasphaera* 89, 283
Melittangium 91
Metallogenium 92
Methanobacterium 91, 109, 296, 316, 318, 322, 357
Methanobrevibacter 109, 316
Methanococcus 91, 109, 316
Methanomicrobium 316
Methanosarcina 91, 109, 316, 317, 320
Methanospirillum 109, 316, 317
Methanothermes 91, 109
Methanothrix 91, 109, 316
Methylococcus 181, 420
Methylocystis 81
Methylomonas 104, 420, 422
Methylosinus 81, 420
Microbispora 90, 99, 101
Micrococcus 36, 81, 89, 92, 93
 – *luteus* 45, 54, 72
 – *radiatus* 31, 447
Microcoleus 130
Microcycilus 91
Microcystis 75
Micromonospora 90, 99, 101, 281, 405, 415
Monilinia 173
Moraxella 89, 93
Morchella 172
Mucor 164, 329, 511
Mycobacterium 81, 90, 99
 – *tuberculosis* 83, 97, 98
Mycoderma aceti 51, 62, 327
Mycoplasma 29, 92, 124–125
Myxococcus 81, 91, 118
Myxosarcina 92, 127

- Nannocystis* 91
Nectria 172
Neisseria 89, 93, 467
Neurospora 158, 172

- *crassa* 40
Neuskia 92, 122
Nitrobacter 14, 46, 90, 196, 349–351
Nitrococcus 90, 350
Nitrosococcus 46, 90, 349, 350
Nitrosolobus 90, 349, 350
Nitrosomonas 14, 46, 76, 90, 104, 196, 349, 350, 352
Nitrosospira 90, 350
Nitrospina 90, 350
Nocardia 81, 90, 98–100, 358, 359, 415, 422
Nostoc 92, 129, 130, 399

- Oceanospirillum* 91
Oscillatoria 75, 92, 129, 132, 133, 508
Oscillospira 94, 104

- Paracoccus* 89, 358, 359
 – *denitrificans* 88, 236, 307, 354
Pediococcus 89, 92
Pedomicrobium 122
Pelochromatium 374
Pelodictyon 75, 92, 373, 374, 508
Pelonema 75
Peloploca 75
Pelosiigma 91
Penicillium 171, 337, 341, 347
Peptococcus 89, 92, 294
Peptostreptococcus 89, 92
Peziza 172
Phormidium 92, 128
Photomicrobium 90, 290
Phycomyces 164
Physarum 161
Pilobolus 165
Planctomyces 91
Plectonema 92, 128
Pleurocapsa 92, 127
Polyangium 91, 118, 119, 405
Prochloron 133
Propionibacterium 90, 97, 280–281, 393
Prosthecochloris 92, 374
Prosthecomicrobium 92, 122
Proteus 64, 90, 284
 – *mirabilis* 65
 – *vulgaris* 68, 430, 431
Pseudomonas 29, 64, 66, 90, 104, 345, 359
 – *aeruginosa* 82, 84, 104, 339, 346
 – *carboxidovorans* 359, 360
 – *denitrificans* 184
 – *fluorescens* 105, 307, 405
 – *indigofera* 84
 – *putida* 105
 – *saccharophila* 105

– *stutzeri* 307
 – *syringae* 105
Pullularia 170, 171, 412
Pyrodictium 91, 110, 181
Pyronema 173

Rhizobium 88, 90, 105, 283, 395–398, 467
Rhizopus 164–166, 329, 335
Rhodobacter 379, 389
Rhodocyclus 372
Rhodomicrobium 81, 92, 120, 372
Rhodopseudomonas 88, 92, 371, 372, 375, 379
Rhodospirillum 92, 368–371
 – *rubrum* 47, 368, 371, 496
Rhodotorula 73, 81, 83, 170, 511
Rickettsia 92
 – *provazekii* 122–123
Ruminococcus 89, 92, 266, 299, 407

Saccharomyces 169, 170, 181, 266, 267, 270
Salmonella 57, 72, 90, 284, 462, 465, 466
 – *paratyphi* 59
 – *typhimurium* 57, 59, 284, 465, 485
Saprolegnia 162–163, 329
Saprospira 91, 115, 116
Sarcina 29, 89, 92
 – *lutea* 82
 – *ventriculi* 51, 62, 63, 93, 179, 271
Schizosaccharomyces 156
Sclerotinia 173
Selenomonas 64, 91, 112, 281, 407
 – *ruminantium* 65, 239, 282
Seliberia 92
Serratia 90, 284, 289
 – *marcescens* 82, 83
Shigella 90, 284, 462, 563, 465
 – *dysenteriae* 57, 285
Siderocapsa 517
Simonsiella 91, 115, 117
Sphaerotheca 171
Sphaerotilus 62, 74, 90, 105, 509
Spirillum 64, 66, 91, 110
 – *volutans* 73
Spirochaeta 91, 114
Spirogyra 69
Spiroplasma 92, 124–126
Spirulina 92, 116, 127
Sporangium 505
Sporobolomyces 83, 175
Sporocytophaga 81, 91, 118, 404, 409

Sporolactobacillus 76, 90, 101, 273, 280
Sporosarcina 76, 90, 101, 103, 431
Staphylococcus 89, 92, 93
 – *aureus* 53, 56, 338, 339
Stibobacter 355
Stigmatella 91
Streptobacillus 126
Streptococcus 29, 89, 92, 279
 – *lactis* 279
 – *mutans* 60, 412
 – *salivarius* 60
Streptomyces 54, 90, 98–100, 405, 415
 – *aureofaciens* 343
 – *fradiae* 335
 – *pneumoniae* 467
 – *venezuelae* 342
Streptosporangium 90, 99, 101, 405
Streptothrix 90
Succinivibrio 91
Sulfolobus 90, 91, 181, 356
 – *acidovorans* 109, 353, 355
Synechococcus 92, 127, 129

Thermoactinomyces 90, 101, 181
Thermococcus 110
Thermodiscus 110
Thermoplasma 91, 109
Thermoproteus 91, 110
Thermus 90, 181
Thiobacillus 76, 90, 179, 307, 352, 353, 355, 356, 516
Thiobacterium 90
Thiocapsa 48, 92, 370, 375
Thiocystis 92, 369
Thiodictyon 75, 92, 369, 508
Thiomicrospora 352, 353
Thiopedia 92, 508
Thioploca 91, 354
Thiosarcina 92
Thiospirillopsis 116
Thiospirillum 64, 66, 92, 381, 508
 – *jenense* 27, 66, 67, 369, 370
Thiothrix 74, 91, 354
Thiovulum 74, 90, 354
Torula 271
Torulopsis 170
Treponema 91
 – *pallidum* 114, 115
Trichoderma 347, 404
Trichophyton 339
Tuber 172

Uncinula 171
Ureaplasma 124

Veillonella 89, 239, 280, 282, 407
Vibrio 29, 64, 90, 465
 – *cholerae* 67, 110, 285
 – *metschnikovii* 64, 65
 – *succinogenes* 299, 232, 357
Vitreoscilla 91, 115–117

Xanthobacter 105, 358, 359, 399

Xanthomonas 60, 90, 105, 345, 346
Xylaria 172

Yersinia 90, 285

Zoogloea 62, 90
Zygosaccharomyces 170
Zygomonas 272

Предисловие редактора перевода	5	4.3	Отношение вирусов и плазмид к образованию опухолей (онкогенезу)	151
Предисловие к 6-му изданию	7	5. Грибы		155
Предисловие к 1-му изданию	8	5.1	Акразомицеты (слизевики, имеющие клеточное строение)	158
1. Положение микроорганизмов в природе	10	5.2	Миксомицеты (истинные слизевики)	161
1.1 Три царства: животные, растения и протисты	10	5.3	Фикомицеты (низшие грибы)	162
1.2 Прокариоты и эукариоты	11	5.4	Аскомицеты (сумчатые грибы)	166
1.3 Участие в круговороте веществ	12	5.5	Базидиомицеты	173
1.4 Микроорганизмы на службе человека	17	5.6	Несовершенные грибы (дейтеромицеты)	175
1.5 Общие свойства микроорганизмов	19	6. Рост микроорганизмов		176
2. Клетка и ее структура	22	6.1	Питание микроорганизмов	176
2.1 Эукариотическая клетка (эуцит)	23	6.2	Питательные среды и условия роста	178
2.2 Прокариотическая клетка (протоцит)	27	6.3	Типы питания	184
3. Прокариоты. Систематический обзор	85	6.4	Элективные методы культивирования	185
3.1 Введение	85	6.5	Физиология роста	190
3.2 Систематика: обзор системы прокариот	89	6.6	Подавление роста и гибель микроорганизмов под действием различных агентов	203
3.3 Грам-положительные кокки (группа 14)	92	7. Основные механизмы обмена веществ и преобразования энергии		213
3.4 Грам-отрицательные кокки (группы 10 и 11)	93	7.1	Важнейшие общие представления	214
3.5 Грам-положительные палочки, не образующие споры (группа 16)	94	7.2	Пути катаболизма гексоз	224
3.6 Коринеформные бактерии (группа 17)	95	7.3	Цикл трикарбонных кислот	232
3.7 Микобактерии (группа 17)	97	7.4	Дыхательная цепь и фосфорилирование, сопряженное с транспортом электронов	234
3.8 Актиномицеты в узком смысле (группа 17)	98	7.5	Вспомогательные циклы и глюконеогенез	248
3.9 Палочки и кокки, образующие эндоспоры (группа 15)	101	7.6	Биосинтез некоторых низкомолекулярных веществ	253
3.10 Псевдомонады и другие грам-отрицательные палочки (группы 7, 12 и 3)	104	7.7	Поглощение веществ клетками	257
3.11 Грам-отрицательные факультативно-анаэробные палочки (группа 8)	107	8. Типы брожения		263
3.12 Грам-отрицательные анаэробные бактерии (группа 9)	107	8.1	Спиртовое брожение, вызываемое дрожжами и бактериями	266
3.13 Метанобразующие бактерии и другие археобактерии (группа 13)	108	8.2	Молочнокислородное брожение и семейство Lactobacillaceae	272
3.14 Изогнутые палочки: спираиллы и вибрионы (группы 6 и 9)	110	8.3	Пропионовокислородное брожение и пропионовокислородные бактерии	280
3.15 Спирихеты (группа 5)	112	8.4	Муравьинокислородное брожение и семейство Enterobacteriaceae	283
3.16 Скользящие бактерии (группа 2)	115	8.5	Маслянокислородное и ацетоно-бутиловое брожение; клостридии	291
3.17 Почкующиеся и стебельковые бактерии (группа 4)	120	8.6	Гомоацетатное брожение. CO ₂ как акцептор водорода	300
3.18 Обязательные внутриклеточные паразиты (группа 18)	122	8.7	Сбраживаемые и несбраживаемые природные соединения	302
3.19 Микоплазмы (группа 19)	124	9. Перенос электронов в анаэробных условиях		304
3.20 Анаэробные аноксигенные фототрофные бактерии (группа I)	126	9.1	Денитрификация и восстановление нитрата	304
3.21 Аэробные оксигенные фототрофные бактерии	127	9.2	Образование сероводорода при восстановлении сульфата	309
4. Вирусы: распространение и структура	134	9.3	Образование сероводорода при восстановлении серы	315
4.1 Вирусы	136	9.4	Образование метана при восстановлении карбоната	316
4.2 Вирусы бактерий (бактериофаги)	142	9.5	Образование ацетата при восстановлении карбоната	321
		9.6	Образование сукцината при восстановлении fumarата	322
		9.7	Восстановление ионов Fe (III) до Fe (II)	324
		10. Неполные окисления		325
		10.1	Образование уксусной кислоты и уксуснокислородные бактерии	325
		10.2	Образование других органических кислот	328
		10.3	Трансформация веществ микроорганизмами	335

10.4	Образование вторичных метаболитов	566
11.	Использование неорганических доноров водорода: аэробные хемолитотрофные бактерии	348
11.1	Окисление аммиака и нитрита (нитрификация)	349
11.2	Окисление восстановленных соединений серы	352
11.3	Окисление двухвалентного железа	355
11.4	Окисление молекулярного водорода	357
11.5	Фиксация CO ₂	360
12.	Фототрофные бактерии и фотосинтез	366
12.1	Пурпурные и зеленые бактерии	366
12.2	Первичные процессы фотосинтеза	383
12.3	Использование световой энергии галобактериями	393
13.	Фиксация молекулярного азота	395
13.1	Фиксация азота симбиотическими бактериями	395
13.2	Фиксация азота свободноживущими бактериями	399
13.3	Биохимия азотфиксации	401
14.	Разложение природных веществ	403
14.1	Целлюлоза	403
14.2	Ксилан	408
14.3	Крахмал и другие глиуканы	409
14.4	Фруктаны	412
14.5	Маннаны	413
14.6	Пектины	413
14.7	Агар	414
14.8	Хитин	414
14.9	Лигнин	415
14.10	Образование гумуса	417
14.11	Углеводороды	419
14.12	Белки	429
15.	Постоянство, изменение и передача признаков	434
15.1	Синтез белка и генетический код	435
15.2	Мутации и их возникновение	439
15.3	Передача признаков и генетическая рекомбинация	453
16.	Регуляция метаболизма	472
16.1	Регуляция синтеза ферментов	474
16.2	Регуляция путем изменения каталитической активности ферментов	486
16.3	Мутанты с нарушенной регуляцией	497
17.	Микроорганизмы и окружающая среда	501
17.1	Экология микроорганизмов	502
17.2	Микроорганизмы как симбиотические партнеры	510
17.3	Микроорганизмы и геологическая история Земли	516
17.4	Эволюция микроорганизмов	518
	Литература	524
	Предметный указатель	533
	Указатель латинских названий	559

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2
издательство «Мир»