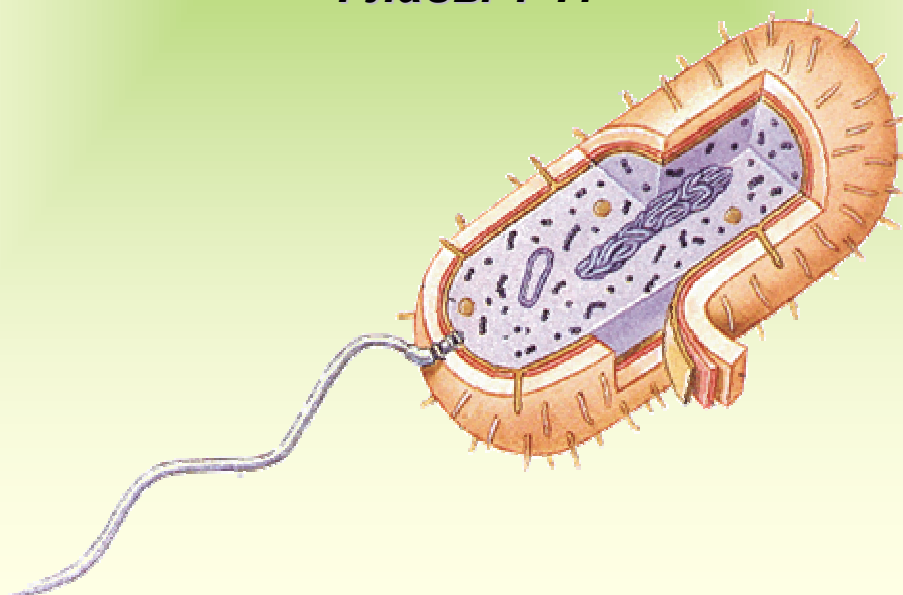


В.В. Лысак

МИКРОБИОЛОГИЯ

*Допечатное электронное ознакомительное
издание.
Главы 1-7.*



В.В. Лысак

МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебное пособие
для студентов биологических специальностей

МИНСК
БГУ
2005

УДК 576. 80. 85

Рецензенты:

Утверждено на заседании кафедры микробиологии _____ 2005
г., протокол №

Лысак В.В.

Микробиология: Учеб. пособие для студентов биологических специальностей / В.В. Лысак. - Мн.: БГУ, 2005. – ___ с.

В учебном пособии изложены: структурная организация бактериальной клетки, питание, особенности энергетического и конструктивного метаболизма микроорганизмов, генетика, систематика бактерий, взаимоотношение между микро- и макроорганизмами, биогеохимическая деятельность микроорганизмов. Кратко описаны методы культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях.

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

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие подготовлено на базе курса лекций, которые более двадцати лет читаются автором студентам биологического факультета Белорусского государственного университета. Цель пособия – представить современную информацию о состоянии микробиологической науки, включая сведения по биохимии, генетике, систематике бактерий, которые служат основой для проведения качественно новых исследований клеток прокариот и обеспечивают приоритетное развитие микробиологии.

Учитывая быстрые темпы развития науки, при подготовке учебного пособия автор столкнулся с несколькими проблемами. Первая из них связана с тем, что достижения современной микробиологии и смежных с ней дисциплин приводят к существенному увеличению объема и усложнению учебного материала, что неизбежно сказывается на объеме учебного пособия. Предлагаемый материал охватывает основные разделы изучения микроорганизмов с точки зрения исторического развития представлений о них, оценки экспериментальных подходов к исследованию их клеток, а также практического использования накопленных знаний и роли микроорганизмов в жизнедеятельности человека.

Вторая проблема заключается в том, что при подготовке учебного пособия следует учитывать исходный уровень знаний студентов по предмету. Кроме того, объем информации в учебном пособии должен определяться и возможностями студентов проработать его в процессе изучения предмета с учетом того, что они могут и должны пользоваться еще и другими методическими и учебными разработками. Автор старался стройно и логично изложить материал для лучшего его восприятия, провести рубрикацию текста, выделить по тексту определения основных понятий и другую особо важную информацию.

Нельзя не принять во внимание, что предлагаемые в библиотеках учебники не всегда имеются в достаточном количестве, да и часто они уже значительно устарели.

Материал пособия предназначен для студентов биологических факультетов университетов и призван обеспечить необходимый уровень их подготовки в соответствии с утвержденной программой. Отдельные разделы могут заинтересовать специалистов-биологов смежных дисциплин и позволят им расширить круг знаний о многообразной и масштабной деятельности микроорганизмов в формировании и поддержании устойчивости биосферы, их существенной роли в деятельности человека и использовании в народном хозяйстве.

Автор отдает себе отчет в том, что подготовка и написание учебного пособия – дело невероятно сложное и ответственное. Здесь неизбежны разного рода упущения и недочеты, и поэтому заранее благодарен за любые критические замечания, которые могут быть высказаны в адрес содержания этого учебного пособия.

Автор выражает искреннюю благодарность за неоценимую помощь в работе над учебным пособием профессору кафедры микробиологии Белорусского государственного университета Ю.К. Фомичеву, доценту Р.А. Желдаковой и методисту Н.В. Авдеенко за техническую подготовку рукописи.

ВВЕДЕНИЕ

1. Предмет и задачи микробиологии

Микробиология (от греч. *micros* – малый, *bios* – жизнь, *logos* – наука) – наука о микроскопически малых существах, называемых микроорганизмами. Микробиология изучает морфологию, физиологию, биохимию, систематику, генетику и экологию микроорганизмов, их роль и значение в круговороте веществ, в экономике, в патологии человека, животных и растений.

К микроорганизмам относятся преимущественно одноклеточные организмы – бактерии, микроскопические грибы и водоросли, простейшие, а также организмы с неклеточной организацией – вирусы. Предметом изучения микробиологии традиционно служат в основном бактерии, а также в общем плане организации рассматриваются вирусы.

Микроорганизмы – в таксономическом отношении очень неоднородная группа, представители которой отличаются друг от друга морфологией, строением, физиологией, типами конструктивного и энергетического метаболизма, а также особенностями питания, но общим их признаком является малая величина особей. Например, в среднем линейные размеры бактерий находятся в пределах 0,5 – 3 мкм, но есть среди бактерий и свои «гиганты» и «карлики». В частности, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa alba* имеют диаметр до 500 мкм; бактерии *Achromatium oxaliferum* имеют в длину 15–100 мкм при поперечнике примерно 5–33 мкм, а длина клеток спирохет может быть до 250 мкм. Самые мелкие из известных бактерий – микоплазмы, имеющие диаметр клеток 0,1–0,15 мкм. Размеры дрожжей, мицелиальных грибов, простейших и водорослей находятся в пределах 10–100 мкм.

У микроорганизмов, в силу их малых размеров, очень велико отношение площади поверхности клетки к ее объему, что создает благоприятные условия для активного обмена с внешней средой. Показано, что метаболическая активность микроорганизмов в расчете на единицу биомассы намного выше, чем у более крупных клеток растений и животных.

Одной из наиболее существенных особенностей микроорганизмов является высокая пластичность их метаболизма, что приводит к легкости приспособления к меняющимся условиям окружающей среды. Указанное свойство также связано с малыми размерами клеток. Клетки микроорганизмов могут вместить в себя только несколько сотен тысяч белковых молекул. Поэтому не нужные в данных условиях су-

существования ферменты не могут в клетках микроорганизмов содержаться про запас. Они синтезируются только тогда, когда соответствующее питательное вещество (субстрат) появляется в среде. Такие ферменты называются **индуцибельными**, они могут составлять до 10% общего белка, содержащегося в клетке в данный момент времени. Таким образом, для микроорганизмов характерно большее разнообразие ферментных систем и более мобильные способы регуляции обмена веществ, чем для макроорганизмов.

Другим следствием благодаря высокой пластичности метаболизма микроорганизмов является, по определению В.И.Вернадского, их «всюдность». Их можно обнаружить в арктических областях, в горячих источниках, в высоких слоях атмосферы, в шахтах с высоким содержанием сероводорода и т.д., чем они отличаются от практически всех растений и животных, которые часто распространены лишь на отдельных континентах или в географических зонах.

Отличительным свойством микроорганизмов является также их способность к быстрому размножению. В оптимальных условиях, например, бактерии *Escherichia coli* могут делиться каждые 20 мин.

У микроорганизмов отсутствует дифференцировка на ткани и органы, что делает их непохожими на растения и животные.

В соответствии с современными принципами классификации все микроорганизмы в зависимости от строения клетки делятся на эукариотические (истинноядерные) и прокариотические (доядерные) (табл. 1). К эукариотическим микроорганизмам относятся водоросли, грибы и простейшие, к прокариотическим – бактерии.

Кроме строения клетки прокариотические и эукариотические микроорганизмы различаются по другим признакам:

- прокариотические микроорганизмы морфологически относительно слабо дифференцированы, поэтому основными формами бактерий, за немногими исключениями, считаются кокки, прямые и изогнутые палочки;

- многие группы прокариот способны существовать только в анаэробных условиях (без доступа молекулярного кислорода), получая необходимую для роста энергию в результате брожения или анаэробного дыхания;

- значительное количество бактерий могут специфически получать энергию путем окисления неорганических веществ;

- большая группа бактерий (фототрофные) обладает способностью использовать энергию солнечного света и строить необходимые им вещества либо из органических соединений, либо из углекислоты;

- среди бактерий различных таксономических групп широко распространена способность к фиксации молекулярного азота;

- у подавляющего большинства бактерий размножение осуществляется путем бинарного поперечного деления, приводящего к образованию двух одинаковых дочерних клеток. Деление клеток бактерий начинается, как правило, после завершения цикла репликации ДНК. У большинства грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущего от периферии к центру. Поперечная перегородка формируется из цитоплазматической мембраны и пептидогликанового слоя. Расхождение образовавшихся дочерних клеток происходит в результате лизиса срединного слоя поперечной перегородки с помощью ферментов автолизиннов. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки, которая формируется при сужении в центральной части клетки цитоплазматической мембраны и клеточной стенки. Диаметр клетки в центре постепенно уменьшается, как будто кто-то перетягивает ее пополам. Отверстие между образовавшимися отсеками становится уже, пока, наконец, не исчезнет совсем и перетяжка не разделит клетку на две части.

Для представителей группы почкующихся бактерий, а также многих цианобактерий характерен другой способ размножения – почкование. При этом в определенном месте на поверхности клетки образуется почка, в которую переходит копия нуклеоида. Почка разрастается в дочернюю клетку и отделяется от материнской клетки.

Некоторые одноклеточные цианобактерии размножаются путем множественного деления. Оно начинается с предварительной репликации хромосомы и увеличения размеров вегетативной клетки, которая затем претерпевает ряд быстрых последовательных бинарных делений, происходящих внутри клетки. Это приводит к образованию большого количества мелких клеток, получивших название **баеоцитов**. Освобождение баеоцитов происходит путем разрыва материнской клеточной стенки. Таким образом, в основе множественного деления лежит принцип равновеликого бинарного деления. Отличие его от бинарного деления обычного типа состоит в том, что при множественном делении после бинарного деления не происходит роста образовавшихся дочерних клеток, они снова начинают делиться.

Актиномицеты размножаются либо фрагментами мицелия, либо путем образования неполовых спор. Эти способы размножения характерны для эукариотических микроорганизмов, однако отличаются от них тем, что у последних этим процессам предшествует митотическое деление ядра, а у бактерий митоз отсутствует.

Таблица 1

Различия в строении клеток прокариот и эукариот

| Признак | Прокариотическая клетка | Эукариотическая клетка |
|---|---|--|
| Организация генетического материала | Нуклеоид, состоящий чаще всего из одной замкнутой в кольцо или линейной хромосомы. Имеются гистоподобные белки. Гены не несут интронов (за исключением архебактерий). Гены организованы в опероны | Ядро, содержащее обычно более одной хромосомы. Есть белки гистоны. Гены имеют экзонно-интронную организацию. Опероны отсутствуют |
| Локализация ДНК | В нуклеоиде и плаزمиде | В ядре и некоторых органеллах |
| Цитоплазматические органеллы | Отсутствуют (кроме рибосом) | Имеются |
| Рибосомы в цитоплазме | 70S-типа | 80S-типа |
| Движение цитоплазмы | Отсутствуют | Имеется |
| Жгутики | Состоят из одной фибриллы, построенной из субъединиц белка флагеллина | Состоят из микротрубочек, собранных в группы |
| Компартментализация клеток | Слабо выражена | Клетка разделена мембранами на отдельные отсеки |
| Клеточная стенка (там, где она имеется) | Содержит пептидогликан муреин (за исключением архебактерий) | Пептидогликан муреин отсутствует |

2. Значение микроорганизмов в природе и жизни человека

Повсеместное распространение, быстрое размножение и особенности метаболизма микроорганизмов накладывает отпечаток на жизнь всей планеты.

Процессы, в которых принимают участие микроорганизмы, прежде всего являются определяющими и необходимыми звеньями круговорота таких элементов как углерод, азот, сера, фосфор, а также других биогенных элементов. Без микроорганизмов приостановился бы круговорот веществ в природе и жизнь на Земле стала бы невозможной.

Микроорганизмы первыми поселяются на материнской горной породе и обуславливают почвообразовательные процессы. Образуя в процессе жизнедеятельности минеральные и органические кислоты, микроорганизмы ускоряют процессы растворения и выветривания горных пород, вовлечения освобожденных минералов в биологический круговорот. Микроорганизмы участвуют и в образовании гуму-

са, определяющего основное свойство почвы – плодородие. С другой стороны жизнедеятельность микроорганизмов обеспечивает доступность гумуса для растений.

Особую роль в формировании и поддержании плодородия почвы играют бактерии, участвующие в круговороте азота в природе. Это азотфиксирующие бактерии, которые превращают недоступный для растений молекулярный азот атмосферного воздуха в связанный, обогащая тем самым почву соединениями азота. Немаловажным этапом круговорота азота в природе является возвращение минерального азота в атмосферу, который осуществляют денитрифицирующие бактерии в процессе нитратного (анаэробного) дыхания. Если бы этот цикл не был замкнут, то окисленные формы азота вымывались бы из почвы в моря и океаны, оставаясь в них недоступными для растений. Кроме того, образующиеся в процессе денитрификации окислы азота участвуют в поддержании озонового слоя планеты.

Многие микроорганизмы образуют в процессе метаболизма и выделяют во внешнюю среду различные органические и неорганические кислоты, под действием которых нерастворимые в воде соли переходят в растворимую форму, благодаря чему улучшается питание растений.

Микроорганизмы-редуценты – «санитары» природы. Они осуществляют разложение мертвых остатков растений и животных и превращают их в минеральные вещества. Минерализация органических веществ имеет большое значение, так как при этом необходимые зеленым растениям элементы переходят из недоступной для них формы в доступную. Кроме того, микроорганизмы способны осуществлять деградацию отдельных, искусственно синтезированных человеком, органических веществ (ксенобиотиков) – пестицидов, гербицидов, поверхностноактивных веществ, составляющих упаковочных материалов, нафталина, толуолов и др. Если бы это не происходило, то ксенобиотики бесконечно накапливались бы в окружающей среде, загрязняя ее.

Микроорганизмы принимают активное участие в биологическом самоочищении водоемов, выполняя функцию по обезвреживанию и окислительной переработке поступающих в водоем загрязняющих веществ. Широко используются микроорганизмы и в системах биологической очистки сточных вод. Биологическая очистка сточных вод производится на полях орошения и полях фильтрации, куда спускаются подлежащие очистке воды. Просачиваясь через слои почвы, они подвергаются окислительному воздействию целого комплекса почвенных микроорганизмов, в результате чего содержащиеся органические

ские вещества полностью минерализуются. В настоящее время в связи с высоким уровнем развития промышленности и огромным количеством образующихся сточных вод, создаются специальные сооружения аэробной биологической очистки – биотенки, аэрофилтры и аэротенки.

Человек с древних времен интуитивно использовал уникальные особенности микроорганизмов, даже не подозревая об этом. С давних пор процессы брожения применялись при приготовлении теста для хлеба, пива, вина, уксуса, кисломолочных продуктов, росяной моче льна. Это только в настоящее время стало известно, что все эти процессы происходят при участии определенных микроорганизмов, которые присутствуют на используемых для брожения субстратах.

Изучение биосинтетической деятельности микроорганизмов позволило установить их способность к синтезу самых разнообразных соединений, имеющих большое народнохозяйственное значение. В настоящее время с помощью микроорганизмов в промышленных масштабах получают: микробный белок, аминокислоты (глутаминовая, треонин, лизин, пролин, глутамин), витамины (В₁₂, рибофлавин), ферменты (амилазы, пектиназы, протеиназы, целлюлазы, липазы, изомеразы, трипсины), интерферон, инсулин, гормон роста человека, органические кислоты (лимонную, молочную, масляную, уксусную, глюконовую), этанол, глицерин, ацетон, бутанол, пропанол, бутандиол, полисахариды (декстраны, ксантаны, пуллулан, альгинат), средства защиты растений, антибиотики, стероиды, каротиноиды, нуклеотиды, кортизон, преднизалон, гидрокортизон и ряд других ценных продуктов.

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

Особо следует отметить, что микробиология внедрилась в такие традиционно небιологические производства, как получение энергетического сырья (биогаз метан), добыча нефти, что вносит существенный вклад в решение топливно-энергетической проблемы. Микроорганизмы способны повышать прочность бетона: установлено, что добавление на тонну бетона нескольких килограммов биомассы микроорганизмов повышает прочность и пластичность строительного материала.

Успехи в области микробиологии открыли новые возможности в профилактике и лечении многих инфекционных заболеваний, в борьбе с которыми ранее медицина была бессильна. За сравнительно небольшой период времени почти полностью ликвидированы такие заболевания как чума, оспа, холера, малярия, являющиеся в прошлом бичом человечества. В настоящее время внимание микробиологов сосредоточено на проблеме злокачественных опухолей и синдроме приобретенного иммунитета. Изучение свойств патогенных микроорганизмов позволило получать в промышленных масштабах вакцины, сыворотки и другие лечебные препараты.

Таким образом, микробиология вносит существенный вклад в решение многих практических задач, проблем здравоохранения и сельского хозяйства, способствует развитию определенных отраслей промышленности.

Следует отметить, что еще имеются большие возможности, основанные на применении микроорганизмов, для расширения и совершенствования биотехнологических процессов. Решение таких актуальных проблем как обеспечение человечества продуктами питания, возобновление энергетических ресурсов, охрана окружающей среды так или иначе будет связано с использованием микроорганизмов.

3. История развития микробиологии

Открытие микроорганизмов связано с именем голландского естествоиспытателя **Антони Ван Левенгука (1632-1723)**, который заин-



Антони Ван
Левенгук
(1632-1723)

тересовавшись строением льняного волокна отшлифовал несколько грубых линз. Позднее он достиг большого совершенства в деле изготовления линз и назвал их «микроскопиями».

Микроскопы А. Ван Левенгука, несмотря на простоту конструкции, давали хорошее изображение при увеличении примерно от 50 до 300 раз. С помощью этих микроскопов он рассматривал все, что попадалось под руку: воду из пруда, зубной налет, слюну, кровь, настой перца и многое другое. Результаты своих наблюдений он посылал в Лондонское королевское общество. В своих письмах он сообщал, что окружающий нас мир густо населен микроскопическими обитателями, которые он назвал живыми маленькими животны-

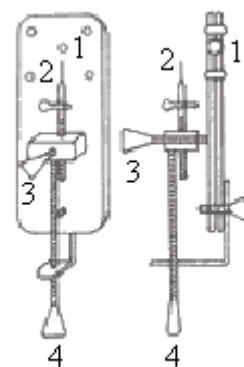


Рис. 1. Устройство одного из микроскопов А. ван Левенгука: 1 – линза; 2 – булавка, к которой прикрепляется объект; 3 и 4 – фокусирующие винты

ми – «анималькулями». А. Ван Левенгук был убежден, что микроорганизмы устроены так же, как и макроорганизмы, т.е. имеют органы пищеварения, ножки, хвостики и др.

Открытие А. Ван Левенгука привлекло всеобщее внимание. Оно явилось основой развития микробиологии, изучения форм микроорганизмов и их распространения во внешней среде. Это был морфологический или описательный период развития микробиологии, который продолжался с конца XVII до середины XX вв. Этот период для микробиологии был малопродуктивным, так как оптические приборы того времени не позволяли отличить один вид микроорганизма от другого, не могли дать представление о биологических свойствах и роли микроорганизмов в природе.



Луи Пастер
(1822-1895)

Начало изучению физиологии и биохимии микроорганизмов, выяснению их роли в природе и жизни человека положил французский ученый **Луи Пастер** (1822 - 1895). С его работ начался физиологический период микробиологии. Пастер Л. впервые в противоположность мнению химиков показал, что процессы брожения и гниения обуславливаются жизнедеятельностью микроорганизмов, специфических для каждого вида брожения. Он установил, что эти процессы могут осуществляться без доступа молекулярного кислорода в анаэробных условиях. Таким образом, Л.Пастер открыл принципиально новое биологическое явление – анаэробноз. Благодаря своим исследованиям Л.Пастер смог установить природу «болезней» вина и пива, показав, что их скисание и прогоркание также является результатом жизнедеятельности микроорганизмов. Он предложил также способ предохранения вина и пива от скисания и прогоркания (способ борьбы с контаминацией пищевых продуктов) – их кратковременный прогрев до температуры 70 – 80 °С, названный впоследствии пастеризацией.

К области теоретических открытий Л.Пастера относятся его работы о невозможности самозарождения жизни. Оппоненты Л.Пастера утверждали, что в субстратах, подвергающихся брожению или гниению, их возбудители самозарождаются. Безупречными экспериментами Л.Пастер показал, что в сосудах со стерильным бульоном, закрытых ватными пробками во избежание контакта с воздухом, самозарождение микроорганизмов невозможно. Рост микроорганизмов наблюдается тогда, когда в сосуд с питательной средой попадает воздух, содержащий микроорганизмы, или питательная среда подвергается недостаточной термической обработке, при которой не погибают устойчивые к температуре споры бактерий.

Неоценимый вклад внес Л.Пастер в медицинскую микробиологию. В процессе исследований он установил, что не только брожение, болезни пива и вина, шелковичных червей обусловлены жизнедеятельностью микроорганизмов, но и многие болезни человека и животных также вызываются микроорганизмами. Они, подобно возбудителям брожения, очень специфичны: каждый вид патогенных микроорганизмов вызывает строго определенное заболевание. Патером Л. была доказана микробная природа таких заболеваний человека и животных, как сибирская язва, куриная холера, бешенство. Кроме того, Л.Пастер разработал способ борьбы с возбудителями этих заболеваний с помощью вакцин – культур патогенных микроорганизмов с ослабленными вирулентными свойствами.

Пастер Л. с полным основанием может считаться основоположником общей, промышленной, медицинской и ветеринарной микробиологии.

Прогресс микробиологии в конце XIX столетия был неразрывно связан с работами знаменитого немецкого ученого **Роберта Коха**

(1843-1910), занимавшегося изучением возбудителей инфекционных заболеваний. Свои исследования Р.Кох начал с изучения сибирской язвы и показал, что возбудителями этого заболевания являются бактерии вида *Bacillus anthracis*. Позже он открыл возбудителей туберкулеза (бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis*),



Роберт Кох
(1843-1910)

которые в его честь были названы «палочкой Коха». В 1905 году Р.Коху за исследования туберкулеза была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Кохом Р. и его учениками были открыты возбудители и других заболеваний – азиатской холеры, дифтерии, брюшного тифа, столбняка, гонореи. Исследования специфических возбудителей позволили Р.Коху сформулировать ряд подходов, необходимых для идентификации возбудителя заболевания, которые вошли в историю медицинской микробиологии, как постулаты Коха:

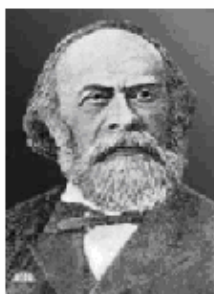
1. Микроорганизм обнаруживают в каждом случае конкретного предполагаемого заболевания, а также и в условиях, ответственных за патологические изменения и клиническое течение болезни;

2. Микроорганизм не выделяют при других болезнях как случайный или не патогенный паразит;

3. После изоляции из организма больного и выделения чистой культуры патогенный микроорганизм должен вызвать аналогичное заболевание у восприимчивого животного.

Кох Р. и его ученики обогатили микробиологию новыми методами исследований:

- разработали методы окраски микроорганизмов анилиновыми красителями;
- внесли усовершенствования в технику микроскопирования – конденсор Аббе и иммерсионные объективы, что дало возможность выявлять плохо различимые бактериальные формы;
- ввели в микробиологическую практику плотные питательные среды, на которых микроорганизмы способны формировать колонии, что в свою очередь позволяет невооруженным глазом определять количество жизнеспособных микроорганизмов в пробе. Для создания плотных питательных сред в качестве уплотнителя испробовали жидкость глаза убойного скота, крахмал, затем желатин и наконец агар-агар (вещество, состоящее из двух кислых полисахаридов – агарозы и агаропектина, содержащееся в клеточных стенках красных водорослей);
- разработали методику выделения чистых культур бактерий из изолированных колоний на плотных средах;
- разработали стеклянные емкости для культивирования микроорганизмов на плотных средах (стажер Р.Коха – Р.Петри), которые называются чашками Петри;
- внедрили в микробиологическую практику дезинфекцию, как способ удаления микроорганизмов с поверхностей.



Л.С.Ценковский
(1822-1887)

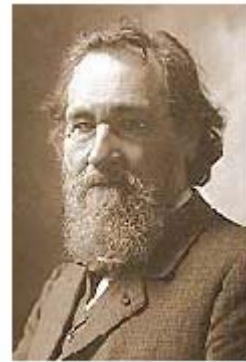
Родоначальником русской микробиологии является **Л.С.Ценковский** (1822-1887). Он впервые научно обоснованно дал классификацию микроорганизмов, установил близость бактерий к сине-зеленым водорослям. Ценковский Л.С. интересовался также проблемами медицинской микробиологии. Он создал вакцину против сибирской язвы, которая в его честь получила название «живая вакцина Ценковского» и до настоящего времени успешно применяется в ветеринарной практике.

Велика заслуга в развитии микробиологии **И.И.Мечникова** (1845-1916). Он открыл явление фагоцитоза и впервые показал, что защита организма от болезнетворных микроорганизмов – сложная биологическая реакция, в основе которой лежит способность фагоцитов захватывать и разрушать посторонние тела, попавшие в организм. В 1909 году за исследования по фагоцитозу И.И.Мечникову была присуждена Нобелевская премия в области иммунологии.

Исследования И.И.Мечникова не ограничивались фагоцитарной теорией. Он изучал патогенез холеры и биологию холероподобных

вибрионов, показал возможность заражения шимпанзе сифилисом и предложил метод лечения сифилиса каломейной мазью.

Мечников И.И. является также основоположником учения о микробном антагонизме, послужившем основой для развития науки об антибиотикотерапии. Он показал, что молочнокислые бактерии подавляют гнилостные бактерии. На принципе антагонизма он обосновал теорию долголетия и предложил для продления человеческой жизни использовать простоквашу, которая впоследствии получила название Мечниковской. В настоящее время эта теория подтверждена многочисленными экспериментами и положена в основу развития отдельной отрасли биотехнологии, связанной с получением и использованием пробиотиков. Пробиотиками называют живые культуры микроорганизмов (среди них преобладают молочнокислые бактерии), которые вводят в организм, обеспечивая заселение ими кишечного тракта. Развиваясь, эти культуры совершают благоприятную для макроорганизма деятельность.



И.И.Мечников
(1845-1916)

Соратником И.И.Мечникова был микробиолог и эпидемиолог **Н.Ф.Гамалея** (1859-1949), который внес большой вклад в изучение туберкулеза, холеры, бешенства, организовал в России первую бактериологическую станцию и ввел в практику вакцинацию людей против бешенства. Он создал также противохолерную и оспенную вакцины. Гамалея Н.Ф. впервые описал явление бактериофагии – разрушение бактериальных клеток под действием бактериофагов. Гамалея Н.Ф. считается не только одним из основоположников медицинской микробиологии, но и иммунологии и вирусологии, поэтому имя Н.Ф.Гамалеи присвоено Институту эпидемиологии и микробиологии в Москве.



Н.Ф.Гамалея
(1859-1949)

Большой вклад в развитие микробиологии внес **Д.И.Ивановский** (1864-1920), который в 1892 году открыл вирус, вызывающий мозаичную болезнь табака. Открытие Д.И.Ивановского послужило толчком к обнаружению возбудителей вирусных заболеваний человека и животных. Ивановский Д.И. по праву считается основоположником новой ветви микробиологии – вирусологии.



Д.И.Ивановский
(1864-1920)

Создание учения об экологии почвенных микроорганизмов неразрывно связано с именем выдающегося русского исследователя **С.Н.Виноградского** (1856-1953). Виноградский С.Н. внес значитель-



С.Н.Виноград-
ский
(1856-1953)

ный вклад в познание физиологического многообразия микроорганизмов. Он открыл процесс хемосинтеза, показав на примере нитрифицирующих бактерий, серобактерий и железобактерий, что в природе существуют микроорганизмы, способные извлекать энергию при окислении восстановленных неорганических соединений. Виноградский С.Н. доказал также, что автотрофные бактерии могут расти на минеральных средах, получая необходимую для этого роста энергию путем окисления восстановленных неорганических соединений и используя в качестве источника углерода углекислоту, т.е. им был открыт новый хемолитоавтотрофный тип питания микроорганизмов. Заслугой С.Н.Виноградского является и то, что он впервые выделил из почвы бактерии, способные фиксировать молекулярный азот, – анаэробные азотфиксирующие бактерии, названные им в честь Л.Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Для выделения в лабораторных условиях бактерий с определенными свойствами (определенной физиологической группы) С.Н.Виноградский предложил создавать специфические (элективные) условия, дающие возможность преимущественного развития данной группы микроорганизмов, т.е. им был разработан метод накопительных культур.

Виноградским С.Н. опубликовано свыше 300 научных работ по экологии и физиологии почвенных микроорганизмов и поэтому его по праву считают родоначальником почвенной микробиологии.

Принцип выделения микроорганизмов, основанный на методе накопительных культур, был успешно развит голландским микробиологом **М.Бейеринком** (1851-1931). Он впервые выделил из почвы чистые культуры клубеньковых бактерий (симбиотических азотфиксаторов) и аэробных свободноживущих азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum*. Кроме того, М.Бейеринк выделил чистые культуры сульфатредуцирующих бактерий, которые составляют важное звено в круговороте серы. Ему принадлежат работы по изучению процесса денитрификации и ферментов разных групп микроорганизмов.



М.Бейеринк
(1851-1931)

Ученик С.Н.Виноградского **В.Л.Омелянский** (1867-1928) много сделал для изучения нитрифицирующих, азотфиксирующих и пекти-

нолитических бактерий. Он впервые выделил целлюлозоразрушающие бактерии, описал их физиологию и химизм брожения клетчатки. Омелянский В.Л. написал первый учебник по микробиологии на русском языке.



В.Л.Омелянский
(1867-1928)

Таким образом, выдающиеся ученые во второй половине XIX века заложили прочный фундамент общей микробиологии, на котором в XX веке эта наука достигла расцвета.

Развитие микробиологии в XX веке ознаменовалось крупными открытиями в области биохимии и генетики микроорганизмов. Так, в 1925 году **Г.А.Надсон** (1867-1940) впервые получил индуцированные мутации дрожжей последствием облучения клеток рентгеновскими лучами. Он также изучал роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе и их геологическую деятельность.

В середине 50 гг. **А.Клюйвер** (1888-1956) и **К. ван Ниль** (1897-1985) провели сравнительное биохимическое изучение относительно далеко отстоящих друг от друга физиологических групп микроорганизмов. Они обнаружили, что закономерности процессов энергетического и конструктивного метаболизма для всех микроорганизмов едины. На основании этого А.Клюйвер и К. ван Ниль сформулировали основы теории биохимического единства жизни.

В 1941 году американские исследователи **Дж.Бидл** и **Э.Татум**, изучая проявления индуцированных мутаций у грибов рода *Neurospora*, сумели приблизиться к пониманию функций генов и сформулировали свой знаменитый постулат «один ген – один фермент». Это открытие совпало во времени с серией достижений генетики микроорганизмов, и его можно считать началом «генетического» периода в истории развития микробиологии.

В 1944 году американские ученые **О.Эвери**, **К.Мак-Леод** и **М.Мак-Карти** доказали роль ДНК в хранении и передаче наследственной информации, осуществив эксперименты по генетической трансформации у бактерий.

Исследования **Дж. Ледерберга**, **Э.Татума** и **Н.Циндера** в период с 1946 по 1952 гг. показали наличие половой дифференциации у бактерий. Они открыли и изучили трансдукцию и конъюгацию, а также закономерности рекомбинации генетического материала у бактерий при этих способах обмена генетической информацией.

В 1953 году **Дж.Уотсон** и **Фр.Крик** расшифровали строение молекулы ДНК, раскрыли генетический код, механизмы репликации ДНК и регуляции синтеза белка.

Успехи в области генетики микроорганизмов обусловили развитие ее нового направления – молекулярной генетики, являющейся основой генетической инженерии. К настоящему времени генетическая инженерия внесла потенциально новые идеи и методы в производство широкого спектра биологически активных веществ. Открытия и достижения, полученные на микроорганизмах, явились также основой для возникновения таких новых научных направлений, как молекулярная биология, молекулярная биотехнология, молекулярная вирусология, белковая инженерия и др.

Современный период развития микробиологии тесно связан с научно-техническим прогрессом, потребностями народного хозяйства и здравоохранения. Он характеризуется комплексностью исследований, направленных как на решение общебиологических проблем, так и задач, связанных с рациональным использованием природных ресурсов, охраной окружающей среды, развитием сельского хозяйства, здравоохранения, микробиологической, горнодобывающей и биотехнологической промышленности.

Глава 1. СИСТЕМАТИКА БАКТЕРИЙ

1.1. Принципы систематики

Систематика (таксономия) бактерий является не только одним из наиболее важных и сложных, но и менее разработанных разделов микробиологии. Задачами систематики являются: классификация, номенклатура и идентификация организмов. **Классификация** – распределение множества организмов по группам (таксонам). **Номенклатура** – присвоение названия отдельным группам и микроорганизмам. В систематике бактерий, также как в ботанике и зоологии, принята бинарная номенклатура, согласно которой бактериям присваивается название, состоящее из двух слов: первое определяет их принадлежность к определенному роду, второе – виду. Например, *Clostridium tetani* и *Clostridium botulinum* – два различных вида бактерий, относящихся к одному роду. Названия бактериям присваивают в соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры бактерий.

Основной таксономической категорией является вид. Виды объединяют в роды, роды – в семейства, семейства – в порядки, далее следуют классы, отделы, царства. В микробиологии существуют также более мелкие таксономические единицы чем вид: подвид (*subspeciens*), разновидность. Подвиды могут различаться по физиологическим (*biovar*), морфологическим (*morphovar*), или по антигенным свойствам (*serovar*). Большое значение в микробиологии имеют такие понятия, как **клон** – чистая культура, полученная из одной клетки, и **штаммы** – культуры бактерий одного вида, выделенные из различных источников или из одного источника в разное время, или полученных в ходе генетических манипуляций. Разные штаммы одного и того же вида бактерий могут отличаться друг от друга по целому ряду свойств, например по чувствительности к антибиотикам, способности к синтезу токсинов, ферментов и др.

Идентификация устанавливает принадлежность микроорганизмов к определенному таксону на основании наличия конкретных признаков. В большинстве случаев идентификация заключается в определении родовой и видовой принадлежности микроорганизмов.

Определение бактерий до вида важно не только с позиции чисто познавательной, общебиологической, но и связано с решением ряда прикладных и научных задач. Особенно это важно для медицинской, ветеринарной и промышленной микробиологии, где действующими объектами являются микроорганизмы и мельчайшие неточности в определении вида могут привести к нежелательным последствиям.

В настоящее время в микробиологии приняты два различных подхода к систематике, обуславливающих существование двух систем классификации: филогенетической (естественной) и фенотипической (искусственной). В основу филогенетической классификации положена идея создания системы прокариот, объективно отражающей родственные отношения между разными группами бактерий и историю их эволюционного развития. Фенотипическая классификация преследует, в первую очередь, практические цели, заключающиеся в том, чтобы быстрее установить принадлежность микроорганизма к определенному таксону. Наиболее четко последняя получила своё выражение в «Определителе бактерий Берджи» («Bergey's Manual of Determinative Bacteriology»), периодически издаваемом Обществом американских бактериологов с привлечением к его написанию крупных специалистов из других стран, изучающих те или иные группы бактерий. Первое издание определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д.Х.Берджи; девятое издание в русском переводе вышло в 1997 г.

При классификации бактерий учитывается большое количество различных свойств и признаков. Свойства и признаки, характерные для всех бактерий данной группы и не характерные для микроорганизмов других групп, называют **критериями систематики**. Чем больше общих признаков имеют сравниваемые организмы, тем больше и оснований для включения их в одну таксономическую группу. В связи с тем, что количество признаков, используемых для классификации микроорганизмов, значительно возросло, в конце 50-х годов XX в. возникла нумерическая (численная) таксономия, основанная на принципах классификации французского ботаника М.Адансона (1757). В основе нумерической таксономии лежит принцип сопоставления организмов по возможно большему количеству учитываемых признаков при допущении, что все они для систематики равноценны. Однако допущение о равнозначности всех признаков является и основным недостатком нумерической таксономии.

При идентификации бактерий возможно использование генетических (молекулярно-биологических), фенотипических и серологических подходов и критериев систематики.

1.2. Генетические критерии систематики

Наиболее объективными и дающими представление о филогенетических связях между микроорганизмами являются генетические (молекулярно-биологические) критерии. К ним относятся: определение относительного содержания ГЦ-пар в ДНК, гибридизация нуклеино-

вых кислот, определение нуклеотидных последовательностей в молекулах ДНК или РНК, применение генетических зондов (ДНК-зондов), рестрикционный анализ ДНК, методы генетического анализа (изучение переноса генов, генетических скрещиваний, картирование хромосом бактерий и др.).

Относительное содержание ГЦ-пар в ДНК представляет собой стабильный признак бактерий, не зависящий ни от возраста, ни от условий культивирования, ни от отдельных перестроек генов в хромосоме (т.е. данное свойство практически не изменяется под влиянием большинства мутаций).

Молекулы ДНК разных микроорганизмов отличаются друг от друга относительным содержанием пуриновых и пиримидиновых оснований, которые формируют комплементарные пары в антипараллельных цепях ДНК. Близкородственные микроорганизмы имеют идентичное или схожее содержание ГЦ-пар в ДНК, а далеко отстоящие в генетическом отношении сильно отличаются по относительному содержанию этих азотистых оснований. Определение молярного содержания ГЦ-оснований у широкого круга прокариот показало, что оно колеблется в широких пределах: от 25 до 80 мол.%. В то же время, например, у разных видов бактерий рода *Pseudomonas* содержание ГЦ-пар в ДНК имеет близкие величины – от 61,8 до 69,5 мол.% от общего количества оснований. Следовательно, каждый вид бактерий имеет ДНК с характерным средним содержанием ГЦ-пар, и эту величину можно рассматривать как один из важных признаков вида.

Нуклеотидный состав ДНК бактерий можно определить химическими и физическими методами. К химическим относится метод хроматографии на бумаге. Определение состава ДНК этим методом состоит из следующих основных этапов: выделение ДНК, ее гидролиз до азотистых оснований, разделения их с помощью хроматографии на бумаге, элюирование оснований с бумаги и последующая ультрафиолетовая спектрофотометрия. Хотя этот метод довольно длителен и трудоемок, он позволяет определить непосредственное соотношение азотистых оснований в ДНК, в то время как в других методах расчеты ГЦ- или АТ-содержания основаны на косвенных данных. Метод хроматографии на бумаге является классическим методом определения нуклеотидного состава ДНК, в сравнении с которым можно выявить точность и корректность использования других.

К физическим относятся методы определения содержания азотистых оснований по температуре плавления ДНК и метод ультрацентрифугирования ДНК в градиенте плотности хлористого цезия.

Установлено, что имеется прямая зависимость между содержанием ГЦ-пар в молекуле ДНК и температурой ее плавления. **Температура плавления ДНК** – это температура, при которой происходит ее денатурация в результате разрыва водородных связей между азотистыми основаниями. Поскольку число водородных связей между гуанином и цитозином больше, чем между основаниями в парах АТ, то чем выше содержание ГЦ-пар в ДНК, тем выше температура ее плавления. Следовательно, температура плавления любой ДНК служит показателем ее нуклеотидного состава.

Разделение цепей сопровождается заметным увеличением оптической плотности при 260 нм, т.е. в максимуме поглощения в УФ-свете ДНК, что легко измерить спектрофотометрически. При постепенном нагревании образца ДНК поглощение увеличивается по мере разрыва водородных связей и достигает плато при температуре, при которой ДНК становится полностью одноцепочечной (рис. 2).

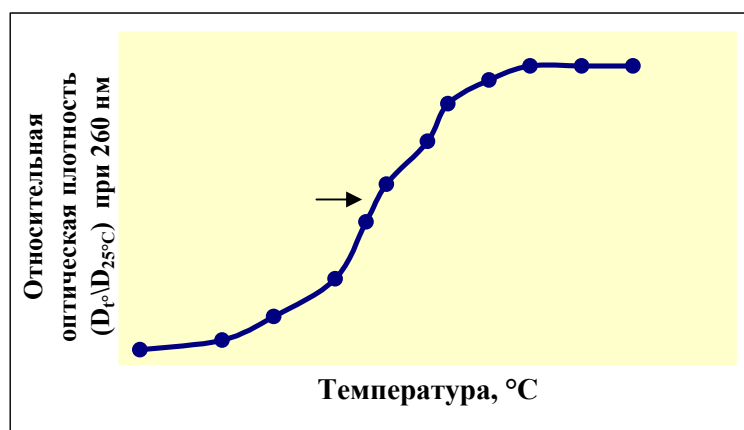


Рис. 2. Зависимость поглощения ДНК от температуры

Средняя точка на кривой возрастания поглощения (указана на рисунке стрелкой) – температура плавления (Т_{пл.}) – служит мерой содержания ГЦ-оснований, а нуклеотидный состав ДНК определяется по формуле:

$$(Г + Ц) \% = (Т_{пл.} - 69,3^{\circ}) \cdot 2,439.$$

Метод ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия основан на том, что имеется линейная зависимость между плотностью ДНК и содержанием в ней ГЦ-пар оснований. Препарат ДНК добавляют к концентрированному раствору CsCl и центрифугируют в течение 24 ч. Установившееся за это время распределение ДНК в градиенте хлористого цезия зависит от плотности. При определении нуклеотидного состава ДНК по градиенту плотности в CsCl в качестве стандарта используют ДНК с заведомо известной плотно-

стью. Использование этого метода ограничено из-за сложности оборудования.

Существуют другие методы определения нуклеотидного состава ДНК: при помощи бромирования оснований, депуринизации, спектрального анализа, электрофореза в полиакриламидном геле и др., но они не нашли широкого применения, в основном, из-за высокой требовательности к качеству исследуемых препаратов ДНК и недостаточной точности.

Более тонким методом оценки генетического сходства организмов является **метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот**, с помощью которого определяют число и степень сходства гомологичных участков в геномах сравниваемых видов. Главным достоинством этого метода является то, что он впервые позволил получить количественную оценку родства микроорганизмов. В основе метода гибридизации лежит способность денатурированных (одноцепочечных) ДНК в подходящих условиях реассоциировать, т.е. соединяться с образованием двухцепочечных молекул ДНК. Для этого ДНК, выделенную из клеток одного микроорганизма, денатурируют нагреванием. Клетки другого штамма выращивают в среде, содержащей радиоактивный предшественник ДНК (^3H , ^{14}C), в результате включения которого она становится меченой. Из клеток этого штамма выделяют ДНК, денатурируют ее и смешивают с денатурированной ДНК первого штамма. Раствор выдерживают при температуре ниже температуры плавления ДНК. При этом происходит «отжиг» или специфическая реассоциация комплементарных цепей с образованием двухцепочечных гибридных молекул ДНК. Остаточные после «отжига» одноцепочечные ДНК удаляют обработкой ДНКазой. Гибридные молекулы можно обнаружить путем центрифугирования препарата в градиенте CsCl , где они образуют полосы, занимающие промежуточное положение между «легкими» и «мечеными» молекулами двухспиральной ДНК.

При проведении аналогичных экспериментов с препаратами ДНК из двух неродственных бактерий никакой гибридизации не выявляется; после «отжига» двойные спирали образуются при специфическом спаривании только тех цепей, которые первоначально были получены из одной и той же молекулы ДНК.

Однако оценка гомологии на основе метода центрифугирования в градиенте плотности слишком громоздка для повседневного использования и, кроме того, позволяет обнаружить реассоциацию только тех комплементарных цепей, которые обладают очень высокой гомологией. Для измерения реассоциации молекул нуклеиновых кислот

был разработан ряд более простых методов. Все они основаны на том, что образование двойных спиралей ДНК должно происходить при использовании двух разных образцов денатурированной ДНК, один из которых помечен радиоактивным изотопом; необходимо отделение двойных спиралей от остаточной одноцепочечной нуклеиновой кислоты и измерение радиоактивности двойных спиралей.

Простейший повсеместно используемый способ изучения реассоциации нуклеиновых кислот – метод с применением колонки, содержащей гидроксилapatит. Гидроксилapatит представляет собой гель фосфата кальция, который при определенных условиях специфически адсорбирует только двойные, но не одиночные цепи нуклеиновых кислот. Гибридизационную смесь пропускают через колонку, которую затем промывают для удаления из нее одноцепочечных молекул. Адсорбированные двойные спирали элюируют и в элюате определяют радиоактивность. Для этого метода необходимо присутствие очень большого избытка немеченой ДНК (в несколько тысяч раз превышающего количество меченой ДНК), чтобы предотвратить реассоциацию меченых комплементарных цепей.

В экспериментах по реассоциации любого типа должны быть стандартизированы температурные условия, ионная сила раствора и средняя длина фрагментов ДНК, так как все эти факторы влияют на возможность образования двойных спиралей.

Следует отметить, что метод молекулярной гибридизации ДНК не всегда может быть использован для определения родственных связей между эволюционно далекими группами бактерий. Существует определенный уровень дивергенции нуклеотидных последовательностей ДНК, ниже которого образование гибридных молекул не происходит. В таком случае изучают реассоциации ДНК – рРНК. Этот метод позволяет значительно расширить список организмов, у которых можно определить генетическую гомологию, благодаря тому, что на относительно небольшом участке бактериального генома, кодирующем рибосомные РНК, исходная последовательность оснований сохраняется значительно полнее, чем в основной массе хромосомной ДНК. В итоге путем реассоциации ДНК – рРНК часто можно обнаружить довольно высокую гомологию геномов двух бактерий, у которых реассоциация ДНК – ДНК не выявляет заметной гомологии.

Как уже отмечалось, сравнивать генотипы бактерий можно с помощью **методов генетического анализа**. Известно, что перенос генетической информации и рекомбинации ее с ДНК реципиента может происходить только между двумя родственными организмами. Осуществлению межвидового, межродового переноса генов могут пре-

пятствовать внешние барьеры: например, различия в строении поверхностных структур клеток, что мешает их конъюгации или необходимому для трансдукции прикреплению бактериофага. Таким же препятствием является ферментативное расщепление «чужой» ДНК после ее проникновения в клетку в результате рестрикции со стороны хозяина. Образование генетических рекомбинантов служит значительно более точным показателем уровня генетической гомологии, чем гибридизация *in vitro*, поскольку включение каждого отдельного фрагмента молекулы ДНК донора зависит от степени его гомологии с ДНК реципиента именно в том небольшом специфическом участке хромосомы, в котором должна произойти рекомбинация.

В последние годы в таксономических исследованиях нашел применение новый метод изучения строения генома бактерий – **рестрикционное картирование**. Ферменты рестриктазы способны распознавать специфические нуклеотидные последовательности и только в строго определенных участках (сайтах рестрикции) «разрезать» молекулы ДНК на фрагменты (рестрикты). Фрагменты ДНК – продукты расщепления, разделенные с помощью электрофореза в агарозном геле, дают существенную информацию о типе и количестве специфических нуклеотидных последовательностей в хромосомах изучаемых организмов и позволяют судить об их сходстве или различии. Этот метод привлекателен в силу того, что дает возможность выявить сравнительно тонкие различия в последовательностях нуклеотидов ДНК и поэтому он может использоваться для дифференциации микроорганизмов на внутривидовом уровне.

Метод молекулярных, или генных, зондов (ДНК-зондов) основан на реакции гибридизации между фрагментом нуклеотидной последовательности (зондом), несущим наиболее специфический и консервативный для данного вида бактерий ген, с полимерной ДНК изучаемого микроорганизма. С помощью этого метода можно идентифицировать любой биологический объект. Точность метода зависит от используемого зонда (его «чистоты»). Наилучшими ДНК-зондами являются полученные путем химического синтеза олигонуклеотидные последовательности, расположение нуклеотидов в которых соответствует таковому участку гена (или всего гена), ответственного за определенную функцию бактерий. ДНК-зонды метят различными способами, например флуоресцентными красителями, радиоизотопами или биотином. Разрешающая способность метода может быть значительно повышена с помощью цепной ДНК-полимеразной реакции. В основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности, ка-

тализируемое ДНК-зависимой ДНК-полимеразой, и использование праймера (от англ. *primer* – запал, средство воспламенения) – фрагмента ДНК, несущего наиболее специфичную для данного микроорганизма нуклеотидную последовательность гена (или участка гена). С помощью праймера обнаруживают искомый фрагмент идентифицирующего микроорганизма. Чувствительность метода исключительно высока и он позволяет за несколько часов увеличить число копий исследуемого фрагмента ДНК в 10^6 – 10^8 раз. ПЦР может быть использована для идентификации ДНК любого микроорганизма, если для него имеется соответствующий праймер. Использование ПЦР особенно показано в тех случаях, когда трудно выделить чистую культуру возбудителя какого-либо заболевания из-за сложности метода культивирования, или в исследуемом образце количество возбудителя очень мало, или возбудитель характеризуется высокой антигенной изменчивостью и т.д. ПЦР незаменима для обнаружения во внешней среде так называемых некультивируемых, но жизнеспособных форм бактерий, в том числе патогенных (холерного вибриона, сальмонелл, легионелл и др.). Тест-системы с праймерами для использования ПЦР с целью обнаружения возбудителей различных заболеваний разработаны и внедряются в практику.

Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) дает возможность проводить сопоставительный анализ последовательностей в различных молекулах ДНК и РНК. Поскольку секвенирование всего генома бактерий в настоящее время – трудоемкая и дорогостоящая процедура, то чаще всего анализируются нуклеотидные последовательности рибосомных РНК – 16SpРНК. Эта РНК универсально распространена, функционально постоянна и, кроме того, достаточно консервативна, чтобы установить дальние эволюционные связи. Чем больше различий в последовательности нуклеотидов 16SpРНК у двух бактерий, тем раньше началось расхождение между ними, тем следовательно дальше отстоят они друг от друга в генетическом родстве.

1.3. Фенотипические критерии систематики

В классификации бактерий используют набор фенотипических признаков: морфологических, культуральных, физиологических и биохимических.

Описание **морфологических признаков** включает определение формы, размеров клеток и их взаимного расположения, типа жгутования, наличия капсулы, способности образовывать споры, особенности внутреннего строения. К морфологическим признакам относят-

ся и окраска по методу Грама, связанная со строением клеточной стенки. Однако только морфологических признаков для определения бактерий недостаточно. Если, например, выделены подвижные грамотрицательные палочки, не образующие эндоспоры и имеющие длину 6 мкм, то определить их видовую принадлежность только на основании этого невозможно, ибо указанными признаками обладают бактерии многих видов.

При характеристике **культуральных признаков**, т.е. таких, которые проявляются при выращивании бактерий в различных условиях отмечают: особенности роста бактерий на плотной питательной среде (размер, окраска, форма, характер колоний) и в жидких питательных средах (образование осадка, пленки, помутнения и т.д.). Однако и этих признаков недостаточно, так как у культур различных видов они могут проявляться сходным образом.

К числу **физиологических признаков** относятся: возможность использовать те или иные источники углерода и азота, потребность в факторах роста, тип энергетических процессов (аэробное дыхание, анаэробное дыхание, брожение), отношение к температуре, влажности, кислотности среды и другим факторам внешней среды.

Разнообразными являются **биохимические признаки** бактерий, которые выражаются в наличии тех или иных ферментов, образовании продуктов метаболизма (кислоты, спирты, газы и т.д.), типе запасных веществ, химическом составе клеток и т.д.

1.4. Серологические критерии систематики

Серологические критерии систематики основаны на специфических реакциях (от лат. *serum* - сыворотка) антигенов (компоненты клеточных стенок, жгутиков, капсул, ДНК и токсинов) идентифицируемых микроорганизмов с антителами, содержащимися в сыворотках. Между антигенами и соответствующими им антителами происходит связывание, что положено в основу методов серологической диагностики.

Такие серологические реакции, как агглютинация, преципитация, связывание комплемента, иммунофлуоресценция, иммуноферментный и радиоиммунный анализ позволяют легко и быстро проводить предварительную идентификацию микроорганизмов.

Для постановки серологических реакций необходима сыворотка, которую получают из крови лабораторного животного, иммунизированного коллекционным (известной видовой и штаммовой принадлежности) микроорганизмом, содержащей антитела, специфичные к данному штамму. Полученную сыворотку используют в серологических реакциях для выявления родственных микроорганизмов, обла-

дающих такими же антигенными детерминантами, что и коллекционный штамм.

Серологические методы являются важным инструментом в диагностике и лечении инфекционных заболеваний человека и животных, поскольку с их помощью можно не только идентифицировать возбудителя заболевания, но и обнаружить в крови больных и переболевших специфические антитела к соответствующим возбудителям. Серологические методы остаются и в настоящее время, пожалуй, единственными методами диагностики при невозможности или трудностях выделения возбудителя, сравнительно редко дают ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

1.5. Современная классификация бактерий

В современной систематике бактерий сложилась ситуация характерная и для классификации других организмов: достигнуты определенные успехи в создании филогенетической системы классификации, отражающей основные направления эволюционного развития и родство представителей определенных таксонов, но сохраняют свое значение искусственные фенотипические классификации – более удобные для идентификации микроорганизмов.

В настоящее время отсутствует сколько-нибудь детализированная эволюционная система прокариот и, скорее всего, решение этой проблемы – дело неблизкого будущего. Особенности прокариот в области морфологической, физиолого-биохимической, генетической организации говорят о неприменимости к ним хорошо разработанных принципов, используемых при построении системы высших организмов.

Не останавливаясь на исторических аспектах проблемы систематики бактерий, следует отметить, что в настоящее время наиболее приемлемой филогенетической системой классификации прокариот, является система, основанная на сопоставлении последовательности нуклеотидов в 16SpPHK. Эта система положена в основу 2-го издания многотомной энциклопедии прокариот – «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» («Руководство по систематической бактериологии Берджи»), которая издана в 2001 г. В этом труде все прокариоты разделены на 26 филогенетических «ветвей» (групп) на основании строения их 16SpPHK. 23 «ветви» представлены эубактериями, а 3 – архебактериями. Следует подчеркнуть, что большое количество этих филогенетических групп содержат виды прокариот, которые не выделены в виде чистых культур и поэтому еще детально не изучены. Для представителей этих видов известны в настоящее время только последовательности нуклеотидов в 16SpPHK. Из 23 групп эубактерий 2 фи-

логенетические группы представлены грамположительными бактериями, остальные группы – грамотрицательными.

Грамотрицательные бактерии состоят из крупной группы Протеобактерий (*Proteobacteria*) и двадцати групп остальных бактерий, имеющих данный тип клеточной стенки. Краткая характеристика Протеобактерий, к которым по составу 16SpPHK наиболее близки митохондрии и хлоропласты большинства эукариот, приведена в табл. 2.

Таблица 2

**Грамотрицательные бактерии филогенетической группы
Proteobacteria (Протеобактерии)**

| Основные фенотипические группы | Наиболее распространенные роды |
|---|---|
| Ферментирующие палочки и вибрионы | Энтеробактерии, <i>Vibrio</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Zymomonas</i> |
| Палочки и кокки, обладающие аэробным дыханием | <i>Pseudomonas</i> , <i>Zoogloea</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Azomonas</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Legionella</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Rickettsia</i> |
| Бактерии, образующие чехлы | <i>Sphaerotilus</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Crenothrix</i> |
| Бактерии, образующие простеки | <i>Caulobacter</i> , <i>Hyphomicrobium</i> |
| Паразиты бактерий | <i>Bdellovibrio</i> |
| Спириллы и магнитоспириллы | <i>Spirillum</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Magnetospirillum</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Helicobacter</i> |
| Миксобактерии | <i>Polyangium</i> , <i>Myxococcus</i> |
| Бактерии, восстанавливающие сульфаты и серу | <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfuromonas</i> |
| Нитрификаторы | <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrococcus</i> |
| Бактерии, окисляющие серу и железо | <i>Thiobacillus</i> , <i>Thiomicrospira</i> , <i>Thermothrix</i> , <i>Beggiatoa</i> , <i>Thiothrix</i> , <i>Gallionella</i> |
| Бактерии, окисляющие водород | <i>Alcaligenes</i> , <i>Ancylobacter</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Spirillum</i> |
| Метилотрофные бактерии | <i>Methylomonas</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i> |
| Фотосинтезирующие пурпурные бактерии | Серные: <i>Chromatium</i> , <i>Thiospirillum</i> , <i>Thiocapsa</i> ; несерные: <i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodocyclus</i> |

Протеобактерии – очень гетерогенная в морфологическом, физиологическом и биохимическом плане группа грамотрицательных бак-

терий. Для представителей этой группы характерны все типы энергетического метаболизма и питания. Клетки большинства видов Протеобактерий имеют палочковидную, сферическую или вибриоидную форму. В основном размножаются бинарным делением, но для некоторых видов характерно почкование и образование плодовых тел в сложном клеточном цикле. В этой группе имеются как подвижные за счет жгутиков, так и неподвижные бактерии. По отношению к молекулярному кислороду Протеобактерии бывают облигатными аэробами, облигатными анаэробами и факультативными анаэробами. Группа Протеобактерий на основании различий в 16SpPHK разделена на 5 подгрупп: альфа, бета, гамма, дельта и эпсилон.

Кроме Протеобактерий к грамтрицательным относятся следующие основные группы эубактерий: водородные термофилы, зеленые нитчатые бактерии, зеленые серные бактерии, цианобактерии, спирохеты, цитофаги, бактериоиды, хломидии, планктомицеты, дейнококки, термофаги, хлорофлексусы, фузобактерии, фибробактерии, термодесульфобактерии и др.

Филогенетические группы грамположительных бактерий – *Actinobacteria* и *Firmibacteria*. Группа *Actinobacteria* («актиномицетная ветвь») представлена следующими родами бактерий, имеющими в ДНК высокое содержание ГЦ-пар: *Geodermatophilus*, *Frankia*, *Streptomyces*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*. Группа *Firmibacteria* («кlostридиальная ветвь» – бактерии с низким содержанием ГЦ-пар в ДНК) состоит из родов: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Caryophanon*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Desulfotomaculum*, *Heliobacterium*, *Clostridium*.

В составе архебактерий выделяют 3 филогенетических группы: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* и *Korarchaeota*. Группа *Crenarchaeota* представлена экстремально термофильными бактериями, большинство представителей которых осуществляют метаболизм серы, некоторые восстанавливают ионы железа и молибдена. В группу *Euryarchaeota* входят облигатно анаэробные метаногенные архебактерии, а также экстремальные термофилы и галофилы. Группа *Korarchaeota* образована архебактериями, обитающими в горячих серных источниках. До настоящего времени ни один из представителей этой группы (обладающий сходной 16SpPHK) не выделен в виде чистой культуры, поэтому их фенотипические признаки изучены крайне недостаточно.

Заканчивая рассмотрение филогенетических ветвей прокариот, следует отметить, что предложенная филогенетическая система, основанная на исследовании нуклеотидных последовательностей только

одного гена рибосомальной РНК – не более чем одна из технически удобных и разработанных систем упорядочения многочисленных организмов с целью их идентификации. Однако, как нам кажется, построить логически верную таксономию бактерий только с учетом этого признака не представляется возможным.

Наиболее признанной и используемой фенотипической классификацией бактерий является классификация, представленная в девятом издании Определителя бактерий Берджи. В этом издании бактерии на основании строения пограничного слоя клетки разделены на четыре основных категории (отдела): 1) *Gracilicutes* (от лат. *cutes* – кожа, *gracilis* – тонкий) – грамотрицательные эубактерии, имеющие клеточные стенки; 2) *Firmicutes* (от лат. *firmus* – прочный) – грамположительные эубактерии, имеющие клеточные стенки; 3) *Tenericutes* (от лат. *tener* – мягкий, нежный) – эубактерии, лишенные клеточных стенок; 4) *Mendosicutes* (от лат. *mendosus* – ошибочный) – архебактерии, клеточные стенки которых отличаются от аналогичных структур прокариот.

В отдел *Gracilicutes* входят бактерии различной морфологии с грамотрицательной клеточной стенкой. Размножение происходит в основном бинарным делением, некоторые бактерии размножаются почкованием. Эндоспор не образуют. Большинство подвижны: встречаются все типы передвижений бактерий – с помощью жгутиков, скольжением, изгибанием. В отдел входят аэробные, анаэробные и факультативно анаэробные бактерии. Отдел включает фототрофные и хемотрофные бактерии. Отдел подразделяют на три класса: *Scotobacteria*, *Oxyphotobacteria*, *Anoxyphotobacteria*. В класс *Scotobacteria* входят грамотрицательные бактерии, не использующие световой энергии, а получающие её только в результате окислительно-восстановительных реакций. Название класса происходит от греч. *scotos* – темнота. Это самый крупный класс бактерий. В класс *Anoxyphotobacteria* входят пурпурные бактерии, зеленые бактерии и гелиобактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез (без выделения молекулярного кислорода). Класс *Oxyphotobacteria* представлен цианобактериями и прохлорофитами, осуществляющими оксигенный фотосинтез (с выделением молекулярного кислорода). Этот фотосинтез аналогичен фотосинтезу, протекающему в растениях.

В отдел *Firmicutes* включены бактерии с грамположительной клеточной стенкой. Клетки могут быть разной формы: палочки, кокки, нитевидные, ветвящиеся. Некоторые представители образуют эндоспоры. Большинство из них неподвижны; подвижные формы имеют перитрихальное жгутикование. В состав отдела входят аэробные,

анаэробные и факультативно анаэробные бактерии. Отдел состоит из двух классов: *Firmibacteria*, *Thallobacteria*. Класс *Firmibacteria* – включает большое количество «неветвящихся» грамположительных бактерий. Класс *Thallobacteria* включает бактерии, клетки которых способны «ветвиться».

Отдел *Tenericutes* представлен бактериями, не имеющими клеточной стенки. В связи с отсутствием клеточной стенки форма клеток непостоянна: в чистой культуре одного вида одновременно присутствуют кокковидные, палочковидные, нитевидные, грушевидные, дисковидные и другие. Размножение бактерий, входящих в этот отдел, происходит бинарным делением, почкованием. Окрашивание по Граму отрицательное. Характерно образование мелких, растающих в агар колоний. Могут быть сапрофитными, паразитами или патогенами. Отдел состоит из одного класса *Mollicutes* (микоплазмы).

Отдел *Mendosicutes* образован бактериями с ригидной клеточной стенкой, но не содержащей пептидогликана муреина. Большинство представителей – строгие анаэробы, многие из которых имеют жгутики. Виды характеризуются экологическим и метаболическим разнообразием, способностью жить в экстремальных условиях. Отдел состоит из одного класса *Archaeobacteria*.

В составе четырех отделов (основных категорий) выделено 35 групп (или секций) бактерий, которые в большей или меньшей степени будут охарактеризованы в последующих главах.

К **отделу *Gracilicutes*** принадлежат:

Группа 1. Спирохеты.

Группа 2. Аэробные (или микроаэрофильные), подвижные, спиралевидные (или вибриоидные) грамотрицательные бактерии.

Группа 3. Неподвижные или, редко подвижные грамотрицательные изогнутые бактерии.

Группа 4. Грамотрицательные аэробные (или микроаэрофильные) палочки и кокки.

Группа 5. Факультативно аэробные грамотрицательные палочки.

Группа 6. Грамотрицательные анаэробные прямые, изогнутые или спиралевидные палочки.

Группа 7. Бактерии, осуществляющие диссимиляционное восстановление серы или сульфата.

Группа 8. Анаэробные грамотрицательные кокки.

Группа 9. Риккетсии и хламидии.

Группа 10. Аноксигенные фототрофные бактерии.

Группа 11. Оксигенные фототрофные бактерии.

Группа 12. Аэробные хемолитотрофные бактерии и близкие организмы.

Группа 13. Почкующиеся и/или образующие выросты бактерии.

Группа 14. Бактерии, имеющие чехлы.

Группа 15. Нефотосинтезирующие скользящие бактерии, не образующие плодовых тел.

Группа 16. Скользящие бактерии, образующие плодовые тела.

В отдел *Firmicutes* входят:

Группа 17. Грамположительные кокки.

Группа 18. Грамположительные палочки и кокки, образующие эндоспоры.

Группа 19. Грамположительные палочки правильной формы, не образующие спор.

Группа 20. Грамположительные палочки неправильной формы, не образующие спор.

Группа 21. Микобактерии.

Группы 22 – 29. Актиномицеты.

К отделу *Tenericutes* принадлежат:

Группа 30. Микоплазмы.

Отдел *Mendosicutes* включает:

Группа 31. Метаногены.

Группа 32. Сульфатредуцирующие архебактерии.

Группа 33. Экстремально галофильные архебактерии (галобактерии).

Группа 34. Архебактерии, лишенные клеточной стенки.

Группа 35. Экстремально термофильные и гипертермофильные архебактерии, метаболизирующие серу.

В заключение следует подчеркнуть, что большинство микроорганизмов, существующих в природных образцах, еще должны быть выделены в чистые культуры. Считается, что в настоящее время культивировать можно только 0,1% всего микробного разнообразия, а около 99% видов бактерий вырастить и идентифицировать не удастся, хотя в чистую культуру выделено и описано около 5000 видов прокариот.

Глава 2. МОРФОЛОГИЯ И СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

2.1. Морфология бактерий

Для бактерий характерны три основные формы клеток: шаровидная (сферическая), или кокковидная (от греч. *kokkos* – зерно), цилиндрическая (палочковидная) и извитая (рис. 3).

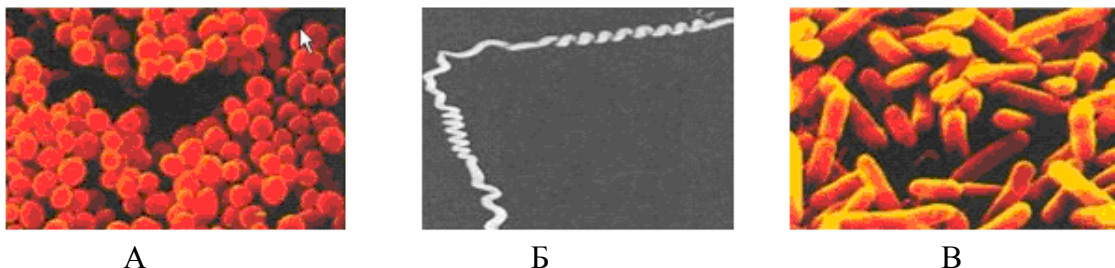


Рис. 3. Микрофотографии бактерий: А – сферические клетки; Б – извитые клетки; В – палочковидные клетки

Кокковидные бактерии обычно имеют форму правильного шара диаметром 1,0 – 2,0 мкм, но могут быть овальными, эллипсоидными, бобовидными. Кокковидные бактерии способны делиться в нескольких плоскостях, при этом после деления клетки могут не расходиться и формировать различного вида скопления (рис. 4).

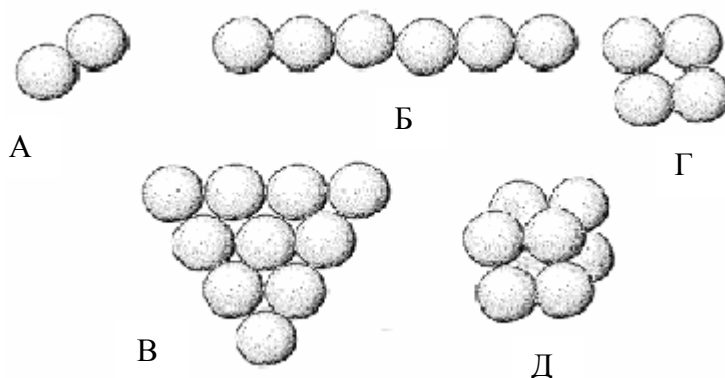


Рис. 4. Типы скоплений кокковидных клеток: А – диплококки; Б – стрептококки; В – стафилококки; Г – тетракокки; Д – сарцины

Если деление кокков происходит в одной плоскости, то могут образовываться пары клеток – **диплококки** (от лат. *diplos* – двойной) и цепочки клеток разной длины – **стрептококки** (от греч. *streptos* – цепочка). Кокки, делящиеся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях и не расходящиеся после этого, образуют тетрады кокков (**тетракокки**) (от лат. *tetra* – четыре). Когда деление клеток происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются пакеты из восьми кокков в виде тюков кубической формы (**сарцины**) (от лат.

sarcina – связка, тюк). У некоторых видов бактерий при делении кокков в нескольких плоскостях могут образовываться неправильные по форме скопления, напоминающие гроздь винограда – **стафилококки** (от лат. *staphyle* – гроздь винограда).

Палочковидные (цилиндрические) клетки сильно различаются по величине отношения длины клетки к ее поперечнику. Они делятся только в одной плоскости – перпендикулярно оси цилиндра. Клетки при этом могут располагаться поодиночке (**монобактерии**), образовывать пары (**диплобактерии**) или цепочки (**стрептобактерии**) (рис. 5).

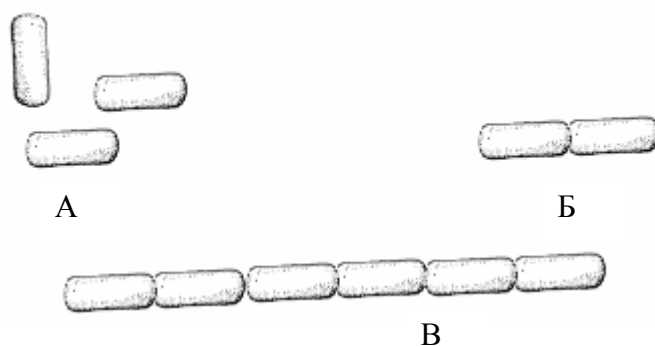


Рис. 5. Типы расположения палочковидных клеток: А – монобактерии; Б – диплобактерии; В – стрептобактерии

Извитые клетки могут иметь разное число завитков. В зависимости от формы и количества завитков различают три типа клеток: **вибрионы** (от греч. *vibrio* – извиваясь, изгибаясь) имеют один завиток, не превышающий четверти оборота спирали (изогнутые клетки наподобие запятой), **спириллы** (от греч. *speira* – спираль) имеют 3 – 5 крупных завитков и **спирохеты** – большое количество мелких завитков (рис. 6).

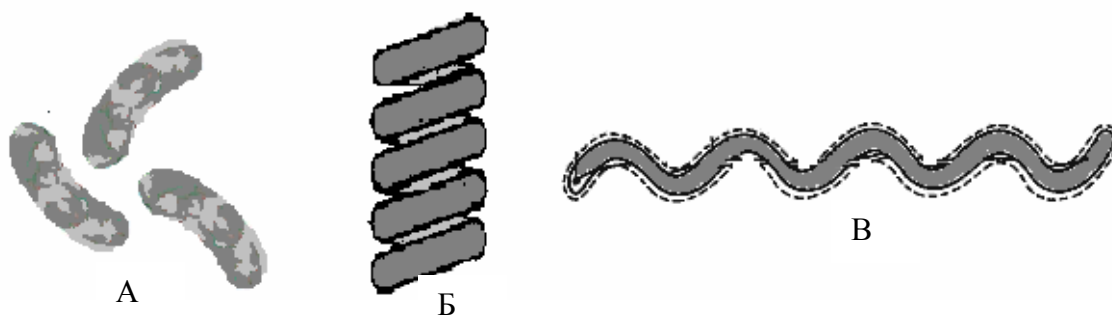


Рис. 6. Типы извитых клеток: А – вибрионы; Б – спириллы; В – спирохеты

Кроме описанных форм, которые преобладают среди бактерий, известны и клетки иных типов: клетки с выростами; булавовидной формы; веретенообразные; ланцетовидные; разветвленные и неразветвленные нитчатые формы; имеющие вид кольца, замкнутого или ра-

зомкнутого в зависимости от стадии роста; ветвящиеся; напоминающие шестиугольную звезду; пластинкообразные; в виде кусочков битого стекла, квадратиков и т.д.

Форма клеток большинства бактерий является устойчивым видовым признаком. Однако существуют бактерии, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), в зависимости от условий имеющие вид палочек, кокков или обнаруживающие слабое ветвление. У некоторых видов бактерий при прохождении цикла развития также наблюдается изменение формы клеток.

2.2. Структурная организация бактериальной клетки

Клетка прокариот, несмотря на относительно малые размеры, имеет все основные структурные компоненты, необходимые для осуществления обмена веществ (рис. 7).

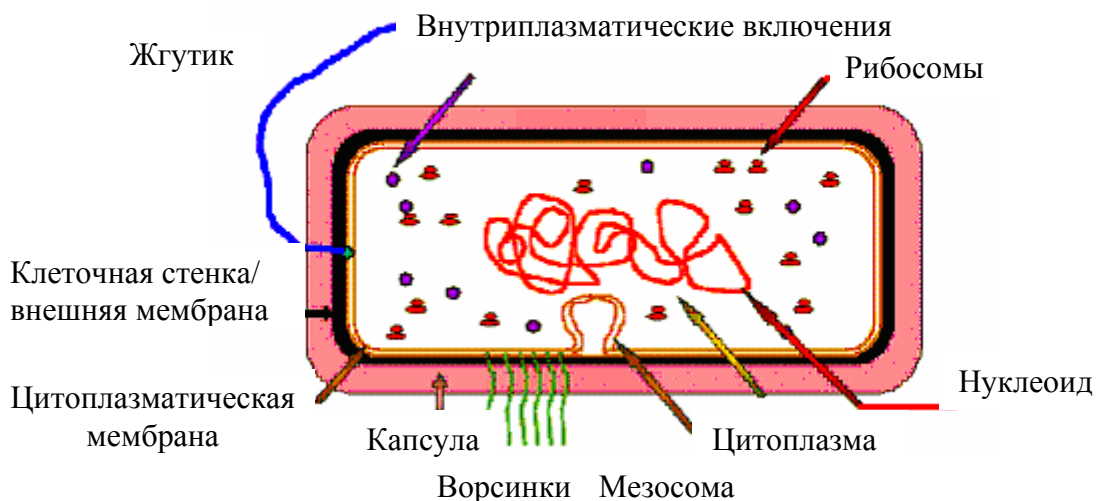


Рис. 7. Модель бактериальной клетки

Как и всякая другая, прокариотическая клетка имеет цитоплазму, которая окружена цитоплазматической мембраной. Цитоплазма вместе с цитоплазматической мембраной составляют протопласт, снаружи от него расположены поверхностные структуры. К их числу относятся клеточная стенка, капсулы, чехлы, слизистые слои, жгутики, ворсинки и т.д.

2.2.1. Клеточная стенка

Клеточная стенка является обязательным структурным элементом бактериальной клетки, исключение составляют микоплазмы и L-формы. На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50% сухих веществ клетки.

По строению и химическому составу клеточная стенка прокариот отличается от таковой эукариотических организмов. Основным компонентом клеточной стенки большинства бактерий является **муреин**, относящийся к классу **пептидогликанов**. **Муреин** – гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенные между собой β -1,4-гликозидными связями (рис. 8).

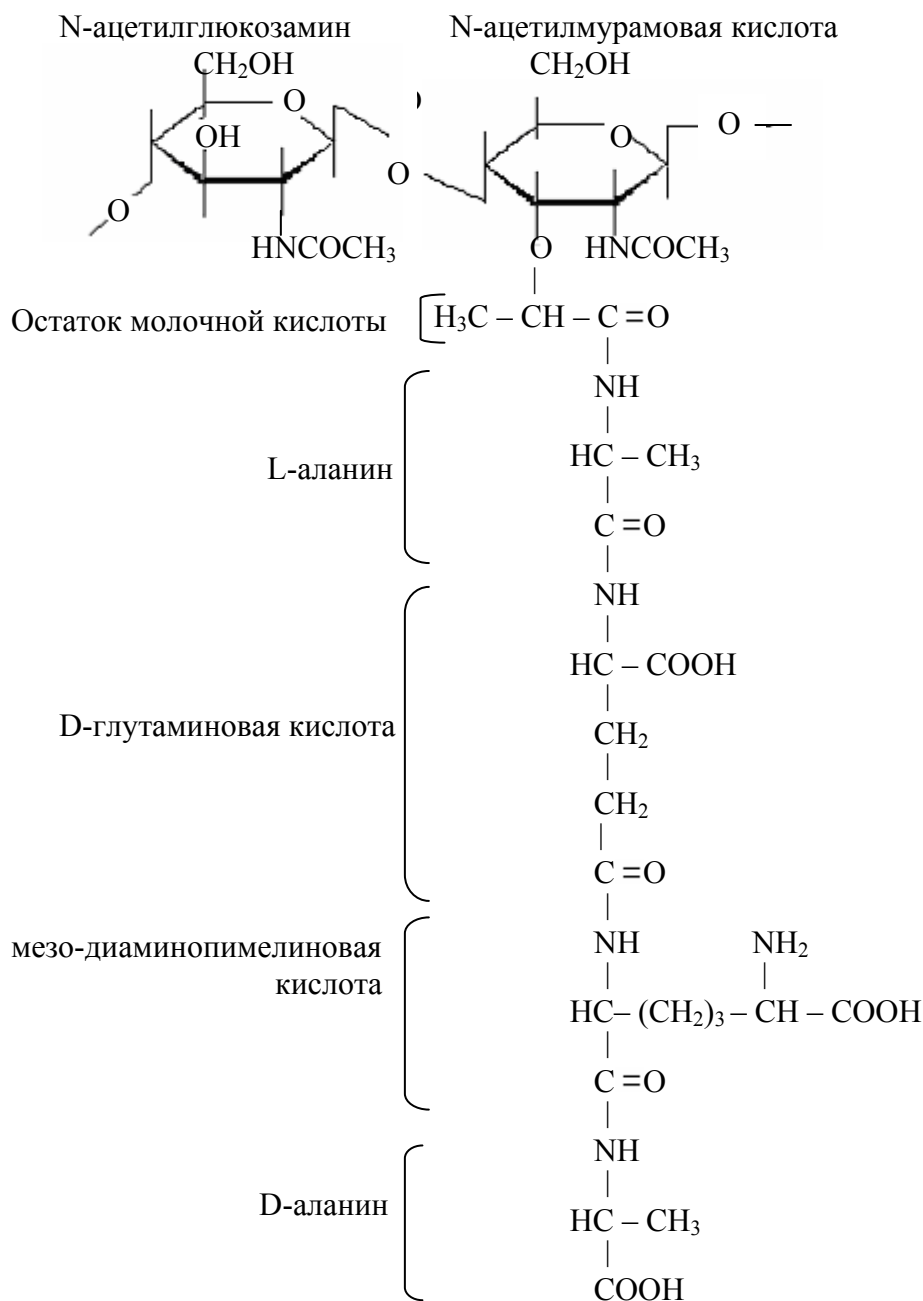
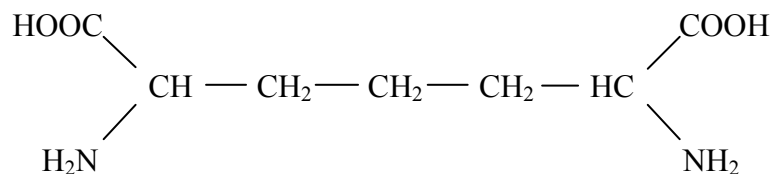


Рис. 8. Структура субъединицы пептидогликана муреина клеточной стенки бактерий *Escherichia coli* (по Г. Шлегелю, 1987)

Такие неразветвленные гетерополимерные цепи образуют основу муреина. Остатки N-ацетилмурамовой кислоты через лактильные группы соединены пептидной связью с аминокислотами. К типичным аминокислотам, обнаруженным в составе муреина, относятся: L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и D-аланин.

Диаминопимелиновая кислота относится к диаминокислотам и находится в муреине в мезо-форме:



У некоторых бактерий вместо мезо-диаминопимелиновой кислоты встречаются L-лизин; либо L- или D-орнитин; либо 2,4-диаминомасляная кислота, либо гомосерин, либо гидроксизин.

Мезо-диаминопимелиновая кислота, L-лизин или другие диаминокислоты играют большую роль в межмолекулярных сшивках, так как в образовании пептидных связей могут принимать участие обе аминогруппы и, таким образом, связываются две гетерополимерные цепи муреина между собой (рис. 9).

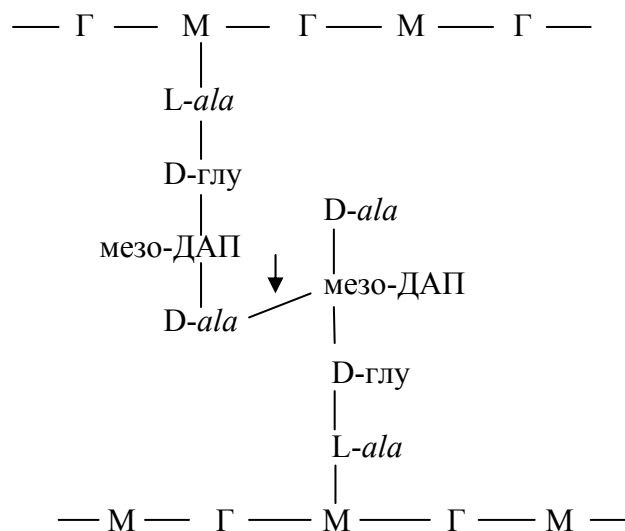


Рис. 9. Пептидные мостики между гетерополимерными цепочками; Г – N-ацетилглюкозамин; М – N-ацетилмурамовая кислота; ала – аланин; глу – глутаминовая кислота; ДАП – диаминопимелиновая кислота. Стрелкой обозначена пептидная связь

Благодаря пептидным связям гетерополимерные цепи связаны между собой и образуют мешкообразную гигантскую молекулу – муреиновый мешок, который выполняет функцию опорного каркаса клеточной стенки (рис. 10).

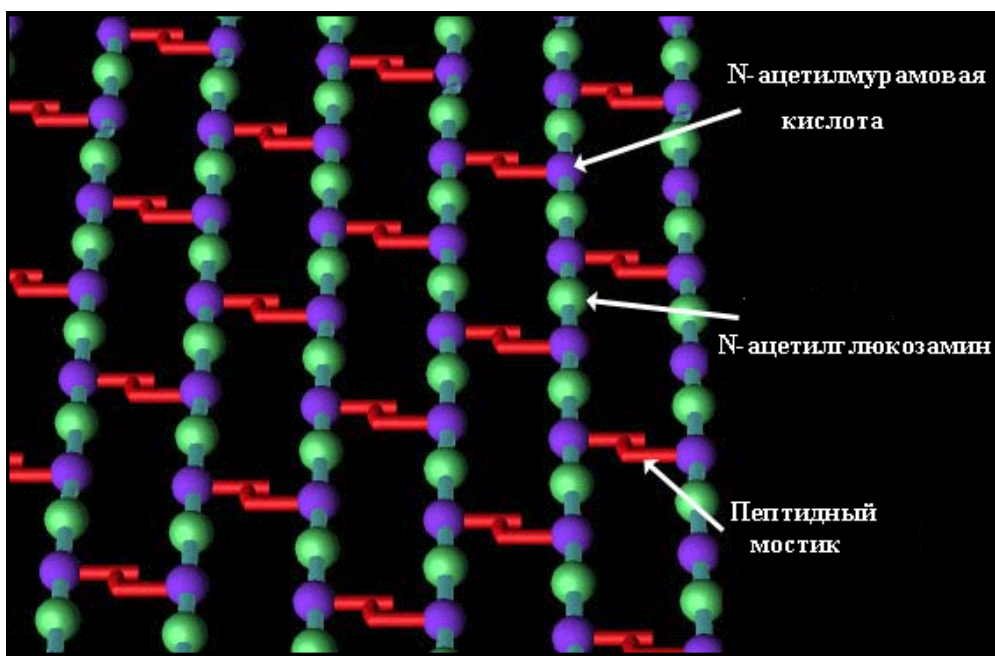


Рис. 10. Схематическое изображение структуры однослойного поперечношитого муреинового мешка

Следует отметить, что особенностью клеточных стенок бактерий по сравнению с клетками эукариот является наличие в них особых структурных элементов:

- чередующихся последовательностей N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты;
- наличие мезо-диаминопимелиновой кислоты; D-форм аланина и глутаминовой кислоты.

Эти структурные элементы составляют ахиллесову пяту бактерий, используемую врачами в борьбе с инфекцией. Для борьбы с инфекцией бактериальной этиологии применяют лекарственные препараты, специфически воздействующие только на клеточные стенки бактерий или на процесс их синтеза, но не на клетки растений, животных и человека.

Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида бактерий и являются важным диагностическим признаком, который используется для идентификации бактерий.

В зависимости от строения клеточной стенки бактерии делятся на две большие группы: грамположительные и грамотрицательные. Существует метод окраски, позволяющий разделить бактерии на эти две

группы. Он был предложен в 1884 году датским ученым Х.Грамом. Этот метод основан на различной способности микроорганизмов удерживать в клетке красители трифенилметанового ряда – кристаллический фиолетовый и генциановый фиолетовый, что в свою очередь зависит от химического состава и ультраструктуры клеточной стенки бактерий.

Рассмотрим как построены и чем отличаются клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка грамположительных бактерий под электронным микроскопом выглядит как однородный плотный слой, толщина которого колеблется для разных видов от 20 до 80 нм (рис. 11). Муреин в клеточной стенке грамположительных бактерий составляет от 50 до 90% ее сухой массы. С муреином связаны тейхоевые кислоты – полимеры, образованные остатками спирта рибита или глицерина, связанными фосфодиэфирными мостиками. Тейхоевые кислоты влияют на катионный обмен клетки. Считается, что они осуществляют захват из окружающей среды и связывание ионов Mg^{2+} . У некоторых бактерий они принимают участие в регуляции активности аутолитических ферментов – гидролаз, способных разрушать собственную клеточную стенку в процессе роста.

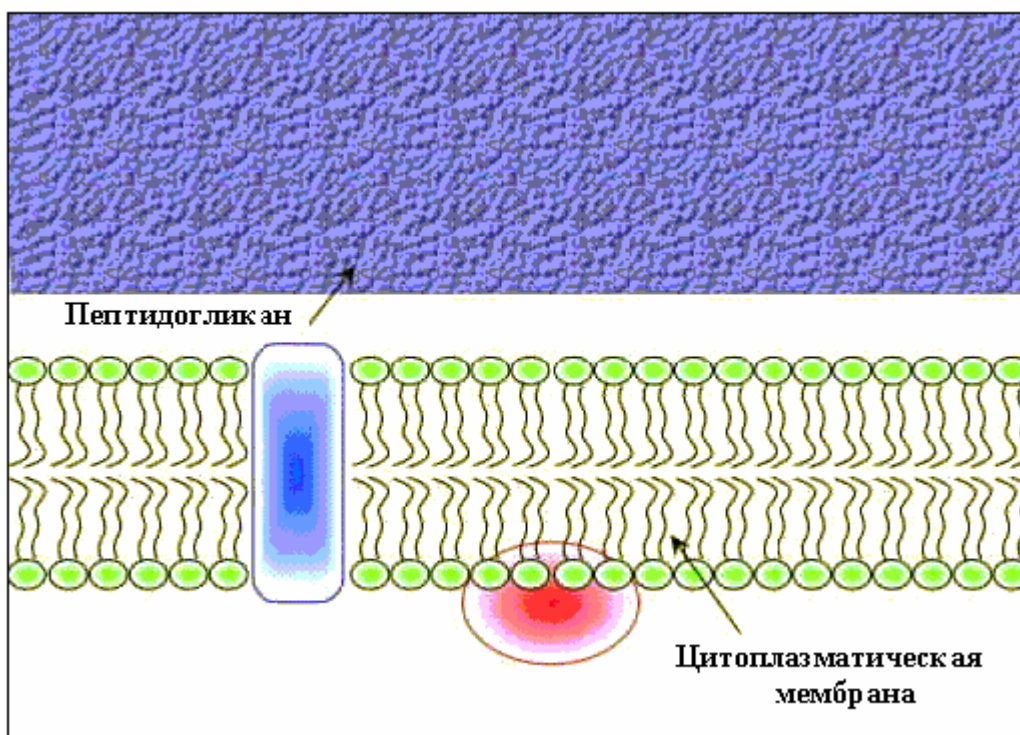


Рис. 11 . Схематическое строение клеточной стенки грамположительных бактерий

Помимо пептидогликана муреина и тейховых кислот в составе клеточной стенки грамположительных бактерий в небольшом количестве обнаружены полисахариды, белки и липиды (табл. 3).

Таблица 3

**Химический состав клеточных стенок
грамположительных и грамотрицательных прокариот
(по Э.Роуз, 1971; Дж.Фрир, М.Солтон, 1971)**

| Компоненты клеточной стенки | Грамположительные | Грамотрицательные | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| | | внутренний слой (пептидогликановый) | внешний слой (наружная мембрана) |
| Пептидогликан | + | + | - |
| Тейхоевые кислоты | + | - | - |
| Полисахариды | + | - | + |
| Белки | ± | - | + |
| Липиды | ± | - | + |
| Липополисахариды | - | - | + |
| Липопротеиды | - | ± | + |

Клеточная стенка у грамположительных бактерий плотно прилегает к цитоплазматической мембране, т.е. периплазматического пространства между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной нет. Кроме того у грамположительных бактерий нет внешней или наружной мембраны.

К грамположительным бактериям относятся следующие: *Bacillus subtilis*, *Sarcina ventriculi*, *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens* и др. (рис. 12).

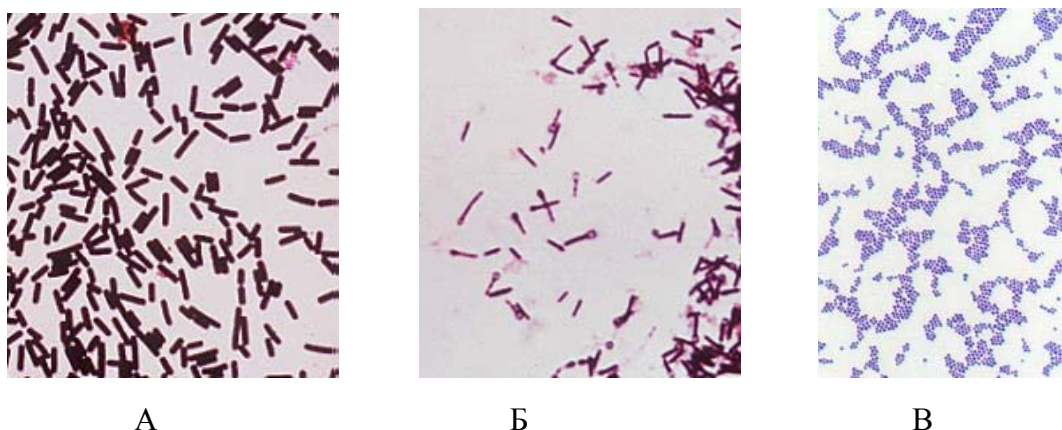


Рис. 12. Грамположительные бактерии: А – *Clostridium perfringens*; Б – *Clostridium tetani*; В – *Staphylococcus aureus*

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий многослойна, толщина ее составляет от 14 до 17 нм (рис. 13). Внутренний слой клеточной стенки представлен пептидогликаном муреином, на долю которого приходится от 1 до 10% ее сухой массы. Структурные микрофибриллы пептидогликана грамотрицательных бактерий сшиты менее компактно, поэтому поры в их пептидогликановом слое значительно шире, чем в молекулярном каркасе грамположительных бактерий.

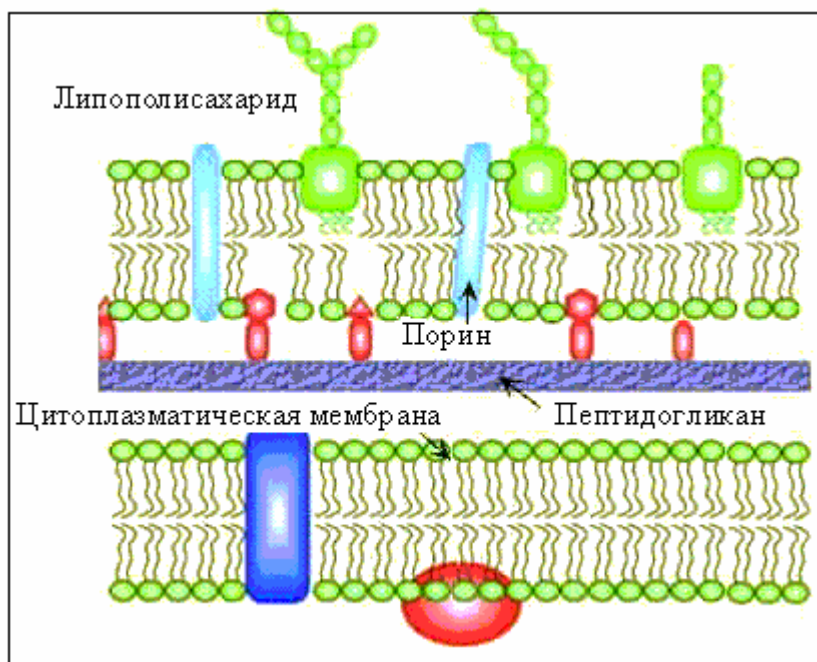


Рис.13. Схематическое строение клеточной стенки грамотрицательных бактерий

Внешний слой клеточной стенки (наружная или внешняя мембрана) образован фосфолипидами, липопротеинами и белками. По строению наружная мембрана имеет типичную организацию, характерную для элементарных мембран. Основной фракцией наружной мембраны являются липиды, составляющие в среднем 22% сухой массы клеточной стенки. Наружная мембрана выполняет не только механические, но и важные физиологические функции. В ней находятся трансмембранные белки, которые насквозь пронизывают мембрану. Они представляют собой заполненные водой каналы или гидрофильные поры в липофильной мембране, их называют поринами. Существует несколько различных типов поринов. Они осуществляют транспорт через мембрану гидрофильных низкомолекулярных веществ.

Одной из отличительных особенностей грамотрицательных бактерий является отсутствие в их клеточной стенке тейхоевых кислот.

Компоненты клеточной стенки у грамотрицательных бактерий разделены электронно-прозрачным слоем, а также четко отделены от цитоплазматической мембраны. Пространство между цитоплазматической и наружной мембраной получило название **периплазматического**. В периплазматическом пространстве находятся белки, такие как протеиназы, нуклеазы, периферические белки цитоплазматической мембраны, рестриктазы и, так называемые, связующие белки, которые участвуют в переносе некоторых субстратов в цитоплазму – пермеазы.

К грамотрицательным бактериям относятся: *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* и др. (рис. 14).

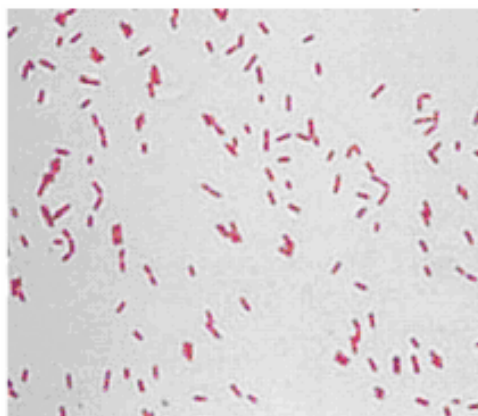


Рис. 14. Грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa*

Клеточная стенка бактерий выполняет следующие функции:

- механически защищает клетку от воздействий факторов окружающей среды;
- обеспечивает поддержание формы бактериальной клетки;
- дает возможность клетке существовать в гипотонических растворах;
- осуществляет транспорт веществ и ионов (характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану, которая является дополнительным барьером для их поступления; основной барьер – цитоплазматическая мембрана);
- препятствует проникновению в клетку токсических веществ (также более характерно для грамотрицательных бактерий, имеющих наружную мембрану);
- на клеточной стенке находятся рецепторы, на которых адсорбируются бактериофаги и бактериоцины;

- в клеточной стенке находятся антигены (липополисахариды у грамотрицательных бактерий и тейховые кислоты у грамположительных бактерий);

- на клеточной стенке находятся рецепторы, ответственные за взаимодействие клеток донора и реципиента при конъюгации бактерий.

Вместе с тем, следует отметить, что клеточная стенка не является жизненно важной структурой, так как в определенных условиях она может быть удалена и бактериальные клетки при этом существуют в виде протопластов или сферопластов.

Протопластами называют клетки округлой формы, полностью лишенные остатков клеточной стенки и окруженные только цитоплазматической мембраной. Их образование характерно чаще для грамположительных бактерий. **Сферопласты** отличаются от протопластов тем, что у них сохраняются остатки клеточной стенки, а образуются они преимущественно из клеток грамотрицательных бактерий.

Протопласты и сферопласты можно получить в лабораторных условиях, обрабатывая клетки бактерий лизоцимом (или иначе N-ацетилмурамидаза), разрушающим муреин, антибиотиками пенициллинового ряда (пенициллин, ампициллин, карбенициллин и др.) или циклосерином, подавляющими синтез муреина. Фермент лизоцим действует на β -1,4-гликозидные связи муреина и тем самым разрушает муреин у бактерий со сформировавшейся клеточной стенкой. Антибиотики пенициллинового ряда и циклосерин оказывают действие только на растущие бактерии, нарушая процесс синтеза муреина клеточной стенки, а именно, они препятствуют поперечной сшивке пептидогликановых цепей, т.е. образованию пептидных связей.

Протопласты и сферопласты можно получить и с помощью других ферментов, которые разрушают пептидные связи, участвующие в поперечной сшивке гетерополимерных цепей муреина. В качестве примера можно привести фермент эндопептидазу, синтезируемый бактериями *Escherichia coli*. Этот фермент разрывает пептидную связь между D-аланином и мезо-диаминопимелиновой кислотой.

Протопласты и сферопласты стабильно сохраняются в гипертонических или изотонических условиях. Для создания гипертонических условий чаще всего используют сахарозу и маннит в концентрациях 0,1 – 1,0 М. В гипотонических условиях протопласты и сферопласты лопаются и образуют «тени».

Протопласты и сферопласты в 3 – 10 раз крупнее исходных клеток бактерий. В гипертонических или изотонических условиях они осуществляют обмен веществ, характерный для исходных клеток, т.е. они

сохраняют дыхательную активность, синтезируют необходимые биополимеры, образуют эндоспores, если процесс споруляции уже был инициирован. Можно наблюдать рост сферопластов и протопластов, а иногда и деление. В отличие от исходных клеток на них не адсорбируются бактериофаги и бактериоцины. Кроме того у протопластов и сферопластов отсутствуют мезосомы – производные цитоплазматической мембраны.

При снятии действующего на образование муреина фактора (пенициллин, циклосерин, лизоцим и др.) протопласты, как правило, отмирают, реже регенерируют клеточную стенку и возвращаются в исходное состояние, но могут превращаться в L-формы. Сферопласты ревертируют (превращаются) в нормальные бактериальные клетки, либо превращаются в L-формы, либо отмирают.

L-формами принято называть бактерии, частично или полностью лишенные клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Буква L – первая буква названия Листеровского института в Лондоне, где впервые обратили внимание на развитие морфологически весьма необычных клеток в культуре бактерий *Streptococcus moniliformis*, выделенной из жидкости уха крысы. Позже были описаны L-формы у самых разных видов бактерий. Было показано, что L-формы возникают спонтанно или индуцировано – под воздействием агентов, блокирующих синтез клеточной стенки (антибиотиков пенициллинового ряда и циклосерина, ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, аминокислоты глицина).

L-формы образуются в результате несбалансированного роста нормальных бактериальных клеток в длину и в толщину и поэтому полиморфны. В культурах L-форм обнаруживаются клетки размером 0,2 – 50 мкм. Они шаровидные, нитевидные, присутствуют также и бесструктурные массы. L-формы проходят через бактериальные фильтры и легко разрушаются при механических воздействиях.

В отличие от протопластов и сферопластов клетки L-форм имеют хорошо развитую систему внутрицитоплазматических мембран, т.е. у них имеются мезосомы. В отличие от нормальных клеток L-формы часто содержат крупные вакуоли.

L-формы обладают пониженным уровнем метаболической активности, чем исходные бактерии. Они нечувствительны к действию любых агентов, влияющих на клеточную стенку.

Культивировать L-формы можно только на специальных средах с высоким осмотическим давлением. L-формы лучше растут на плотной, чем в жидкой среде. На плотной среде они образуют колонии, растущие в агар и имеющие характерную форму перевернутой

шляпы. Колонии растут медленно, хотя иногда достигают значительных размеров.

У L-форм не функционируют нормальные механизмы клеточного деления. В основном они делятся с образованием элементарных тел, которые отпочковываются от поверхности клетки или от мембраны вакуоли.

Различают стабильные и нестабильные L-формы. Нестабильные L-формы обладают элементами клеточной стенки и поэтому способны ревертировать в нормальные бактериальные клетки после исключения действия фактора, вызвавшего их образование. Стабильные L-формы полностью лишены ригидной клеточной стенки, что сближает их с протопластами. Они крайне редко ревертируют в исходные бактериальные формы и существуют без изменений в различных условиях среды. Переход в L-форму можно рассматривать как способ переживания бактериями неблагоприятных условий, особенно в случаях патогенных микроорганизмов.

Исследования L-форм представляют существенный интерес для медицинской микробиологии, поскольку в этой форме в организме человека и животных могут сохраняться патогенные бактерии. При нерациональном использовании антибиотиков, приводящем к образованию L-форм из бактерий, может наступить улучшение состояния больного. Однако после прекращения приема лечебного препарата наступает превращение L-форм в бактерии исходного вида с восстановлением их вирулентности, что приводит к рецидиву болезни.

Бактерии, у которых отсутствует клеточная стенка, существуют и в природе: это микоплазмы. Первым описанным представителем микоплазм явился возбудитель плевропневмонии крупного рогатого скота. Подобные микроорганизмы обнаружены и у других животных – овец, коз, крыс, собак, а также у человека, всем им было дано общее название PPLO (плевропневмониеподобные организмы). В настоящее время показано, что микоплазмы могут существовать как сапрофиты в естественных условиях, а также вызывать заболевания и у растений.

2.2.2. Цитоплазматическая мембрана и ее производные

Цитоплазматическая мембрана составляет 8 – 15% сухой массы клетки. Химический состав цитоплазматической мембраны представлен белково-липидным комплексом, в котором на долю белков приходится 50 – 75%, на долю липидов – 15 – 50%. Главным липидным компонентом мембраны являются фосфолипиды. Белковая фракция цитоплазматической мембраны представлена структурными белками, обладающими ферментативной активностью. Белковый состав цито-

плазматической мембраны разнообразен. Так, в цитоплазматической мембране бактерий *Escherichia coli* содержится около 120 различных белков. Кроме того, в составе мембран обнаружено небольшое количество углеводов.

Цитоплазматическая мембрана бактерий по химическому составу в целом сходна с мембранами эукариотических клеток, но мембраны бактерий богаче белками, содержат необычные жирные кислоты и, в основном, не имеют стеролов.

К строению цитоплазматической мембраны бактерий приложима жидкостно-мозаичная модель, разработанная для мембран эукариот. Согласно этой модели, мембрана состоит из бислоя липидов. Гидрофобные «концы» молекул фосфолипидов и триглицеридов направлены внутрь, а гидрофильные «головки» – наружу. В двойном слое липидов встроены белковые молекулы (рис. 15). По расположению и характеру взаимодействия с липидным бислоем белки цитоплазматической мембраны подразделяются на периферические и интегральные.

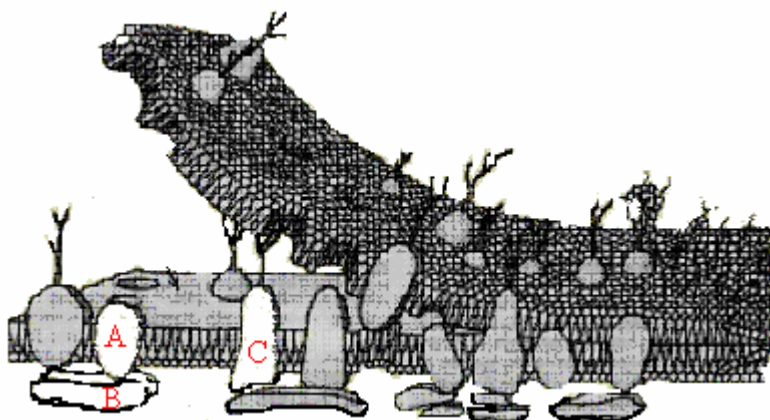


Рис. 15. Структура цитоплазматической мембраны: А – белки, погруженные в бислой мембраны; В – поверхностные белки; С – белки, пронизывающие мембрану насквозь

Периферические белки связаны с поверхностью мембраны и легко вымываются из нее при изменении ионной силы растворителя или при воздействии хелатирующими агентами. Обычно они растворяются в буферных растворах с нейтральной кислотностью и переходят в раствор без липидов. К периферическим белкам относятся НАДН₂-дегидрогеназы, малатдегидрогеназы, а также некоторые белки, входящие в АТФ-азный комплекс и др. **АТФ-азный комплекс** представляет собой группу определенным образом расположенных белковых субъединиц, контактирующих с цитоплазмой, периплазматическим

пространством и образующих канал, через который осуществляется проход протонов.

К **интегральным белкам** относятся белки, частично или полностью погруженные в толщу мембраны, а иногда и пронизывающие ее насквозь, т.е. интегральные белки как бы плавают в бислое липидов. Связь интегральных белков с липидами определяется, главным образом, гидрофобными взаимодействиями. Эти взаимодействия могут быть настолько прочными, что белки могут быть отделены от других элементов мембраны только при воздействии детергентами, органическими растворителями, растворами мочевины. В растворе они обычно ассоциированы с липидами, и часто нуждаются в их присутствии для проявления ферментативной активности. К интегральным белкам мембраны бактерий *E.coli* относятся, например, цитохром b, железосерные белки, сукцинатдегидрогеназа и др.

Цитоплазматическая мембрана выполняет ряд существенных для клетки функций:

- поддержание внутреннего постоянства цитоплазмы клетки. Это достигается за счет уникального свойства цитоплазматической мембраны – ее полупроницаемости. Она проницаема для воды и низкомолекулярных веществ, но не проницаема для ионизированных соединений. Транспорт таких веществ внутрь клетки и выход наружу осуществляется за счет специализированных транспортных систем, которые локализуются в мембране. Такие транспортные системы функционируют за счет механизмов активного транспорта и системы субстрат-специфических ферментов пермеаз;

- с вышеуказанной особенностью цитоплазматической мембраны связана и функция транспорта веществ в клетку и вывод их наружу;

- в цитоплазматической мембране находится электронтранспортная цепь и ферменты окислительного фосфорилирования;

- цитоплазматическая мембрана связана с синтезом клеточной стенки и капсулы за счет наличия в ней специфических переносчиков;

- в цитоплазматической мембране закреплены жгутики. Энергетическое обеспечение движения жгутиков связано с цитоплазматической мембраной.

У прокариот, принадлежащих к разным таксономическим группам, обнаружены **мезосомы**, которые образуются при впячивании цитоплазматической мембраны в цитоплазму. Мезосомы бактерий разнообразны по форме, размерам и локализации в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: **ламеллярные** (пластинчатые), **везикулярные** (имеющие форму пузырьков) и **тубулярные** (трубчатые).

Обнаруживаются в клетках некоторых бактерий также мезосомы смешанного типа: состоящие из ламелл, трубочек и пузырьков. Сложно организованные и хорошо развитые мезосомы характерны для грамположительных бактерий. У грамотрицательных бактерий они встречаются значительно реже и относительно просто организованы. По расположению в клетке различают мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования поперечной перегородки; мезосомы, к которым прикреплен нуклеоид; мезосомы, сформированные в результате инвагинации периферических участков цитоплазматической мембраны.

Существуют разные точки зрения относительно роли мезосом в бактериальной клетке. Согласно одной из них мезосомы служат для усиления мембранозависимых функциональных активностей клетки, так как в мембранах, образующих мезосомы, находятся ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме бактерий. Кроме того, считают, что мезосомы играют роль в репликации ДНК и последующем расхождении ее копий по дочерним клеткам. Мезосомы участвуют в процессе инициации и формирования поперечной перегородки при клеточном делении.

Развитая система внутрицитоплазматических мембран характерна для большинства фотосинтезирующих прокариот, поскольку в этих мембранах локализован фотосинтетический аппарат клетки, они получили название **фотосинтетических мембран**. Все фотосинтетические мембраны – производные цитоплазматической мембраны, возникшие в результате ее разрастания и глубокого впячивания (инвагинации) в цитоплазму. Фотосинтетические мембраны образуют у этих бактерий хроматофоры, тилакоиды и ламеллы.

2.2.3. Транспорт веществ в клетку бактерий

Различают следующие способы поступления веществ в клетку бактерий: простая или пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт и транслокация групп.

Простая или пассивная диффузия – неспецифическое поступление веществ в клетку за счет разницы концентраций, т.е. передвижение молекул идет из более концентрированного раствора в менее концентрированный – по градиенту концентрации. Таким путем осуществляется транспорт низкомолекулярных веществ, особенно кислорода, липофильных соединений (спирты, жирные кислоты), воды, по видимому, ядов и других чуждых клетке веществ, а также удаление продуктов обмена. Скорость перемещения путем простой диффузии невелика. Этот процесс не связан с затратой энергии.

Перенос веществ при **облегченной диффузии** происходит по градиенту их концентрации. Скорость транспорта зависит от концентрации субстрата в среде. Этот процесс не требует затраты энергии и осуществляется с участием субстрат-специфических пермеаз.

Активный транспорт – основной механизм избирательного переноса веществ через цитоплазматическую мембрану в клетку против градиента концентрации. Этот процесс, так же как и облегченная диффузия, протекает при участии локализованных в цитоплазматической мембране переносчиков белковой природы – пермеаз, которые высокоспецифичны к субстрату. В отличие от облегченной диффузии для активного транспорта необходима затрата энергии либо в виде АТФ, либо за счет протондвижущей силы энергизованной мембраны. От активного транспорта зависит сродство клеток к субстрату, т.е. основной признак, определяющий и набор, и концентрацию используемых веществ.

У многих бактерий, в особенности грамотрицательных, в активном транспорте принимают участие особые связующие белки, не идентичные пермеазам и не входящие в структуру мембраны, а локализованные в периплазматическом пространстве. У связующих белков отсутствует каталитическая активность, но они обладают очень высоким сродством к определенным питательным веществам и различным аминокислотам, углеводам, неорганическим ионам. Выделено и изучено более 100 различных связующих белков, которые образуют прочные комплексы со своими субстратами и необходимы для их активного переноса через мембрану. Связующие белки функционируют только в комплексе со специфическими пермеазами, осуществляющими активный перенос субстрата через мембрану. Метаболическая энергия, необходимая для этого, используется для снижения сродства пермеазы к своему субстрату на внутренней стороне мембраны по сравнению с ее сродством к нему на внешней стороне мембраны. В результате этих превращений происходит изменение скорости выхода субстрата наружу, она становится во много раз меньше скорости его поступления в клетку.

Если во всех предыдущих путях переноса веществ через цитоплазматическую мембрану они поступают в клетку в химически неизменном виде, то при **транслокации групп** происходит химическая модификация переносимых молекул. Так происходит поступление в клетку многих прокариот углеводов, в процессе которого они фосфорилируются. Источником фосфатной группы служит фосфоенолпируват, от которого фосфатный остаток с помощью фермента (фермента I), находящегося в цитоплазме, переносится на молекулу специаль-

ного термостабильного белка, а с него, при участии второго фермента, локализованного в цитоплазматической мембране и обнаруживающего высокую специфичность к определенным углеводам, фосфатная группа поступает на углевод на наружной стороне цитоплазматической мембраны:



Фосфорилированные углеводы проникают через цитоплазматическую мембрану и накапливаются в цитоплазме, например, глюкоза поступает в клетку в виде глюкозо-6-фосфата. Система переноса углеводов получила название **фосфотрансферазной**. Перенос веществ с помощью фосфотрансферазной системы является выгодным с энергетической точки зрения. Хотя при этом происходит затрата богатой энергией фосфатной связи фосфоенолпирувата, в процессе переноса образуется молекула глюкозы в фосфорилированной форме (глюкозо-6-фосфат), а это делает ненужным фосфорилирование глюкозы за счет АТФ на первом этапе ее катаболизма.

2.2.4. Секреция продуктов жизнедеятельности бактериальной клеткой

Бактерии синтезируют и секретируют во внешнюю среду различные продукты своей жизнедеятельности. Секреция белков бактериями осуществляется с помощью различных систем и механизмов. При этом следует различать секрецию белков в периплазматическое пространство через цитоплазматическую мембрану и секрецию белков непосредственно в культуральную среду. У грамотрицательных бактерий большинство белков секретируется в периплазматическое пространство в виде белков-предшественников, содержащих в своей структуре особый сигнальный (лидерный) пептид из 15–40 аминокислотных остатков. Этот сигнальный (лидерный) пептид обеспечивает перенос белка-предшественника через цитоплазматическую мембрану, после чего отделяется от него с помощью сигнальной (лидерной) пептидазы.

Существует несколько моделей, объясняющих механизм, посредством которого сигнальный (лидерный) пептид обеспечивает секрецию белка-предшественника через цитоплазматическую мембрану в периплазматическое пространство.

Модель прямого транспорта предполагает прямое вхождение лидерного пептида в липидный бислой мембраны с использованием свободной энергии мембран-ассоциированных рибосом.

Сигнальная гипотеза предполагает, что в результате взаимодействия сигнального (лидерного) пептида с особым рецептором мембраны образуется внутримембранный канал, через который и осуществляется секреция.

Существуют и другие, более сложные, модели механизма переноса секретлируемого белка через цитоплазматическую мембрану. По-видимому, применительно к разным белкам и у разных групп бактерий действуют различные механизмы секреции. Лучше всего изучены механизмы секреции белков у бактерий *Escherichia coli*. У них обнаружены два пути секреции: *sec*-зависимый и относительно *sec*-независимый. Для обеспечения секреции белков по *sec*-зависимому механизму требуется участие продуктов ряда *sec*-генов: *secA*, *secY*, *secB*, *secD*, *secE* и *secF*. Источниками энергии для переноса белков служат гидролиз АТФ и градиент концентрации протонов. Для процессинга белка после его перемещения достаточно, по-видимому, активности только двух сигнальных пептидаз: сигнальной пептидазы I (м.м. 36кД, кодируется геном *lepB*) и сигнальной пептидазы II (м.м. 18кД, кодируется геном *lepA*).

Второй механизм переноса белков относительно *sec*-независимый используется бактериями *E.coli* для переноса коротких полипептидов, однако и в этом случае на ранней стадии также участвует белок *sec A*.

Следует отметить, что некоторые белки секретируются непосредственно в культуральную среду. При этом в каждом конкретном случае используются различные механизмы, которые также еще недостаточно изучены. Например, бактериоцины, синтез которых кодируется генами различных плазмид, не содержат в своей структуре сигнальных пептидов. Для их секреции через цитоплазматическую мембрану требуется специальный вспомогательный белок – рилизинг-белок. Система транспорта гемолизина *HlyA* состоит, как минимум, из двух вспомогательных белков *HlyB* и *HlyD*, которые образуют канал для непосредственного выхода гемолизина из цитоплазмы во внешнюю среду.

2.2.5. Цитоплазма и внутрицитоплазматические включения

Цитоплазма – это содержимое клетки, окруженное цитоплазматической мембраной. Фракция цитоплазмы, имеющая гомогенную консистенцию и содержащая набор растворимых РНК, ферментных бел-

ков, продуктов и субстратов метаболических реакций, получила название **цитозоля**. Другая часть цитоплазмы представлена структурными элементами: рибосомами, внутрицитоплазматическими включениями, нуклеоидом и мембранными структурами.

Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70S. Они образованы двумя субъединицами 30S и 50S. По величине и некоторым другим особенностям рибосомы бактерий сходны с рибосомами митохондрий и хлоропластов. Меньшая субъединица 30S содержит 1 молекулу 16SpРНК и, в большинстве случаев, по одной молекуле белков 21 вида. 50S-субъединица состоит из двух молекул рРНК (23S и 5S) и около 35 молекул различных белков, представленных также, как правило, одной копией.

Бактериальная клетка содержит от 5 до 50 тыс. рибосом, число их тем больше, чем больше скорость роста клетки.

Рибосомы служат местом синтеза белка. Синтез белка осуществляется агрегатами, состоящими из рибосом, информационной и транспортных РНК. Такие агрегаты называются **полирибосомами** или **полисомами**. Полирибосомы могут быть связанными с мембранными структурами или же находится свободно в цитоплазме.

Различия между рибосомами бактерий (70S) и эукариот (80S) имеют решающее значение для борьбы с инфекционными заболеваниями, так как некоторые антибиотики частично или полностью подавляют синтез белка, протекающий на рибосомах 70S типа, но не затрагивают функционирования рибосом 80S типа.

Внутрицитоплазматические включения подразделяются на активно функционирующие структуры и продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу из клетки, а откладывающиеся внутри клетки.

К первой группе внутриплазматических включений относятся **газовые вакуоли**, или **аэросомы**, обнаруженные у бактерий, обитающих в воде. Аэросомы снижают удельную массу бактериальной клетки и благодаря этому поддерживают ее во взвешенном состоянии в водоеме. Аэросома представляет собой скопление газовых пузырьков (везикул). Пузырьки имеют веретенообразную форму. Их оболочка состоит из чистого белка (т.е. устроена не так, как обычная мембрана). Белковые молекулы ориентированы таким образом, что внутренняя сторона оказывается гидрофобной, а наружная – гидрофильной.

К этой группе включений относятся также **хлоросомы** зеленых бактерий и **фикобилисомы** цианобактерий. В этих структурах локализованы пигменты, поглощающие кванты света и передающие энергию возбуждения на фотореакционные центры, т. е. они принимают

непосредственное участие в фотосинтезе. Это эллипсоидные образования, окруженные тонкой белковой оболочкой (2,5–3,0 нм толщиной), которая состоит из отдельных глобул.

Карбоксисомы или **полиэдрические тела** содержатся в клетках некоторых автотрофных бактерий. Они имеют форму многогранника диаметром 90–100 нм, окруженного однослойной белковой оболочкой. В карбоксисомах содержится рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза – ключевой фермент, катализирующий фиксацию CO_2 в цикле Кальвина в процессе фото- и хемосинтеза.

Магнитосомы содержат водные бактерии, способные ориентироваться в магнитном поле и перемещаться в направлении линий магнитного поля. Магнитосомы содержат 0,4% железа (по сухому веществу). Они располагаются в клетках вблизи мест прикрепления жгутиков.

Ко второй группе включений (продуктам клеточного метаболизма) относятся запасные вещества – полифосфаты, полисахариды, жиры, 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 же присутствия ингибиторов. Запасные вещества содержатся в клетках в осмотически инертной форме, т.е. они нерастворимы в воде. В условиях, благоприятных для роста, когда в этих веществах возникает потребность, они снова включаются в метаболизм.

Из полисахаридов в клетках микроорганизмов откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество гранулоза. Запасные вещества полисахариды образуются из молекул α -D-глюкозы, которые связаны α -1,4-гликозидными связями. Благодаря такому типу связей полиглюкозные цепи не вытянуты в длину, а закручены винтообразно. Много крахмала содержат клетки бактерий рода *Neisseria* и вида *Acetobacter pasteurianus*. Гранулоза содержится в большом количестве в клетках бактерий рода *Clostridium*. Гликоген или, «животный крахмал», содержится у бактерий *Escherichia coli*, у бактерий рода *Salmonella*, у бацилл, дрожжей и других микроорганизмов. Установлено, что он у бактерий встречается чаще, чем крахмал. Запасные полисахариды используются микроорганизмами в качестве источников углерода и энергии.

Жиры накапливаются в виде гранул и/или капелек, преломляющих свет, и поэтому хорошо различимы в световом микроскопе. Запасным жироподобным веществом многих бактерий (например рода *Pseudomonas*) является поли- β -гидроксимасяная кислота. Это полиэфир,

растворимый в хлороформе и состоящий примерно из 60 остатков β -оксибутирата. Доля этого вещества в сухой биомассе клеток может достигать 80%. Поли- β -гидрокси-масляная кислота является хорошим источником углерода и энергии. Микроорганизмы могут накапливать также триглицериды (нейтральные жиры). Особенно много их запасается в клетках дрожжей и других грибов. Кроме того, микобактерии могут содержать до 40% восков.

Полифосфаты откладываются в гранулах, называемых **волютиновыми** или **метахроматиновыми зёрнами**. Название «метахроматиновые зёрна» обусловлено тем, что они вызывают характерные изменения цвета (метахромазию) некоторых красителей (метиленового синего, толуидинового синего). Полифосфаты играют роль фосфатных депо и источников энергии.

У многих бактерий, таких как пурпурные и бесцветные серобактерии, зеленые серные бактерии и др., окисляющих сульфид до сульфата, в процессе метаболизма в клетке откладывается молекулярная сера в виде шариков, сильно преломляющих свет. Количество накапливаемой серы зависит от содержания H_2S в окружающей среде. В условиях отсутствия H_2S сера, находящаяся в клетке, окисляется до SO_4^{2-} . Сера служит источником энергии и донором электронов.

Специфическими запасными веществами цианобактерий являются **цианофитиновые гранулы**, состоящие из полипептида, в который входят аргинин и аспарагиновая кислота в эквимольных количествах. Остов молекулы полипептида построен из остатков аспарагиновой кислоты, соединенных пептидными связями, а к их β -карбоксильным группам присоединены остатки аргинина. Цианофитиновые гранулы служат резервом азота, который используется цианобактериями при его недостатке в среде.

2.2.6. Жгутики и движение бактерий

Большинство бактерий передвигаются при помощи жгутиков. Рассмотреть жгутики можно только в электронном микроскопе. В световом микроскопе без специальных методов обработки отдельные жгутики не видны.

По расположению и числу жгутиков на поверхности клетки бактерии подразделяются на:

монотрихи имеют один жгутик (например, бактерии родов *Caulobacter* и *Vibrio*);

лофотрихи имеют на одном или на обоих полюсах клетки пучок жгутиков (например, бактерии родов *Pseudomonas*, *Chromatium*);

амфитрихи имеют по жгутику на обоих полюсах клетки (например, бактерии рода *Spirillum*);

перитрихи большое количество жгутиков, располагающихся по всей поверхности клетки (например, бактерии вида *Escherichia coli* и рода *Erwinia*) (рис. 16).

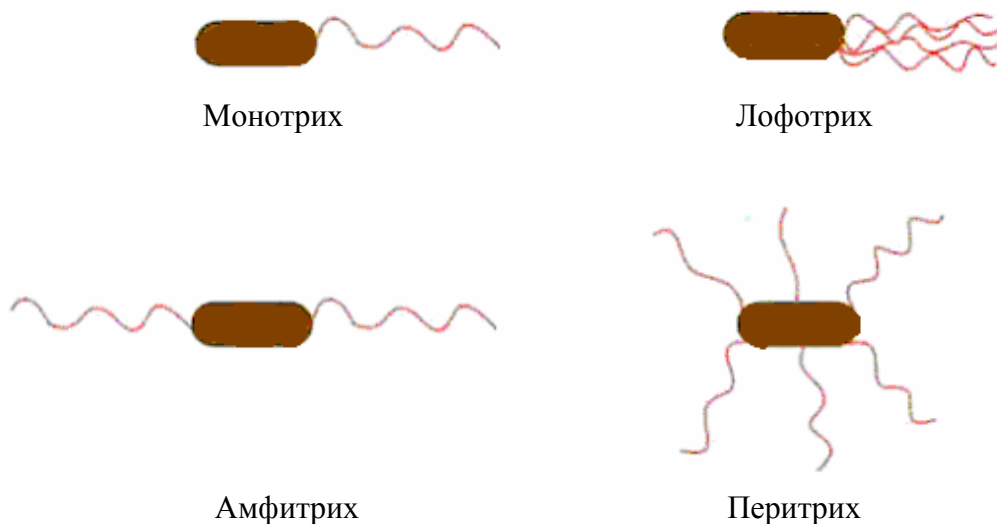


Рис. 16. Типы жгутикования у бактерий

Жгутики представляют собой спирально закрученные нити, состоящие из специфического белка **флагеллина**. Аминокислотный состав флагеллина у разных видов бактерий может варьировать. Флагеллин построен из субъединиц с относительно малой молекулярной массой. Субъединицы располагаются по спирали вокруг внутреннего свободного пространства.

Жгутик состоит из трех частей: нити, крюка и базального тельца (рис. 17). С помощью базального тельца, которое состоит из центрального стержня и колец, жгутик закреплен в цитоплазматической мембране и клеточной стенке. Количество колец у грамотрицательных и грамположительных бактерий различно. У грамотрицательных бактерий имеется 4 кольца: L, P, S, M. Из них L и P – наружная пара колец; S и M – внутренняя пара колец. L-кольцо расположено в наружной мембране, P – в пептидогликановом слое клеточной стенки, S – в периплазматическом пространстве, а M – в цитоплазматической мембране.

У грамположительных бактерий базальное тельце устроено проще. Оно состоит только из двух колец: S и M, т.е. только из внутренней пары колец, которые размещаются в цитоплазматической мембране и клеточной стенке.

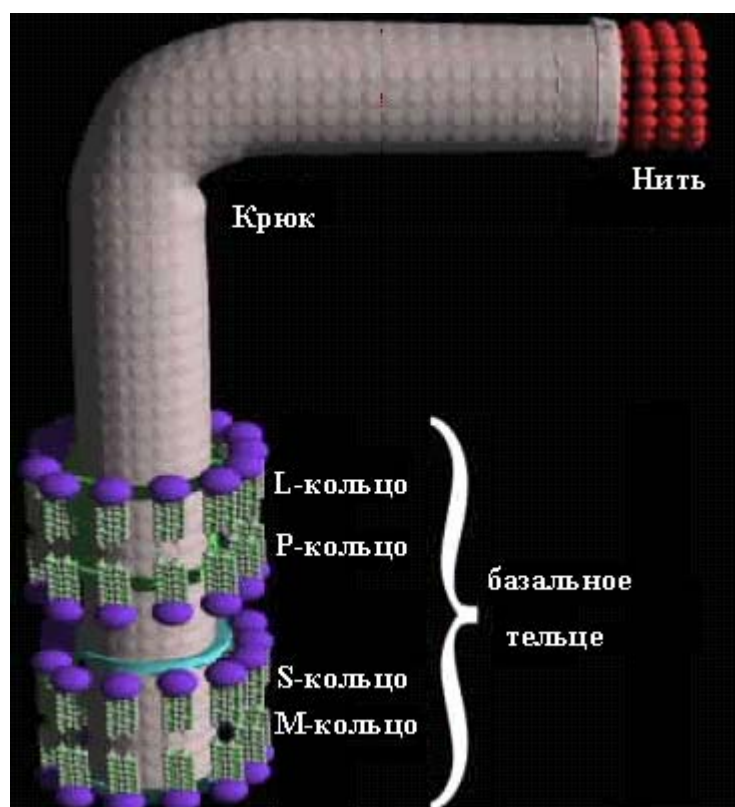


Рис. 17. Структура жгутика грамотрицательных бактерий (по Т.Паустиану, 2001)

Жгутики бактерий по характеру работы подобны корабельному винту. Если клетка имеет много жгутиков, они при движении собираются в пучок, который образует своеобразный пропеллер. Пучок жгутиков, быстро вращаясь против часовой стрелки, создает силу, заставляющую бактерию двигаться почти по прямой линии. После того, как направление вращения жгутиков изменяется, пучок расплетается и бактерия останавливается, вместо поступательного движения она начинает хаотически вращаться, ее ориентация изменяется. В тот момент, когда все жгутики бактерии снова начнут синхронно вращаться против часовой стрелки, образовав пропеллер, толкающий бактерию, направление ее поступательного движения будет отличаться от первоначального. Таким способом бактерия может изменять направление своего движения.

Так как у грамположительных бактерий наружная пара колец отсутствует, то считают, что для вращения жгутиков необходимо наличие только внутренней пары (кольца S и M). Эти кольца, соединенные с вращающимся стержнем, выступающим наружу, и образуют так называемый электромотор, обеспечивающий движение жгутика (рис. 18). На периферии кольца M находятся белки *MotB*. Белки *MotA* встроены в цитоплазматическую мембрану и примыкают к краям ко-

лец M и S. Вращающий момент возникает за счет взаимодействия субъединиц белка *MotB* с белковыми субъединицами *MotA*. В белковых субъединицах *MotA* имеется по два протонных полуканала. Через эти протонные полуканалы переносятся протоны из периплазматического пространства в цитоплазму бактерий (подобно протонному каналу АТФ-синтазы). В результате переноса протонов через белки *MotA* и *MotB* происходит вращение кольца M. Установлено, что один полный оборот кольца M связан с переносом через мембрану около 1000 протонов. Таким образом, в качестве источника энергии для вращения жгутиков используется протондвижущая сила, возникающая в цитоплазматической мембране.

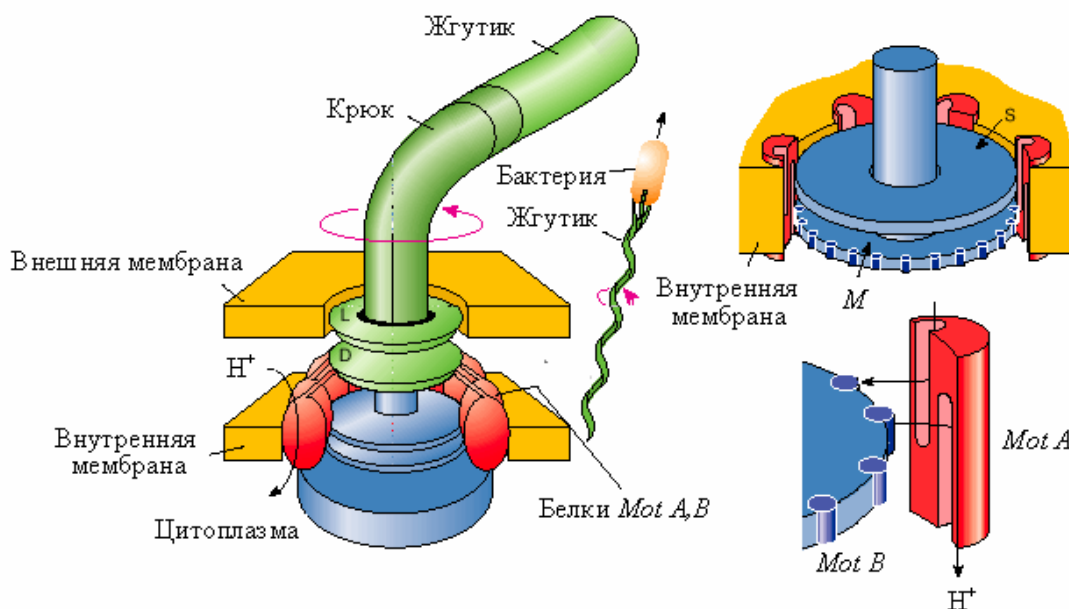


Рис. 18. Схематическое изображение электромотора, вращающего жгутики бактерий (по А.Н.Тихонову, 1999)

Своеобразный тип движения характерен для спирохет. Клетка спирохет состоит из протоплазматического цилиндра, окруженного цитоплазматической мембраной, и внешнего чехла, представленного пептидогликановым слоем и наружной мембраной. Вокруг протоплазматического цилиндра в периплазматическом пространстве находятся пучки нитчатых структур – **аксиальных фибрилл**, которые как и жгутики состоят из белка флагеллина. Эти структуры обеспечивают движение спирохет как в жидкой среде, так и на разделе фаз жидкой и плотной среды (рис. 19).

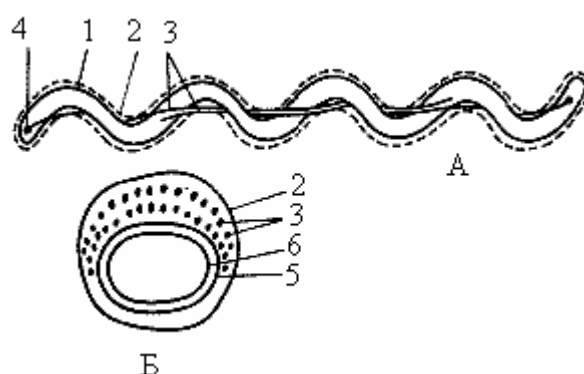


Рис. 19. Клетка спирохеты в продольном (А) и поперечном (Б) разрезе. На рис. А изображена клетка, содержащая по одной аксиальной фибрилле у каждого конца; на рис. Б – поперечный разрез, прошедший через среднюю часть клетки, где показаны два пересекающихся пучка, состоящих из множества аксиальных фибрилл: 1 – протоплазматический цилиндр; 2 – наружный чехол; 3 – аксиальные фибриллы; 4 – место прикрепления аксиальных фибрилл; 5 – пептидогликановый слой клеточной стенки; 6 – цитоплазматическая мембрана (по М.В.Гусеву, Л.А.Минеевой, 2003)

Число аксиальных фибрилл колеблется от 2 до 100. Один конец каждой аксиальной фибриллы прикреплен вблизи полюса протоплазматического цилиндра, а другой свободный. Клетка содержит по два набора фибрилл, прикрепленных субполярно у каждого клеточного конца. Каждая аксиальная фибрилла тянется почти вдоль всей длины клетки. В центральной части клетки аксиальные фибриллы перекрываются.

Фибриллы, вращаясь или сокращаясь, обуславливают характерное для спирохет движение: путем изгибания, вращения вокруг оси, волнообразно, винтообразно.

У некоторых прокариот установлен **скользящий тип передвижения**. Способность к скольжению выявлена у некоторых микоплазм, миксобактерий, цианобактерий, нитчатых серобактерий и др. Скорость при таком типе передвижения небольшая: 2 – 11 мкм/сек. Общим для всех микроорганизмов, способных к скольжению, является выделение слизи. Кроме того, у ряда таких прокариот в составе клеточной стенки между пептидогликановым слоем и наружной мембраной выявлен тонкий слой белковых молекул. Например, у нитчатых цианобактерий фибриллы образуют единую систему, которая в виде спирали окружает весь трихом (нить). Скольжение нитчатых форм сопровождается и одновременным их вращением, поэтому каждая точка на поверхности трихома описывает при движении спираль. Направление вращения является видоспецифическим признаком и коррелирует с направлением хода спирали белковых фибрилл.

Механизмы скользящего движения не ясны и существуют несколько гипотез, которые их объясняют. Согласно гипотезы реактивного движения скользящее передвижение обусловлено выделением слизи через многочисленные слизевые поры в клеточной стенке, в результате чего клетка отталкивается от субстрата в направлении противоположном направлению выделения слизи. Однако при анализе этой модели было сделано заключение, что для обеспечения скольжения по «реактивному» механизму клетке нужно на протяжении одной секунды выделить такой объем слизи, который во много раз больше ее цитоплазматического содержимого.

В соответствии со второй гипотезой, получившей распространение в последние годы, скользящий тип движения связан с присутствием белкового слоя, который состоит из правильно расположенных фибрилл, аналогичных нитям жгутиков, но находящихся внутри клеточной стенки. У некоторых скользящих бактерий описаны структуры очень схожие с базальными тельцами жгутиковых форм. Вращательное движение фибрилл, которое «запускается» этими структурами, приводит к появлению на поверхности клетки «бегущей волны» или движущихся микроскопических выпуклостей клеточной стенки, в результате чего клетка отталкивается от твердого или вязкого субстрата. Согласно этой гипотезе, выделение слизи не является абсолютно необходимым для скольжения, но улучшает, в определенных условиях, отталкивание клетки от субстрата. Показано, что скольжение может осуществляться без выделения слизи в среде подходящей консистенции. Более того, выделение большого количества слизи, как правило, мешает передвижению клетки или приводит к его потере.

Для подвижных бактерий характерны **таксисы**, т.е. направленная двигательная реакция в ответ на определенный фактор. В зависимости от него отличают хемотаксис, фототаксис, магнитотаксис и вискозитаксис.

Хемотаксис – движение бактерий относительно источника химического вещества. Для каждого микроорганизма все химические вещества в этом плане могут быть разделены на две группы: инертные и вызывающие таксисы, или эффекторы. Среди эффекторов выделяют: аттрактанты – вещества, которые притягивают бактерии; репелленты – вещества, которые отпугивают бактерии.

Фототаксис – движение к источнику света или от него, свойственное фототрофным бактериям.

Магнитотаксис – способность бактерий передвигаться по силовым линиям магнитного поля Земли или магнита. Он выявлен в клет-

ках бактерий, содержащих магнитосомы и распространенных в водных экосистемах разного типа.

У ряда бактерий выявлен **вискозитаксис** – способность реагировать на изменение вязкости раствора и передвигаться в направлении ее увеличения или уменьшения.

За чувствительность бактерий к градиенту концентраций определенных факторов ответственны специфические рецепторы. Рецептор реагирует на эффектор и передает сигнал определенного типа на базальное тельце жгутика.

2.2.7. Ворсинки (или фимбрии)

Ворсинки – поверхностные структуры белковой природы, состоящие из белка пилина и не выполняющие функции движения. По размерам они короче и тоньше жгутиков. Число фимбрий на поверхности клетки колеблется от 1 – 2 до нескольких тысяч. Фимбрии имеют как кокковидные, так и палочковидные бактерии.

Различают два типа фимбрий: общие и специфические.

Фимбрии общего типа выполняют функцию прикрепления клетки к поверхности субстрата. Возможно, что они также принимают участие в поступлении крупномолекулярных соединений в цитоплазму.

Специфические ворсинки – половые пили. Они обнаружены у клеток так называемых доноров, т.е. у клеток, содержащих половой фактор (F-плазмиду) или другие донорспецифические плазмиды. Если в клетке бактерий находится половой фактор, то на их поверхности синтезируются половые F-пили в количестве 1 – 2 на клетку. Они имеют вид полых белковых трубочек длиной от 0,5 до 10 мкм. F-пили играют определяющую роль в образовании конъюгационных пар при переносе генетического материала от клетки донора в клетку реципиента.

2.2.8. Капсулы, слизи и чехлы

Многие микроорганизмы продуцируют на поверхности клетки слизистое вещество. В зависимости от толщины слизистого слоя принято различать **микрокапсулу**, толщиной до 0,2 мкм (она видима лишь в электронном микроскопе). Связь микрокапсулы с клеточной стенкой настолько прочна, что ее иногда предлагают рассматривать как элемент клеточной стенки. **Макрокапсула** – слой слизи толщиной более 0,2 мкм. **Слизь** – слизистое вещество, окружающее клетку, имеющее аморфный, бесструктурный вид и легко отделяющееся от поверхности бактериальной клетки, а по толщине часто превосходящее ее диаметр.

Капсулы и слизь не являются обязательными структурами бактериальной клетки, так как бактерии, их образующие могут в результате мутаций легко превращаться в бескапсульные формы, и эти изменения не приводят к какому либо нарушению клеточной активности.

В большинстве случаев капсула образована полисахаридами (например, у бактерий вида *Streptococcus mutans*, некоторых представителей родов *Xanthomonas*, *Klebsiella*, *Corynebacterium* и др.). Капсулы же других видов бактерий состоят из полипептидов, представленных полимерами, в которых содержится много D- и L- форм глутаминовой кислоты. Примером такой капсулы является капсула бактерий *Bacillus anthracis*. Для ряда бактерий показана также способность синтезировать капсулу, состоящую из волокон целлюлозы. Так построена капсула у бактерий вида *Sarcina ventriculi*.

Слизи по химической природе являются полисахаридами. Особенно обильное их образование наблюдается у многих микроорганизмов при выращивании на среде с сахарозой. Например, бактерии *Leuconostoc mesenteroides* (относящиеся к молочнокислым бактериям) быстро превращают раствор, содержащий тростниковый сахар, в декстрановый студень, за что их на сахарных заводах называют «бактериями лягушачьей икры».

Функции, которые выполняют капсулы и слизи, можно определить следующим образом:

- защитная, предохраняющая клетку от действия различного рода неблагоприятных факторов внешней среды (механических повреждений, высыхания, создание дополнительного осмотического барьера);
- у некоторых бактерий (например, у *Streptococcus pneumoniae*) капсула является фактором вирулентности;
- препятствуют адсорбции на клетках бактериофагов;
- у некоторых бактерий капсульная слизь является источником запасных питательных веществ;
- за счет наличия капсулы и слизи осуществляется объединение клеток в цепочки, колонии;
- обеспечение прикрепления клеток к поверхности субстрата.

Капсульные полисахариды, образуемые бактериями, имеют большое практическое значение. Ксантан, внеклеточный полисахарид бактерий *Xanthomonas campestris*, используется в составе смазок, при добыче нефти, в пищевой промышленности для улучшения вкусовых свойств консервированных и замороженных продуктов, соусов, кремов и др., а также в косметической промышленности. Декстраны, синтезируемые бактериями *Leuconostoc mesenteroides* и некоторыми другими бактериями, находят применение в качестве кровезаменителей,

для лечения ожогов, для разделения и очистки биологических молекул, в качестве полиэлектролитов.

В отличие от капсул и слизистых слоев чехлы имеют тонкую структуру, и в их составе выявляют несколько слоев разного строения. Чехлы имеют обычно и более сложный химический состав. Например, чехол бактерий *Sphaerotilis natans* содержит 36% углеводов, 11% – гексозамина, 27% – белков, 5,2% – липидов и 0,5% – фосфора. Чехлы ряда бактерий, метаболизм которых связан с окислением восстановленных соединений металлов, часто инкрустированы их окислами.

Следует отметить, что между капсулами, чехлами и слизистыми слоями у прокариот обнаружено много переходных форм, что зачастую не позволяет точно отличить капсулу от слизистых клеточных выделений, или капсулу от чехла.

2.2.9. Эндоспоры и другие покоящиеся формы бактерий

Эндоспоры бактерий – особый тип покоящихся клеток, в основном, грамположительных бактерий. Эндоспоры формируются эндогенно, т.е. внутри материнской клетки – спорангия. Бактериальная эндоспора отличается от вегетативной клетки тем, что она характеризуется повышенной резистентностью к нагреванию, действию ультрафиолетовых лучей, антибиотиков и т.д. Споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течении двух часов, также они могут длительное время сохраняться в покоящемся состоянии. Эти особенности спор являются свойствами, требующими в практической деятельности человека применения особых приемов для их уничтожения.

К спорообразующим бактериям относится большое число грамположительных видов прокариот приблизительно из 15 родов, характеризующихся морфологическим и физиологическим разнообразием. Лучше всего процесс спорообразования изучен у представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*.

Поскольку одна клетка образует одну эндоспору, увеличения числа бактерий при ее прорастании не происходит, поэтому спорообразование не рассматривают как способ размножения бактерий. Эндоспоры представляют собой стадию покоя и приспособлены к перенесению неблагоприятных условий. Переход бактерий к спорообразованию (споруляции) наблюдается обычно при истощении питательного субстрата, недостатке источников углерода, азота, фосфора, изменении pH и т.д. Процесс спорообразования является энергозависимым и, в зависимости от того, откуда поступает энергия, споруляцию разделяют на эндотрофную и экзотрофную. Эндотрофная споруляция осуществляется за счет внутреннего запаса энергии и не нуждается в до-

полнительных веществах. В случае же экзотрофных процессов используется экзогенная энергия, поступающая из вне.

Способность к образованию спор детерминируется генами *spo*, которых у бактерий *Bacillus subtilis* (по данным Г.Халворсена) более 100. Каждый из *spo*-генов отвечает за те или иные стадии споруляции.

Процесс спорообразования можно разделить на несколько стадий или этапов (рис.20):

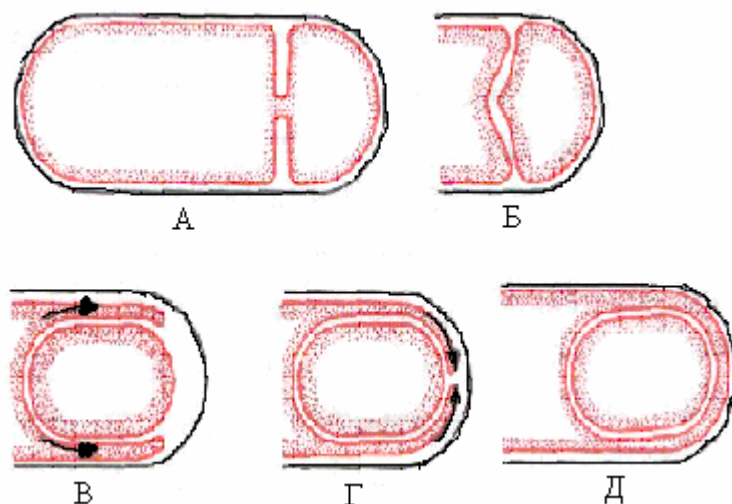
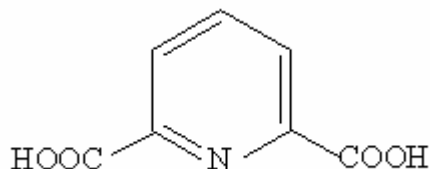


Рис. 20 . Схема процесса спорообразования: А, Б – процесс отделения протопласта споры; В, Г, Д – образование предспоры (по Г.Шлегелю, 1987)

1 этап – подготовительный. В вегетативной клетке бактерий, переходящей к спорообразованию, прекращаются ростовые процессы, завершается репликация ДНК и изменяется метаболизм, а именно: распадается значительная часть белков материнской клетки, образуется специфическое для спор вещество – дипиколиновая кислота, которая не встречается в вегетативных клетках:



Дипиколиновая кислота находится в эндоспорах в виде дипиколината кальция, и именно это соединение обеспечивает высокую терморезистентность спор.

2 этап – формирование споры – начинается с особого неравного деления клетки. Цитоплазматическая мембрана вегетативной клетки образует впячивание (инвагинацию) от периферии к ее центру и отде-

ляет часть протопласта материнской клетки. В результате протопласт содержит один нуклеоид с участком уплотненной цитоплазмы. Образования клеточной стенки между обоими протопластами (как при обычном делении) в данном случае не происходит. Вместо этого протопласт будущей споры обрастает цитоплазматической мембраной материнской клетки, образуемая структура носит название предспоры или протоспоры.

Предспора расположена внутри материнской клетки и ограничена от нее двумя мембранами. Каждая из этих мембран участвует в синтезе стенки споры. Мембрана протопласта споры синтезирует снаружи от себя стенку зародышевой клетки (зародыша). Мембрана, происходящая от материнской цитоплазматической мембраны, синтезирует во внутрь кору споры или кортекс. Кортекс состоит из многослойного пептидогликана мууреина, но более кислого, чем муурейн клеточной стенки материнской клетки.

Кроме кортекса и стенки зародыша синтезируется еще и наружная оболочка споры. Наружная оболочка споры в значительной степени состоит из полипептидов. У большинства видов спорообразующих бактерий эндоспора заключена еще в один дополнительный слой – экзоспориум, в состав которого входят белки, липиды, углеводы.

По мере формирования многослойных покровов предспора превращается в спору (рис. 21).

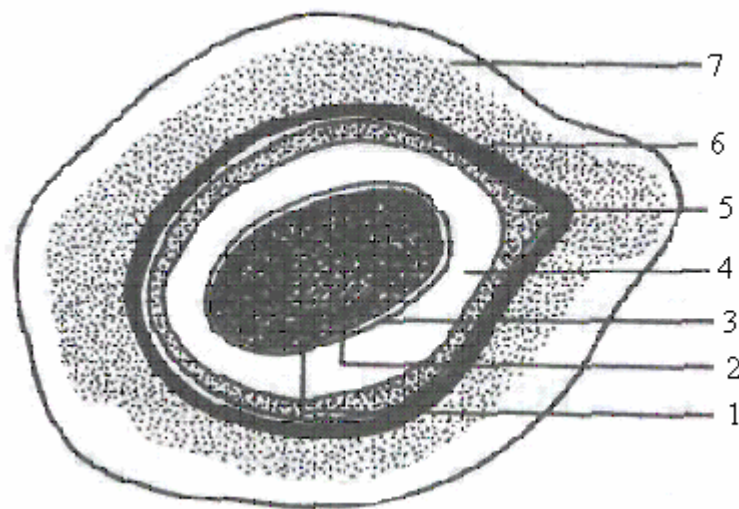


Рис. 21. Схема строения зрелой споры: 1 – цитоплазма, 2 – цитоплазматическая мембрана, 3 – клеточная стенка зародыша, 4 – кора споры, 5 – внутренняя оболочка споры, 6 – наружная оболочка споры, 7 – экзоспориум. (по Г. Шлегелю, 1987)

Таким образом, эндоспора состоит из следующих структурных элементов: нуклеоида, уплотненной цитоплазмы (происходит дегидратация споры, белки переходят в связанное состояние, снижается активность некоторых ферментов и синтезируется дипиколинат кальция), покровных слоев, представленных цитоплазматической мембраной, клеточной стенкой зародыша, кортексом, внутренней оболочкой, наружной оболочкой, экзоспориумом.

3 этап – созревание споры. Спора приобретает характерную форму и занимает определенное положение в клетке. Диаметр эндоспоры может превышать или не превышать диаметр вегетативной клетки. В результате этого бактериальная клетка со спорой может принимать форму веретена или теннисной ракетки. Споры в клетке могут располагаться центрально (например, у *Bacillus megaterium*), субтерминально (*Clostridium botulinum*) или терминально (*Clostridium tetani*) (рис. 22).

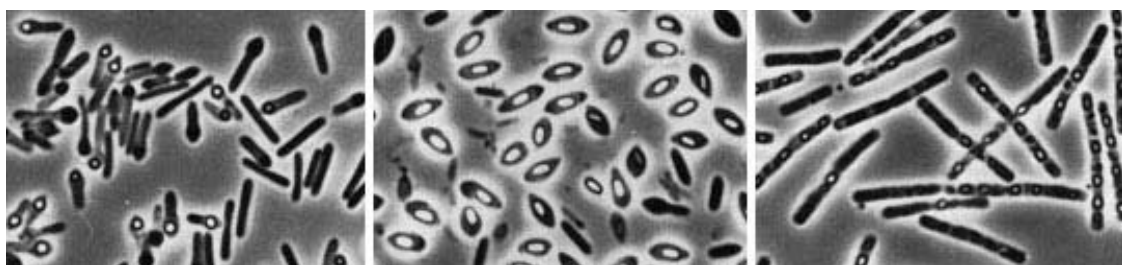


Рис. 22. Расположение эндоспор в клетках бактерий (фазово-контрастная микроскопия)

Споры освобождаются при лизисе спорангия. Зрелые споры не проявляют метаболической активности. Они чрезвычайно устойчивы к воздействию высокой температуры, разного рода излучений и химических агентов. Терморезистентность обусловлена, как уже отмечалось, очень низким содержанием воды и наличием дипиколината кальция.

При попадании в благоприятные условия споры прорастают в вегетативные клетки. Процесс прорастания спор начинается с поглощения воды и гидратации структур споры, сопровождающихся активацией ферментов и возрастанием дыхания. Литические ферменты разрушают многослойные покровы споры, в среду выделяется дипиколинат кальция, аминокислоты и пептиды. Спора при этом теряет до 25 – 30% сухой массы. В месте разрыва оболочки споры образуется ростовая трубка новой вегетативной клетки. В формировании клеточной стенки образующейся клетки участвует внутренняя мембрана споры и

частично кортекс. Процесс прорастания споры длится около 4 – 5 часов.

Процесс прорастания спор можно индуцировать, подвергнув споры прогреванию до 60 – 70 °С в течении нескольких минут или кратковременному кипячению (10 минут при 100 °С). Тепловой шок должен проводиться непосредственно перед высевом спор, так как процесс активации обратим.

К другим покоящимся формам бактерий относятся: цисты, экзоспоры, микроспоры. Как и эндоспоры, все эти покоящиеся формы предназначены для перенесения бактериями неблагоприятных условий. **Экзоспоры** возникают путем почкования материнской клетки. Они сходны по своим свойствам с эндоспорами бацилл. Образование экзоспор характерно для метаноксилирующих бактерий. В цисту превращается вся вегетативная клетка. **Цисты** – это шарообразные толстостенные клетки, образование которых характерно для бактерий рода *Azotobacter*. **Микроспоры** образуются также путем превращения всей клетки. Характерно образование микроспор для бактерий рода *Mycococcus*.

2.2.10. Нуклеоид и репликация ДНК

Генетический материал прокариот представлен молекулой (молекулами) ДНК, уложенными в компактную структуру и локализованными в ограниченных участках цитоплазмы, не имеющей, в отличие от эукариот, собственной ядерной мембраны. Учитывая эти особенности, генетический аппарат прокариот принято называть **нуклеоидом**.

Тот факт, что в состав нуклеоида входит ДНК, впервые удалось показать Ж.Кэрнсу с помощью метода радиоавтографии. Для этого бактерии *E.coli* выращивали на среде, содержащей предшественник тимина тимидин, меченный тритием (³H). Известно, что ДНК – единственное вещество в клетке, которое содержит тимин. Если клетки бактерий, включившие тритий в тимин, лизировать с помощью лизоцима на мембранном фильтре, то можно получить радиоавтограф развернутой молекулы бактериальной ДНК. Такие радиоавтографы убедительно доказывают, что ДНК бактерий *E.coli* имеет форму нити, замкнутой в кольцо. Эта замкнутая в кольцо молекула ДНК включает несколько тысяч генов, расположенных линейно, и называется хромосомой.

В зависимости от метода микроскопирования и фиксации нуклеоид выглядит по-разному. При применении светового микроскопа, фиксации парами тетраоксида осмия или использовании различных вариантов окрашивания по Романовскому-Гимза, нуклеоид вы-

глядит как бобовидное тело с хорошо очерченными контурами, занимающее центральную часть бактериальной клетки, и длиной (у бактерий кишечной группы) около одного микрометра. В фазово-контрастном микроскопе в клетках живых бактерий нуклеоид также выглядит как овальное тельце, светлое на фоне темной цитоплазмы. При микроскопировании ультратонких срезов бактерий в электронном микроскопе нуклеоид напоминает клубок мотков толстой веревки, состоящей из множества нитей. Используя тот же способ микроскопирования и применение иммуноокрашивания срезов замороженных бактерий, можно увидеть нуклеоид в виде кораллоподобной структуры с плотной сердцевиной и тонкими рогами – выступами. Выступы, или ветви, пронизывают цитоплазму и образуют нечто вроде ореола вокруг сердцевины.

Полностью «уложенный» нуклеоид представляет собой достаточно компактное образование. Стабилизирующую роль в такой организации играют специфические белки. У бактерий кишечной группы известно по меньшей мере пять белков *HU*, *INF*, *H1*, *HLP1* и *H*, которые способствуют «упаковке» ДНК. Они сходны по аминокислотному составу и другим свойствам с гистонами эукариот, имеют сравнительно небольшие размеры (9 – 28 КД) и, в большинстве своем, относятся к основным. Похожие белки, которые способствуют «упаковке» ДНК, выделены у самых различных микроорганизмов, в том числе и архебактерий. Наибольшее значение в «упаковке» ДНК играет белок *HU*. Связываясь с ДНК, он меняет конформацию ее витков.

Важную роль как для сохранения целостности структуры, так и для функционирования генома бактерий играет прикрепление нуклеоида к цитоплазматической мембране. При щадящих способах нуклеоида выделяются вместе с «фрагментами» мембраны. С использованием различных методов было показано, что имеются фиксированные точки прикрепления нуклеоида к мембране: точка начала репликации и точка завершения репликации. Кроме того, нуклеоид имеет «скользящие участки» прикрепления к мембране, в частности тот участок, в котором в данный момент идет репликация, и большое количество «неспецифических» точек контакта с мембраной.

Хотя каждая бактериальная клетка у большинства видов бактерий содержит одну хромосому (большинство бактерий – гаплоидные организмы), часто в интенсивно растущей культуре количество ДНК на клетку может достигать массы, равной 3,4,8 и более хромосом. Из этого следует, что термины «нуклеоид» и «хромосома» не всегда совпадают. В зависимости от условий нуклеоид бактериальной клетки может состоять из одной или нескольких копий одной и той же хро-

мосомы. Так, у *Azotobacter chroococcum* в экспоненциальной фазе роста (наиболее интенсивного роста и размножения) на одну клетку приходится 20–25 копий хромосомы, у *Desulfovibrio gigas* – 9 – 17 копий хромосомы.

Размеры хромосомной ДНК у различных видов бактерий отличаются друг от друга. В качестве примера можно привести размеры хромосомной ДНК некоторых бактерий. У одной из наименьших по размеру бактерий *Mycoplasma genitalium*, вызывающей у людей уретриты, величина хромосомной ДНК равна 580.070 н.п.; у бактерий *E.coli* – 4.653.831 н.п. Нить хромосомной ДНК у бактерий *E.coli* имеет линейный размер в 1,6 мм, а длина упакованного нуклеоида – 1 мкм (то есть он короче хромосомы в 1600 раз).

Уже отмечалось, что большинство бактерий – гаплоидные организмы, т.е. они имеют одну хромосому. Однако за последние 10 лет обнаружено, что у различных видов бруцелл, *Rhodobacter sphaeroides*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Leptospira interrogans* клетки имеют по две хромосомы, различающиеся между собой по величине. У *Burkholderia ceracia* имеется даже три хромосомы. Эти данные были получены посредством пульс-фореза, позволяющего разделить по подвижности в геле очень крупные молекулы ДНК.

Сравнительно недавно считалось, что хромосомная ДНК бактериальной клетки, как правило, замкнута в кольцо, что доказывалось с помощью метода радиоавтографии. Кроме того, о кольцевой структуре хромосомы у *E.coli*, *Salmonella typhimurium* и *Bacillus subtilis* свидетельствуют и данные генетического анализа: были построены кольцевые генетические карты без каких-либо провалов между группами сцепления. Наконец, физические карты хромосом, построенные с использованием ферментов рестриктаз, разрезающих хромосому в участках редко встречающихся нуклеотидных последовательностей, также свидетельствовали о кольцевой организации хромосом. Такие хромосомы, в силу своей структуры, не могли быть разделены в геле при пульс-форезе. Однако в 1989 году была опубликована статья о необычном поведении при пульс-форезе хромосомы *Borrelia burgdorferi* – возбудителя клещевого спирохетоза. Эта ДНК входила в гель и двигалась в нем точно так же, как заведомо линейные хромосомы дрожжей, взятые в качестве контроля. У других спирохет (лептоспир и трепонем) хромосома была кольцевой. Терминальные участки ДНК линейной хромосомы у боррелий заканчивались шпилечными структурами.

Позже появились данные о том, что после обработки протеазами выделенная из клеток кольцевая ДНК ряда видов актиномицетов пре-

вращается в линейную. Это было неожиданным, так как для актиномицетов уже существовали физические кольцевые карты. Однако выяснилось, что хромосомы актиномицетов оказались «псевдокольцевыми»: они были замкнуты не за счет непрерывного перехода цепочки ДНК правого полукружия хромосомы в левое, а за счет взаимодействия белковых молекул, расположенных на свободных концах ДНК линейной хромосомы, и замыкающих их. Протеазы разрывают эту связь. Таким образом, у актиномицетов другой тип организации хромосомы, чем у боррелий. Линейная хромосома была найдена ещё и у фитопатогенных бактерий вида *Rhodococcus fascians*.

Отметим основные моменты репликации кольцевой бактериальной хромосомы, поскольку этот тип организации является основным для хромосом бактерий.

Теоретически возможны три механизма репликации (рис. 23):

1. **Консервативный** механизм, при котором сохраняется целостность всей родительской двойной спирали (не происходит раскручивания спирали), и она является матрицей для синтеза себе подобной. Дочерняя двойная спираль полностью образуется из нового материала, а родительская как таковая сохраняется.

2. **Дисперсивный** механизм, в соответствии с которым родительская молекула ДНК распадается на фрагменты, а синтез новых цепей происходит на фрагментах, которые затем крест-накрест объединяются с отрезками нового материала. Каждая полинуклеотидная цепь в этом случае должна была бы состоять из чередующихся отрезков старого и нового материала.

3. **Полуконсервативный** механизм предполагает, что родительская двойная спираль раскручивается, и каждая полинуклеотидная цепь служит матрицей для синтеза новой комплементарной цепи. Таким образом, новая двойная молекула оказывается «гибридом» старой и вновь синтезированной цепи.

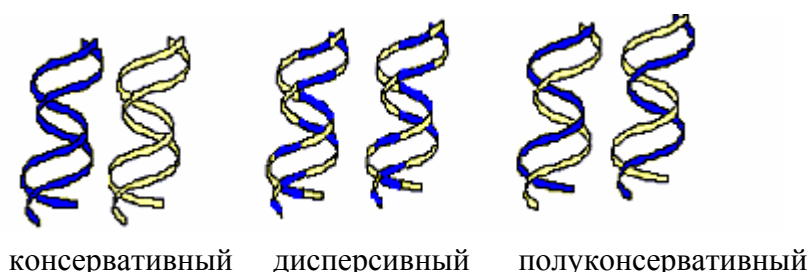


Рис. 23. Механизмы репликации ДНК

В 1957 году М.Меселсон и Ф.Сталь экспериментально доказали, что репликация хромосомной ДНК у бактерий происходит по полуконсервативному механизму. Для доказательства этого бактерии *E.coli* выращивали на среде в присутствии хлористого аммония, содержащего тяжелый изотоп азота (^{15}N). Через некоторое время бактерии переносили на среду с легким азотом (^{14}N). До и после пересева через определенные промежутки времени отбирали пробы бактерий, лизировали их, из клеток выделяли ДНК и определяли ее плотность методом равновесного центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия. Параллельно бактерии выращивали в присутствии только легких или только тяжелых изотопов азота и проводили те же процедуры, что и с опытными культурами *E.coli*.

Оказалось, что препараты ДНК, выделенные из бактерий, выращенных на средах с разными формами азота, отличаются по плотности. ДНК, выделенная из бактерий, выращенных на среде с ^{15}N , более тяжелая, чем ДНК бактерий, выращенных на среде с ^{14}N . ДНК, выделенная же из бактерий, первоначально растущих, на среде с ^{15}N , а затем перенесенных на среду с ^{14}N , имела промежуточную плотность, т.е. была «полутяжелой» или «гибридной» ДНК. Общее количество такой полутяжелой ДНК оставалось постоянным на протяжении нескольких поколений (генераций), тогда как количество «легкой» ДНК увеличилось. Меселсон М. и Сталь Ф. сделали вывод, что в молекуле «полутяжелой» ДНК в составе пуриновых и перимидиновых оснований одна цепь содержит ^{15}N , а вторая – ^{14}N (рис. 24).



Рис. 24. Схема опыта М.Меселсона и Ф.Сталя

Результаты этих экспериментов не объясняются ни с консервативным, ни с дисперсивным механизмом репликации ДНК, т.к. при консервативном механизме выявились бы только полосы тяжелой и легкой ДНК, а при дисперсивном – только полосы гибридной ДНК (и после нескольких генераций). Для доказательства того, что «полутяжелая» ДНК состоит из одной нити содержащей ^{15}N и одной нити содержащей ^{14}N они ее подвергали «плавлению» (нагревали до 100°C и быстро охлаждали). При этом образовывались одноцепочечные ДНК

(разрывались водородные связи). Полученный препарат центрифугировали в градиенте плотности хлористого цезия, после чего были выявлены две полосы: типичная для одноцепочечной ДНК с ^{14}N и типичная для такой же ДНК с ^{15}N .

Таким образом, М.Меселсон и Ф.Сталь доказали, что репликация хромосомной ДНК у бактерий осуществляется по полуконсервативному механизму.

Молекулярные механизмы репликации бактериальной ДНК сходны в общих чертах с таковыми у других организмов. Для того, чтобы произошла репликация ДНК по полуконсервативному механизму необходимо, чтобы двухцепочечная молекула ДНК расплелась с образованием одноцепочечных фрагментов. В этом процессе участвует несколько ферментов, основными из них являются:

1) ДНК-геликазы, перемещающиеся по цепи ДНК в направлении $5' \rightarrow 3'$, и перемещающиеся в направлении $3' \rightarrow 5'$;

2) SSB-белки (*single strand binding* – белки, связывающиеся с одонитевой ДНК), которые связываются с одонитевой ДНК и препятствуют ее ренатурации;

3) ДНК-гиразы, или топоизомеразы белки, которые снимают напряжение при раскручивании кольцевых молекул ДНК и способствуют ее расплетанию.

На образовавшихся одонитевых участках ДНК идет синтез комплементарных цепей. В этом процессе участвуют ферменты ДНК-полимеразы. У бактерий *E.coli* синтезируются три типа ДНК-полимераз (I, II и III). Главную роль в репликации хромосомной ДНК у бактерий *E.coli* играет ДНК-полимераза III.

Доказано, что синтез ДНК протекает только в направлении от $5'$ к $3'$ -ОН концу (рис. 25). Однако, цепи ДНК противоположно направлены и поэтому синтез одной из дочерних цепей осуществляется непрерывно с помощью ДНК-полимеразы III в направлении $5' \rightarrow 3'$. ДНК-полимераза III перемещается по цепи $3' \rightarrow 5'$, в направлении раскрытия репликативной вилки и синтезирует новую цепь. Эта цепь называется **ведущей** или **лидирующей**.

Копия второй цепи ($5' \rightarrow 3'$) называется **запаздывающей** и она синтезируется из фрагментов ДНК размером 1000 – 2000 нуклеотидов. Они называются **фрагментами Оказаки**. Для синтеза фрагментов Оказаки необходима “затравка” или праймер. В качестве затравки выступает короткая цепь РНК, которая синтезируется с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы на матрице ДНК. К этой затравке ДНК-полимераза III присоединяет дезоксирибонуклеотиды и образуются фрагменты Оказаки. РНК-праймеры удаляются за счет активно-

сти ДНК-полимеразы I, после чего фермент лигаза сшивает отдельные фрагменты Оказаки друг с другом и восстанавливает целостность новой цепи.

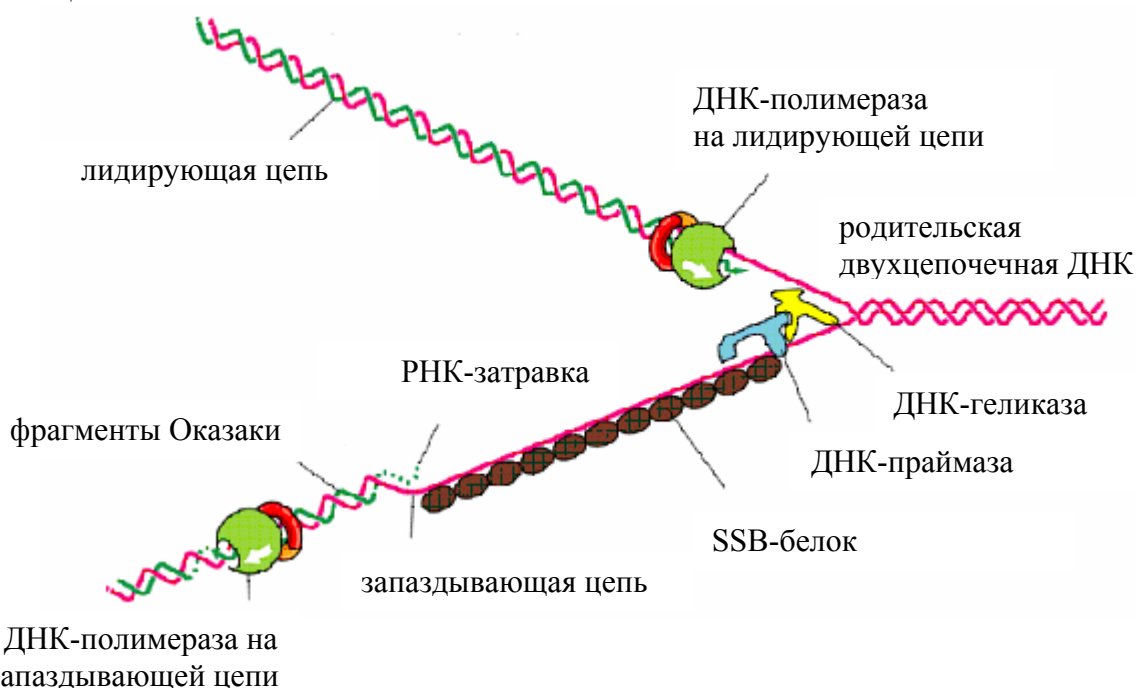


Рис. 25. Репликации ДНК у бактерий *E.coli* в соответствии с полуконсервативным механизмом

Репликация всего кольца ДНК может происходить как в одном, так и в двух противоположных направлениях двойной спирали. Такие механизмы репликации предполагают наличие одной или двух репликативных вилок на одной молекуле ДНК.

В качестве примера можно указать, что время удвоения хромосомы бактерий *E.coli* занимает приблизительно 40 минут. Однако в благоприятных условиях деление клеток происходит за 20 минут. Это значит, что новый цикл репликации дочерних хромосом начинается еще до того, как заканчивается предыдущий.

Процесс репликации тесно связан с ростом и делением бактериальной клетки. Обычно деление бактериальной клетки по времени осуществляется после завершения цикла репликации молекулы ДНК. Однако, в интенсивно растущих культурах репликация ДНК может опережать процесс деления клетки и нередко в клетке содержится ДНК в 4 – 8 раз больше чем масса одной хромосомы. Уже отмечалось, что между бактериальной ДНК и цитоплазматической мембраной существует физическая связь, так как бактериальную ДНК можно обнаружить в мембранных фракциях после центрифугирования лизата, а так же с помощью электронной микроскопии удалось визуализиро-

вать места прикрепления хромосомы к впячиваниям мембраны (мезосомам).

Связь бактериальной хромосомы или плазмиды с цитоплазматической мембраной, играет существенную роль в регуляции их репликации. Существуют две модели, объясняющие регуляцию репликации бактериальной ДНК. Согласно модели, предложенной Ф.Жакобом, С.Бреннером и Ф.Кьюзенем (1963), структура, способная самостоятельно реплицироваться, называется **репликоном**, что относится к хромосомам и плазмидам бактерий. Репликон должен иметь кольцевую форму и реплицироваться не по частям, а как единое целое. Согласно этой модели репликон должен быть прикреплен к цитоплазматической мембране и обязательно обладать двумя специфическими детерминантами или генами – структурным геном и геном-репликатором (или оператором репликации). При росте клетки от мембраны поступает сигнал на структурный ген и активирует его. Происходит синтез специфического белка-инициатора, который действует на ген-репликатор, что приводит к началу процесса репликации, который продолжается вдоль всего репликона и заканчивается копированием всей его структуры. После репликации ДНК поступает обратный сигнал на мембрану, инициируя деление клетки. Данная модель получила название **модели позитивной регуляции репликации**.

Кроме этой модели существует **модель негативной регуляции репликации** (Р.Притчард, П.Барт, Дж.Коллинз, 1969). В соответствии с этой моделью в составе репликона есть ген, отвечающий за синтез белка-репрессора, который при высокой концентрации негативно действует на инициацию репликации, в малой концентрации не влияет на этот процесс. По мере роста клетки, концентрация репрессора снижается и создается возможность репликации хромосомы или плазмиды.

Глава 3. ВИРУСЫ: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Вирусы – мельчайшие объекты жизни, имеющие неклеточное строение и не способные к проявлению каких-либо признаков живого вне живых клеток. Первым открытым вирусом был вирус мозаичной болезни табака, обнаруженный русским ученым Д.И.Ивановским в 1892 году.

Каждый вирус в своем онтогенезе проходит 2 стадии:

- внеклеточную, когда вирус находится в состоянии покоя, и получившую название **вирион**. В таком состоянии он находится в условиях окружающей среды;

- внутриклеточную, в течение которой происходит весь цикл репродукции в клетках хозяина.

Каждый вирион представлен двумя основными компонентами – нуклеиновой кислотой и белком, что позволяет называть вирусы неклеточными формами жизни. Отличия вирусов от клеточных организмов представлены в табл.4.

Таблица 4

Отличие вирусов от клеточных организмов

| Свойства | Вирусы | Прокариоты | Эукариоты |
|----------------------------|-------------|-------------------------------|-----------|
| Клеточная организация | - | + | + |
| Тип нуклеиновой кислоты | ДНК или РНК | ДНК + РНК | ДНК + РНК |
| Автономный метаболизм | - | + (кроме некоторых риккетсий) | + |
| Рост на питательных средах | - | + (кроме риккетсий) | + |
| Бинарное деление | - | + | + |

3.1. Строение и химический состав вирусных частиц

Уже было отмечено, что вирусная частица состоит из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белка. Белковая оболочка, которая окружает нуклеиновую кислоту, называется **капсидом**. Капсид каждого вируса состоит из отдельных субъединиц – капсомеров. Капсиды некоторых вирионов окружены дополнительной мембраной. Если вирус имеет мембрану, то говорят, что он «в оболочке» или окружен суперкапсидом, при отсутствии мембраны вирус называют «раздетым» или «голым».

Капсид чаще всего имеет симметричное строение. Различают два типа симметрии – **спиральную** и **кубическую**. При спиральной симметрии капсида вирусная нуклеиновая кислота образует спиральную (или винтообразную) фигуру, полуу внутри, и субъединицы белка (капсомеры) укладываются вокруг нее тоже по спирали (трубчатый капсид) (рис. 26). Примером вируса со спиральной симметрией капсида является вирус табачной мозаики, который имеет палочковидную форму, а его длина составляет 300 нм с диаметром 15 нм. В состав вирусной частицы входит одна молекула РНК размером около 6000 нуклеотидов. Капсид состоит из 2000 идентичных субъединиц белка, уложенных по спирали.

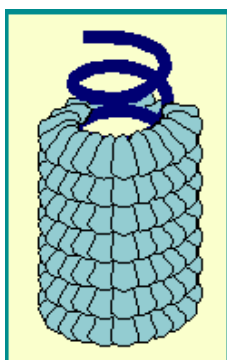


Рис. 26. Строение вируса со спиральной симметрией

При кубической симметрии вирусная нуклеиновая кислота уложена плотно (свернута в клубок), а белковые молекулы окружают ее, образуя многогранник (икосаэдр). Икосаэдр – многогранник с двадцатью треугольными гранями, имеющий кубическую симметрию и приблизительно сферическую форму (рис. 27). К икосаэдрическим вирусам относятся вирус простого герпеса, реовирусы и др.

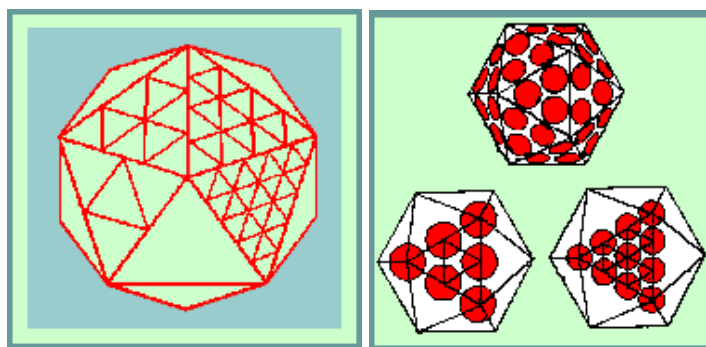


Рис. 27. Строение вируса с кубической симметрией

В зависимости от типа симметрии вирусы подразделяют на: вирусы со спиральным типом симметрии, вирусы с кубическим типом

симметрии и сложные вирусы, имеющие оба типа симметрии и состоящие из икосаэдрической головки и хвоста. Примером сложных вирусов являются колифаги T2, T4 (т.е. бактериофаги, инфицирующие клетки бактерий *E.coli*) и др. У некоторых сложных вирусов икосаэдрический капсид включает в себе трубчатый нуклеокапсид.

В зависимости от того, какой тип нуклеиновой кислоты содержится в вирусной частице, их подразделяют на 2 группы:

- ДНК-содержащие, имеющие в качестве генетического материала либо одно-, либо двухцепочечную ДНК, которая может быть как линейной, так и кольцевой. Примером ДНК-содержащих вирусов являются колифаги T2, T4, λ ; вирус простого герпеса; вирус оспы и др.

- РНК-содержащие вирусы, генетическая информация которых закодирована в РНК. РНК также может быть как одно-, так и двухцепочечной. Вирусы с одноцепочечной РНК можно разделить, в свою очередь, на 2 типа: с «плюс»-цепью РНК и с «минус»-цепью РНК. У вирусов первого типа цепь РНК может функционировать в клетке-хозяине непосредственно как информационная РНК, тогда как у вирусов второго типа на «минус»-цепи должна сначала с помощью клеточных РНК-полимераз синтезироваться «плюс»-цепь РНК, которая и служит информационной РНК. Примером РНК-содержащих вирусов являются реовирусы, вирус гриппа, ретровирусы и др.

В зависимости от организма хозяина выделяют вирусы, поражающие животных и человека, растения и микроорганизмы.

Вирусы растений иначе называются фитопатогенными вирусами. Эти вирусы попадают внутрь растительных клеток через повреждения или с помощью переносчиков насекомых или нематод. Фитопатогенные вирусы вызывают у растений множество болезней. Особенно большой вред приносят вирусы, поражающие картофель.

У человека вирусы вызывают множество заболеваний, включая оспу, грипп, корь, свинку, инфекционный гепатит, желтую лихорадку, полиомиелит, герпес, бешенство, СПИД, раковые заболевания и др. Многие вирусные заболевания у человека и животных можно предупредить путем иммунизации. Вирусные заболевания поддаются лечению с трудом, так как вирусы не чувствительны к большинству антибиотиков. Вирусы животных и человека передаются при контакте, либо с помощью насекомых-переносчиков, а также через объекты окружающей среды.

Вирусы бактерий называются бактериофагами. Вероятно в природе не существуют бактерии, которые не поразились бы одним из типов

бактериофагов. Бактериофаги могут наносить вред производству, основанному на жизнедеятельности бактерий.

3.2. Строение бактериофагов. Взаимодействие бактериофагов с чувствительными клетками бактерий

Строение бактериофагов можно рассмотреть на примере колифага Т4, электронная микрофотография которого была получена одной из первых. Этот бактериофаг, как и все Т-четные колифаги относится к сложным вирусам, т.е. он состоит из икосаэдрической **головки** диаметром 650 Å и длиной 950 Å, и **отростка** или **хвоста** (рис. 28). Капсид головки состоит из капсомеров, внутри него находится плотно упакованная двухцепочечная линейная ДНК и фермент транскриптаза в неактивном состоянии. Отросток фага имеет сложное строение. Он состоит из полого **стержня**, покрытого чехлом, который заканчивается **базальной пластинкой** с шипами и нитями. Все структуры отростка состоят из белков. В области базальной пластинки находится фермент бактериофаговый лизоцим, который способен разрушать пептидогликан муреин клеточной стенки бактерий. Здесь же имеется АТФ-аза, которая регенерирует энергию для сокращения чехла отростка бактериофага.

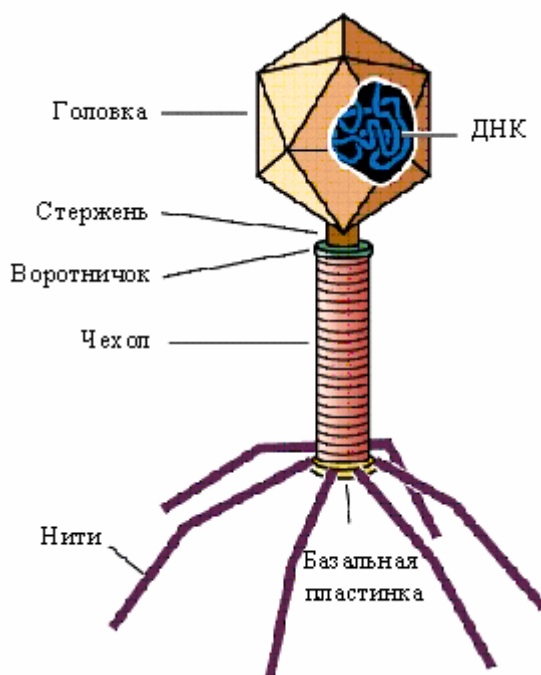


Рис. 28. Строение бактериофага Т4

Другие из изученных бактериофагов имеют более простое строение. В зависимости от формы зрелых фаговых частиц различают следующие морфологические типы бактериофагов:

- состоящие из икосаэдрической головки и спирального хвоста с сократимым чехлом (Т-четные колифаги);
- состоящие из икосаэдрической головки и длинного гибкого несократимого отростка (колифаги Т1 и Т5);
- нитчатые бактериофаги (колифаг fd);
- состоящие из икосаэдрической головки с коротким несократимым отростком (колифаги Т3 и Т7, фаг Р22 бактерий *Salmonella typhimurium*);
- состоящие из икосаэдрической головки без отростка.

Большинство бактериофагов содержит двухцепочечную ДНК, но охарактеризованы и бактериофаги с одноцепочечной ДНК (колифаг М13) и с одноцепочечной РНК (колифаги fd, Q β , R17).

В зависимости от способа размножения в чувствительной клетке бактериофаги подразделяются на 2 группы: вирулентные и умеренные.

Вирулентные фаги всегда лизируют зараженные ими бактерии и имеют только один путь развития – **литический цикл**. Умеренные фаги могут вести себя по-разному: после проникновения в клетку нуклеиновая кислота фага либо вовлекается в литический цикл, либо вступает с клеткой-хозяином в своего рода симбиотические отношения, т.е. встраивается в хромосому бактериальной клетки (превращается в профаг) и передается всему потомству данной клетки. Бактерии, которые содержат профаг, называются **лизогенными**.

Рассмотрим **взаимодействие вирулентных фагов** с чувствительной клеткой хозяином на примере колифага Т4.

При смешивании взвеси фаговых частиц с суспензией бактерий фаговые частицы в результате случайных столкновений с клетками бактерий прикрепляются к последним (адсорбируются). Адсорбция происходит на рецепторах, имеющих в наружной мембране бактерий *E.coli*. За адсорбцией следует стадия инъекции или введения ДНК в клетку. Бактериофаговый лизоцим разрушает клеточную стенку бактерий и с помощью энергии, регенерируемой АТФ-азой, происходит сокращение чехла бактериофага. При этом прокалывается цитоплазматическая мембрана, полый стержень входит в бактериальную клетку и ДНК фага впрыскивается в нее.

Инъекционная ДНК вызывает полную перестройку метаболизма бактериальной клетки: прекращается синтез бактериальной ДНК, бактериальных РНК и белков. ДНК бактериофага начинает транскрибироваться с помощью собственного фермента транскриптазы, который после попадания в бактериальную клетку активируется. Синтезируются сначала ранние информационные РНК, а затем поздние. Информационные РНК поступают на рибосомы клетки-хозяина, где синтезируются ранние (ДНК-полимеразы, нуклеазы) и поздние (белки капсида и хвостового отростка, ферменты лизоцим, АТФ-аза и транскриптаза) белки бактериофага. Репликация ДНК бактериофага происходит по полуконсервативному механизму и осуществляется с участием собственных ДНК-полимераз.

После того, как произошел синтез поздних белков и завершилась репликация ДНК, наступает заключительный процесс – созревание фаговых частиц или соединение фаговой ДНК с белком оболочки и образование зрелых инфекционных фаговых частиц. Созревание Т-четных фагов – сложный многоступенчатый процесс. Сначала образуются капсиды, наполненные внутри белками. После растворения этих внутренних белков готовые головки заполняются ДНК в определенном количестве, зависящем от типа фага, и закрываются. На завершающей стадии происходит присоединение компонентов отростка и образуются зрелые фаговые частицы, которые после лизиса клетки-хозяина под действием лизоцима бактериофага высвобождаются. Оказавшись во внешней среде, они могут адсорбироваться на чувствительных клетках и повторять весь процесс инфекции. Литический цикл фага Т4 длится обычно 25 мин.

Развитие умеренных фагов (лизогения) подробно охарактеризовано для колифага λ . Это сложный фаг, содержащий линейную двухцепочечную ДНК. На 5'-конце каждой ее цепи имеется одноцепочечная последовательность из 12 нуклеотидов – липкие концы (*cos*-сайты). Сразу же после проникновения фаговой ДНК в бактериальную клетку, липкие концы ДНК ковалентно соединяются ДНК-лигазой клетки-хозяина и образуется кольцевая молекула.

Далее, как правило, эта кольцевая молекула бактериофаговой ДНК не приступает к транскрипции, а встраивается в бактериальную хромосому. Установлено, что гены фага λ кодируют синтез четырех регуляторных белков, один из которых репрессорный белок *cI* (кодируется геном *cI*) блокирует развитие событий литического цикла, а антирепрессорный белок *Cro* (кодируется геном *cro*), наоборот, запускает их.

После поступления ДНК фага λ в клетку, выбор между литическим и лизогенным путями развития зависит от относительной скорости накопления регуляторных белков: если преобладает антирепрессорная функция белка Cro, то развиваются события литического цикла, если успеваает проявиться функция репрессорного белка cI, литический цикл не осуществляется, так как белок cI связывается с ДНК фага λ в особых участках, препятствуя транскрипции фаговых генов.

Встраивание ДНК фага λ в бактериальную хромосому осуществляется согласно интегративной модели А.Кемпбелла. Этот процесс называется сайт-специфической рекомбинацией, так как встраивание ДНК фага λ осуществляется в одном и том же месте (сайте) между генами *gal* и *bio* и не зависит от *rec A*-системы бактериальной клетки.

За интеграцию ДНК фага λ ответственен фермент лямбда-интеграза. Этот фермент узнает две разные последовательности – одну в хромосомной ДНК (*att* λ), а другую в ДНК фага (*b*₂). Затем происходит разрыв обеих молекул ДНК и последующее их перекрестное воссоединение.

После этого ДНК фага λ реплицируется с клеточной ДНК как единая структура, и все дочерние клетки при делении получают копию фаговой ДНК в составе хромосомы. Подобные клетки называются лизогенными, а ДНК фага λ в них – **профагом**.

Состояние лизогении поддерживается благодаря постоянному образованию белка-репрессора cI, и довольно неустойчиво: в любой момент может произойти переключение на литический путь из-за проявления антирепрессорных функций белка Cro. Показано, что в популяции лизогенных бактерий в одной из $10^2 - 10^5$ клеток происходит спонтанная индукция профага и запускается литический цикл, а такие клетки подвергаются лизису. Эффективность данного процесса зависит как от состояния бактерии-хозяина, так и действия разнообразных физических и химических факторов. Индукторами перехода лизогения ↔ литический цикл являются ультрафиолетовое излучение, митомицин С, алкилирующие агенты, для некоторых фагов также и изменение температуры (рис. 29).

Явление индукции профага очень важно учитывать при составлении многокомпонентных заквасок для получения молочнокислых продуктов. Если среди штаммов, входящих в такие закваски окажутся лизогенные и нелизогенные, но чувствительные к фагу, обусловившему лизогению бактерий, то произойдет явление **фаголизиса** (т.е. гибели клеток), очень опасное для молочной промышленности.

Следует отметить, что фаголизис может быть обусловлен и вирулентными фагами, попадающими в технологические потоки при плохой организации производства. Явление фаголизиса так же может наблюдаться и в процессе микробного синтеза аминокислот, что значительно снижает рентабельность этих отраслей биотехнологии.

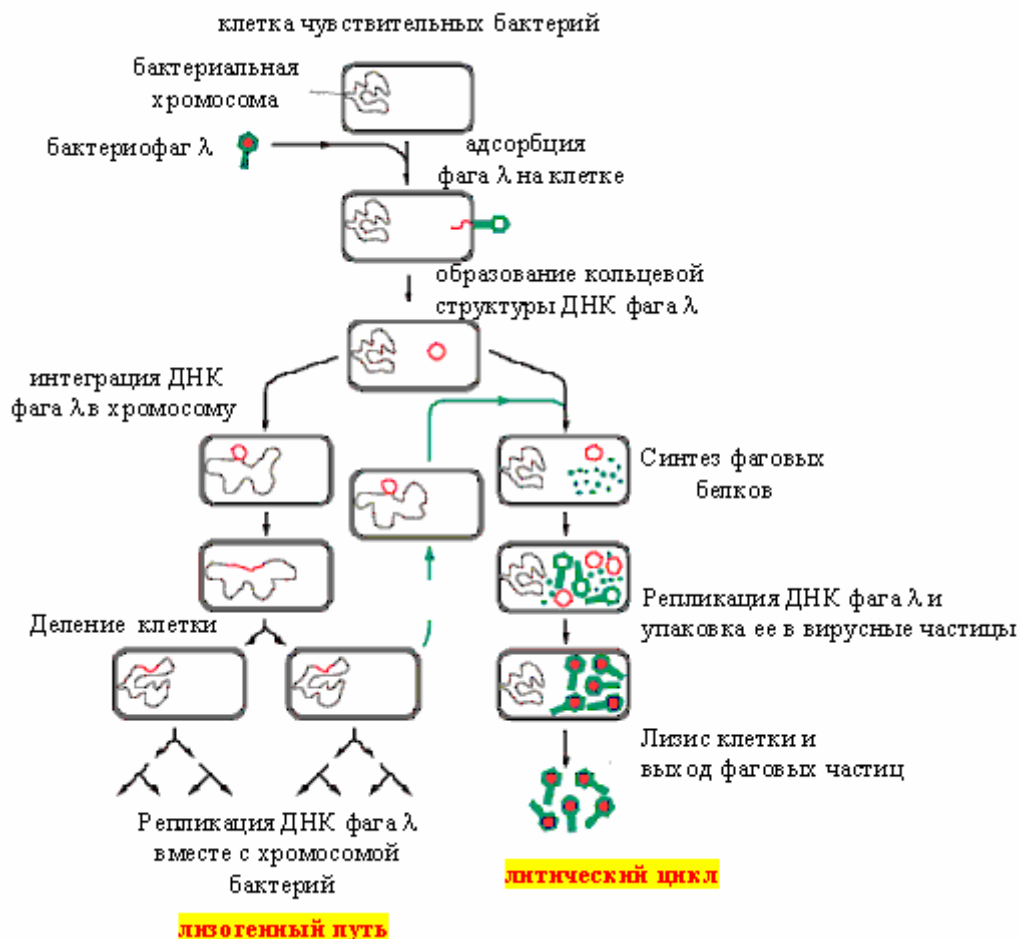


Рис. 29. Взаимодействия бактериофага λ с чувствительной клеткой

Таким образом, умеренные бактериофаги могут находиться в трех состояниях:

- в свободном состоянии в виде частиц – вирионов;
- в состоянии профага;
- в вегетативном (активном) состоянии, когда бактериофаг способен вызывать лизис бактериальной клетки (табл. 5).

Таблица 5

Отличительные свойства состояний умеренных бактериофагов

| Свойства | Вирион | Профаг | Вегетативный фаг |
|---|--------|-----------------------------------|------------------|
| Наличие специфической нуклеиновой кислоты | + | + | + |
| Репликация нуклеиновой кислоты | - | вместе с бактериальной хромосомой | + |
| Синтез фаговых белков | - | - | + |
| Способность к заражению | + | - | - |
| Способность вызывать лизис клетки | - | - | + |

Кроме того, что профаг является потенциально летальным для лизогенной бактерии фактором, делает ее иммунной к заражению гомологичным фагом, он может сообщать клетке-хозяину и другие признаки. Преобретение новых признаков, обусловленных профагом, называется **фаговой** или **лизогенной конверсией**. Лизогенная конверсия может затрагивать такие важнейшие свойства бактерий как морфология их колоний, биохимические признаки, способность синтезировать токсины или антибиотики, устойчивость к лекарственным препаратам и др. Это явление хорошо изучено у некоторых болезнетворных бактерий. Например, показано, что способность дифтерийной палочки (*Corynebacterium diphtheriae*) синтезировать сильнейший дифтерийный токсин детерминируется геном *tox*⁺, а активность этого гена в свою очередь зависит от присутствия в бактериальной клетке в состоянии профага специфического фага β. Известно, что бактерии *Clostridium botulinum* – возбудители ботулизма, синтезируют смертельный токсин только при лизогенизации их специфическими бактериофагами.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

Факторы внешней среды, влияющие на жизнеспособность микроорганизмов, подразделяют на химические и физические, и они могут действовать на микроорганизмы по-разному. С одной стороны, они могут оказывать стимулирующее действие, например, в случаях использования определенных химических веществ, необходимых микроорганизмам для поддержания их жизнедеятельности; поддержания оптимальной температуры, обеспечивающей наиболее высокую скорость роста клеток.

С другой стороны, действие химических и физических факторов может вызывать торможение метаболизма, либо приводить клетки микроорганизмов к гибели. В зависимости от этого все физические и химические факторы подразделяют на **микробостатические** и **микробоцидные**. Факторы внешней среды, полностью или частично угнетающие рост и задерживающие развитие микроорганизмов, относят к микробостатическим. Микробоцидные факторы вызывают гибель микроорганизмов. В зависимости от концентрации или дозы действующего агента, продолжительности контакта и вида микроорганизма один и тот же фактор может оказывать как микробостатическое, так и микробоцидное действие.

4.1. Действие факторов химической природы

Как уже отмечалось, одно и то же химическое вещество может проявлять избирательную активность в отношении микроорганизмов, действуя только на конкретные структуры или процессы микробной клетки, и не действуя на клетки других организмов. Такие вещества удобно использовать в терапии для лечения заболеваний микробной этиологии.

Некоторые химические вещества действуют опосредованно, т.е. приводят к микробостатическому эффекту, не поражая саму клетку микроорганизмов. Например, при повышении концентрации сахарозы в среде из клеток микроорганизмов выходит вода, что задерживает их рост, т.е. приводит к микробостатическому эффекту. На этом основано приготовление варенья, джемов и т.п. При их разведении микроорганизмы восстанавливают свои функции, и в благоприятных условиях вновь могут расти и развиваться.

Химические соединения по механизму действия на клетки микроорганизмов могут быть разделены на:

- повреждающие клеточную стенку или цитоплазматическую мембрану;

- повреждающие ферменты, участвующие в обмене веществ, а также нарушающие синтез основных биополимеров клетки.

К первой группе веществ относятся химические вещества, повреждающие структуру клеточной стенки (лизозим и др.), нарушающие полупроницаемость цитоплазматической мембраны (фенолы, хлороформ, крезолы, нейтральные мыла, поверхностно-активные вещества или детергенты, эфиры, ионы водорода, спирты, толуолы). Действие фенола, хлороформа, крезола, эфира, толуола, спирта связано в первую очередь с растворением липидов цитоплазматической мембраны, что приводит к нарушению ее проницаемости и разрушению. Этанол, кроме того, в достаточно высокой концентрации (70%), вызывает коагуляцию белков и оказывает микробоцидное действие. Детергенты способны накапливаться в липопротеиновых мембранах (за счет того, что они как мембраны имеют полярную структуру) и вызывать нарушение их функций. Поскольку эти вещества обладают широким спектром антимикробного действия их обычно применяют для дезинфекции различных поверхностей и одежды.

Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на микроорганизмы двояко:

1) оказывает непосредственное действие на полупроницаемость цитоплазматической мембраны;

2) оказывает косвенное или опосредованное действие через:
а) влияние на ионное состояние и доступность многих ионов и метаболитов; б) стабильность макромолекул; в) равновесие зарядов на поверхности клетки.

Показано, что при низких значениях рН понижается растворимость углекислоты – источника углерода для автотрофных бактерий, а растворимость таких катионов, как Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} возрастает и достигает токсичных уровней. Кроме того, многие органические кислоты при низких значениях рН находятся в недиссоциированной форме и легко проникают в клетку, становясь токсичными для нее. Наоборот, при высоких значениях рН растворимость многих катионов, необходимых клетке (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}), резко понижается, они выпадают в осадок и становятся недоступными для клеток микроорганизмов.

Концентрация ионов водорода во внешней среде влияет и на равновесие электрических зарядов на поверхности клетки: при низких значениях рН увеличивается суммарный положительный заряд, при

высоких – суммарный отрицательный заряд. Кроме того, в кислой среде разрушаются ДНК и АТФ, а в щелочной – РНК и фосфолипиды.

В зависимости от отношения к кислотности среды бактерии могут быть разделены на несколько групп:

1) **нейтрофилы** – оптимальное значение рН для роста составляет 6–8, а рост возможен, как правило, в диапазоне от 4 до 9. К этой группе относится большинство известных микроорганизмов. Типичными нейтрофилами являются штаммы бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus faecalis*.

2) **ацидофилы** – оптимальная кислотность среды для роста 4 и ниже. Среди них различают **факультативные ацидофилы** (интервал рН 1–9, оптимум 2–4) и **облигатные ацидофилы** (интервал рН 1–5, оптимум 2–4). В природе такие экстремально кислые условия, встречаются в некоторых озерах, болотах, горячих источниках. Типичными представителями облигатных ацидофилов служат бактерии родов *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Acetobacter*.

3) **алкалофилы** – оптимальные условия для развития находятся в пределах значений рН 9,0 – 10,5, которые встречаются в щелочных почвах, в местах скопления экскрементов животных. Среди алкалофилов различают **факультативных алкалофилов** (интервал рН для роста 5–11, оптимум рН 9,0 – 10,5), к которым относятся нитратвосстанавливающие и сульфатвосстанавливающие бактерии, многие аммонификаторы. **Облигатные алкалофилы** растут при высоких значениях рН – 8,5–11,0 при оптимуме 9,0–10,5. К таким бактериям относятся *Bacillus pasteurii* и некоторые цианобактерии.

Однако следует отметить, что хотя микроорганизмы и могут осуществлять процессы жизнедеятельности в условиях различной кислотности или щелочности среды, реакция внутри их клеток поддерживается всегда близкой к нейтральной. Это достигается благодаря наличию в цитоплазме буферных систем и низкой полупроницаемости мембраны для ионов водорода.

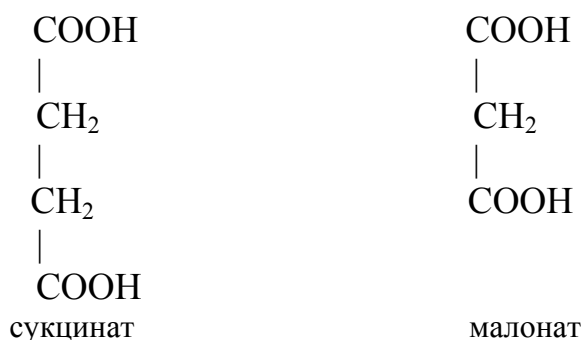
Способность к росту при низких или высоких значениях рН обеспечивает микроорганизму определенные преимущества, так как в этих условиях мала конкуренция со стороны большинства других организмов.

К группе химических веществ, оказывающих микробоцидное действие на микроорганизмы, повреждающих ферменты и вызывающих нарушение обмена веществ, относятся ионы тяжелых металлов, окись углерода, цианиды, некоторые активные окислители – марганцево-кислый калий, перекись водорода, хлорная известь, иод.

Ионы тяжелых металлов (Hg^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) могут взаимодействовать с гидроксильными, сульфгидрильными, карбоксильными группами, а также аминокруппами, вызывая изменения свойств белков и коферментов. В частности Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ связывают SH-группы и тем самым глубоко изменяют третичную и четвертичную структуры ферментных белков. Ими также блокируется сульфгидрильная группа кофермента А. В результате ингибирования ферментных систем нарушаются дыхание, синтез РНК и белков.

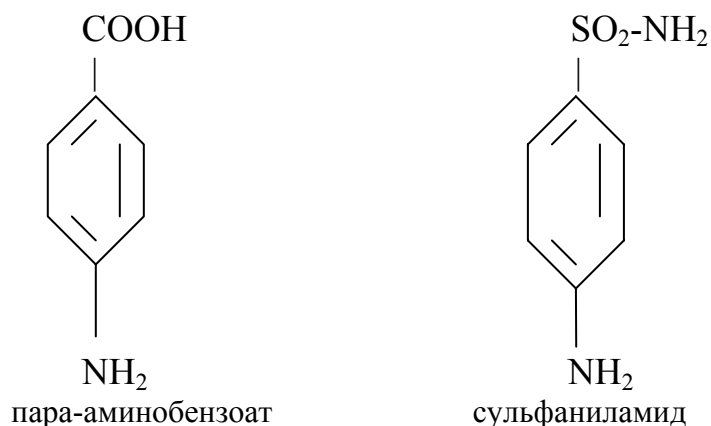
Цианиды действуют как дыхательные яды – связывая железо, они блокируют функцию терминального дыхательного фермента цитохромоксидазы. Окись углерода подавляет дыхание, конкурируя со свободным кислородом за цитохромоксидазу, т.е. действует путем «конкурентного торможения». Окислители – KMnO_4 , иод, H_2O_2 и др. вызывают резкое усиление окислительных процессов, приводящее к отмиранию клетки.

К группе химических веществ, нарушающих синтез клеточных компонентов, относятся структурные аналоги соответствующих соединений или антиметаболиты. Рассмотрим несколько примеров. Структурным аналогом сукцината является малонат:



В присутствии малоновой кислоты даже в низких концентрациях подавляется превращение сукцината в фумарат. При этом происходит конкурентное ингибирование нормального метаболита сукцината со своим структурным аналогом малонатом за каталитический центр сукцинатдегидрогеназы. В основе этого конкурентного ингибирования лежит структурное сходство ингибиторов с нормальными клеточными метаболитами.

Вторым примером конкурентного ингибирования является включение производных сульфаниловой кислоты (сульфаниламидов) в фолиевую кислоту (витамин В_с или фолацин) вместо парааминобензойной кислоты. Это основано на том, что они имеют структурное сходство:



Большинство бактерий способны синтезировать фолиевую кислоту из более простых компонентов. Если в состав питательной среды внести сульфаниламид, то он будет включаться в фолиевую кислоту, что приведет к синтезу неполноценного витамина и в конечном счете, к остановке роста клеток. В организме же животных и человека фолиевая кислота не образуется, они ее получают в готовом виде с пищей. В их клетках сульфаниламид не может включаться в этот витамин и не способен, таким образом, оказывать ингибирующее действие, что используется в терапии инфекционных заболеваний.

К микростатическим агентам, которые ограничивают рост нежелательной микрофлоры в продуктах питания, косметических средствах и др., относятся **консерванты**. Данные вещества не должны обладать токсичными, мутагенными или канцерогенными свойствами по отношению к организму человека. Наименее токсичными и чаще других применяемыми консервантами являются поваренная соль и сахар. Их добавление в продукты уменьшает концентрацию свободной воды и, тем самым, ограничивает развитие микрофлоры. Широко используются для этих целей также органические кислоты: лимонная, молочная, уксусная, пропионовая, бензойная, сорбиновая, а также их соли. Действие данных соединений основано на снижении pH продукта, что отрицательно сказывается на развитии нейтрофильных и алкалофильных организмов. Кроме того, многие органические кислоты оказываются токсичными для микроорганизмов.

Для консервирования фруктов, ягод, соков, вин используют сернистый ангидрид (SO_2), а также внесение жидких сульфитов. Долгое время для консервирования мясных и рыбных продуктов широко применяли нитриты и нитраты, которые эффективно ингибируют рост таких опасных возбудителей как *Clostridium botulinum*, вызывающих

порчу богатых белком продуктов. Однако выяснилось, что эти соли могут взаимодействовать с вторичными и третичными аминами, образуя нитрозамины – высоко канцерогенные соединения, поэтому применение нитритов и нитратов в пищевых продуктах сейчас ограничено.

4.2. Действие факторов физической природы

Все физико-химические процессы, обеспечивающие функциональную активность клетки, а также состояние ее макромолекул, в большей или меньшей степени зависят от температуры. При высокой температуре белки, нуклеиновые кислоты и другие компоненты клетки могут необратимо инактивироваться, что приводит к ее гибели. При слишком низкой температуре также нарушаются процессы биосинтеза, что ограничивает развитие микроорганизмов.

По отношению к температуре бактерии делят на три основные группы: мезофилы, психрофилы и термофилы, которые в свою очередь подразделяют на отдельные подгруппы.

Большинство известных видов прокариот относится к **мезофилам**, для них оптимальные температуры роста лежат в пределах от 20 до 42 °С. Типичным представителем мезофилов является *Escherichia coli*, оптимальная температура роста которой 37 °С.

Микроорганизмы, способные нормально расти при низких (0–20 °С) температурах, называют **психрофильными**. Психрофильные бактерии делятся на **облигатные** и **факультативные**. Основное различие между ними заключается в том, что облигатные психрофилы не способны к росту при температуре выше 20 °С, а верхняя температурная граница роста факультативных психрофилов намного выше. Облигатные психрофилы – узкоспециализированные микроорганизмы, обитающие в постоянно холодной среде; их температурный оптимум ниже 15 °С, максимум – около 20 °С; при 30 °С они отмирают. Облигатные психрофилы обитают в холодных почвах, холодных морях Арктики и Антарктики, на вечных снегах высокогорных районов, их находят в пробах из горных ледников, в воде колодцев и родников. Эти бактерии играют существенную роль в круговороте веществ в регионах с постоянно низкими температурами. В качестве представителей облигатных психрофилов можно привести бактерии *Bacillus psychrophilus*, морские светящиеся бактерии, железобактерии (например, рода *Galionella*) и др.

Факультативные психрофилы распространены значительно шире и встречаются в почвах и водах не только холодной, но и умеренной зо-

ны. Многие из них вызывают порчу пищевых продуктов при низких температурах. Оптимум для роста факультативных психрофилов соответствует 25–30 °С, т.е. они способны расти в условиях, благоприятных для мезофильных организмов. К этой группе относятся некоторые виды бактерий родов *Pseudomonas*, *Arthrobacter* и др.

Способность психрофилов развиваться при низкой температуре связывают с особенностями строения их клеток:

- температурный оптимум активности ферментов у них ниже, чем у аналогичных ферментов мезофильных микроорганизмов. При отклонении температуры от оптимальной активность большинства ферментов психрофилов значительно быстрее падает при повышении температуры, чем при ее понижении. Тем не менее некоторые ферменты психрофилов при повышении температуры усиливают свою активность. Это ферменты, вызывающие деградацию или разрушение клеточных макромолекул. Это может быть одной из причин термочувствительности облигатных психрофилов;

- проницаемость их мембран остается высокой при охлаждении благодаря содержанию в липидах ненасыщенных жирных кислот, вследствие чего мембраны не застывают и остаются полужидкими;

- белоксинтезирующий аппарат психрофилов способен функционировать при низких температурах.

К **термофильным** относят микроорганизмы, которые растут при температуре выше 45–50 °С. Группу термофилов делят на 4 подгруппы:

- 1) **термотолерантные** – растут в пределах от 10 до 55–60 °С, оптимальная область лежит при 35–40 °С (как у мезофилов). Основное их отличие от мезофилов – способность расти при повышенных температурах. Примером термотолерантных бактерий являются бактерии вида *Methylococcus capsulatus*.

- 2) **факультативные термофилы** имеют температурный максимум 50–65 °С и минимум менее 20 °С, оптимум приходится на область температур близких к верхней границе роста. Примером факультативных термофилов являются гомоферментативные молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*. Они обитают на поверхности многих растений, откуда они попадают в различные продукты – их легко обнаружить в молочных продуктах, соленьях, маринадах, вине, фруктовых соках. Лактобациллы постоянно присутствуют в ротовой полости, кишечном тракте многих теплокровных животных и человека;

- 3) **облигатные термофилы** способны расти при температурах до 70 °С и не растут при температуре ниже 40 °С. Оптимальная темпера-

турная область облигатных термофилов примыкает к их верхней температурной границе роста (65–70 °С). Представители облигатных термофилов – бактерии вида *Bacillus stearothermophilus* и др.;

4) **экстремальные термофилы** имеют следующие температурные параметры: оптимум в области 70–75 °С, минимальная граница роста – 40 °С и выше, максимальная – около 90 °С. Эти микроорганизмы распространены в горячих источниках, особенно в районах активной вулканической деятельности. Представители – бактерии родов *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermoplasma* и др.

Природу термоустойчивости у бактерий объясняют рядом структурных и биохимических особенностей этих бактерий:

- липиды, входящие в состав клеточных мембран, содержат насыщенные жирные кислоты. В связи с этим они имеют более высокую точку плавления по сравнению с липидами, содержащими ненасыщенные жирные кислоты;

- у экстремально термофильных бактерий обнаружено повышенное содержание гуанина и цитозина в ДНК, что придает стабильность и повышает точку плавления этих молекул;

- ферменты термофилов гораздо устойчивее к нагреванию в сравнении с соответствующими белками мезофильных бактерий. Часто такая высокая термостабильность достигается в результате изменения первичной структуры белковой молекулы. В качестве примера можно привести следующий – при сравнении лактатдегидрогеназ мезофильных и термофильных бактерий рода *Bacillus* обнаружено увеличенное содержание основных аминокислот аргинина и лизина в активном центре лактатдегидрогеназ у термофилов. Устойчивость ферментов термофилов обеспечивается также ионами Ca^{2+} , кофакторами и другими агентами, которые связываются с ними.

Термофильные бактерии имеют большое практическое значение. Обладая очень интенсивным метаболизмом, они являются активными продуцентами витаминов, ферментов, органических кислот, кормового белка и других ценных веществ. Это широко используется в микробиологической промышленности, так как применение мезофильных микроорганизмов в ней ограничено из-за того, что в результате культивирования часть энергии выделяется в тепло и происходит разогрев субстрата (питательной среды), что приводит к гибели мезофильных микроорганизмов.

Термофильные бактерии играют также большую роль в биологической очистке бытовых отходов и образовании метана.

Микроорганизмы подвержены воздействию различных видов **электромагнитных излучений**. Эффект воздействия зависит от дозы облучения и длины волны. Наиболее длинноволновая радиация (радиоволны – длина волны более 1100 нм) не вызывает биологического эффекта. Инфракрасные лучи (700–1100 нм и более) проявляют тепловое действие на микроорганизмы и используются зелеными и пурпурными бактериями в процессе фотосинтеза. Видимая часть спектра (300–700 нм) используются цианобактериями и другими фототрофными бактериями в процессе фотосинтеза. УФ-лучи (10–300 нм) могут оказывать на микроорганизмы как микробоцидное, так и мутагенное действие, что определяется видом микроорганизмов и дозой облучения. Наибольший летальный эффект УФ-лучей наблюдается при длине волны 260 нм, при которой отмечается максимум поглощения УФ-лучей молекулами ДНК. Летальное действие УФ-лучей объясняется в первую очередь изменениями структуры ДНК: разрывом водородных связей, расщеплением связей между дезоксирибозой и фосфатом, а также образованием сшивок между тиминовыми азотистыми основаниями (димеров тимина), которые обуславливают нарушение процессов репликации и транскрипции.

Облучение УФ-лучами не всегда приводит клетку бактерий к гибели. Многие микроорганизмы обладают механизмами, призванными исправлять (репарировать) повреждения ДНК, вызванные УФ-облучением. Гибель клеток от облучения УФ-светом наступает тогда, когда повреждение происходит быстрее, чем репарация ДНК. Кроме нуклеиновых кислот, УФ-лучи поглощают белки и другие макромолекулы, что приводит к нарушению их структуры и функций.

К воздействию УФ-излучения более устойчивы те виды бактерий, в клетках которых содержатся каротиноиды. У гетеротрофных организмов каротиноиды служат защитной системой, снижающей повреждения нуклеиновых кислот, а у фототрофных бактерий они предохраняют бактериохлорофилл от фотоокисления.

Ионизирующая радиация, под которой обычно подразумевают рентгеновское и гамма-излучение (с длиной волны менее 10 нм), вызывает летальный для клетки эффект. Она, в отличие от УФ-лучей, действует на биополимеры не прямо, а опосредованно, вызывая образование свободных радикалов и органических перекисей, которые реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками, вызывая одно- и двунитевые разрывы цепей ДНК, изменения азотистых оснований, окисление сульфгидрильных групп белков в дисульфидные и т.д. Чувствительность микроорганизмов различных групп к ионизирующей

радиации проявляется в разной степени. Например, бактерии *Clostridium botulinum* (тип E) сохраняют жизнеспособность при дозе 1,5 Мрад, *Escherichia coli* – только 0,18 Мрад. Абсолютным «чемпионом» по устойчивости к ионизирующей радиации являются бактерии *Micrococcus radiodurans*, которые обитают в водах атомных реакторов, встречаются в залежах урановых руд. Эти бактерии устойчивы к дозе ионизирующего излучения в 2–3 Мрад, что объясняется наличием в их клетках мощных репарационных систем, призванных исправлять повреждения в ДНК. Ионизирующее излучение используется в качестве стерилизующего фактора, в том числе, для продления срока хранения некоторых продуктов (фруктов, овощей, морепродуктов).

Высокие значения **гидростатического давления** приводят к разрушению клеточных структур, происходит денатурация белков, прекращается деление и клетки приобретают нитевидную форму. Однако существуют бактерии, которые живут на глубине 7000 м и более, где давление достигает более 1000 атмосфер. Из осадков на дне океанов выделяют бактерии двух групп: **баротолерантные** и **пьезофильные (барофильные)**. Баротолерантные бактерии размножаются как при обычном, так и при давлении в несколько сот атмосфер. Барофильные (менее многочисленная группа) при давлении в сотни атмосфер дают больший урожай биомассы, чем при атмосферном давлении. Пьезофильные бактерии (например, бактерии вида *Vacillus submarinus*) – это обитатели глубоководных впадин морей и океанов.

Концентрация веществ, растворенных в окружающей среде, т.е. **осмотическое давление**, также оказывает большое влияние на жизнеспособность микроорганизмов: чем концентрированнее раствор, тем труднее клетке поглощать из него воду. В гипертонических растворах, т.е. таких, в которых осмотическое давление больше, чем в клетке, происходит обезвоживание клеток (плазмолиз) и полное прекращение роста. Это явление называется физиологической сухостью. Однако некоторые микроорганизмы способны нормально развиваться в достаточно концентрированных растворах. Такие микроорганизмы называют **осмофильными**. Осмофильные микроорганизмы, для которых требуется высокое содержание NaCl, получили название **галофильных**. К экстремальным галофилам относятся бактерии из родов *Halobacterium* и *Halococcus*, живущие в растворах NaCl при концентрациях, близких к насыщающим. У таких бактерий концентрация солей в цитоплазме равна концентрации внешнего раствора, однако в клетках преобладает не натрий, а калий. Белки галофильных бактерий отличаются по строению от таковых негалофильных: содержание кислот-

ных групп в них преобладает над основными. Эти кислотные группировки нейтрализуются катионами. Высокие концентрации солей необходимы галофилам для поддержания каталитической активности ферментов, стабилизации мембран и рибосом. Галофильные бактерии обнаружены в соленых озерах, в солончаковых почвах. Они обычно вызывают порчу соленой рыбы и мяса.

Высокочастотные (> 16 кГц) механические колебания упругой среды или **ультразвук** не воспринимаются нашими органами слуха. При воздействии на микроорганизмы ультразвук создает большую разницу в давлении на отдельные части клеток и повреждает их: разжижается и вспенивается цитоплазма, разрушаются поверхностные структуры, содержимое клетки смешивается с окружающей средой. Чувствительность микроорганизмов к ультразвуку, пропорциональная частоте колебаний и длительности воздействия, зависит также и от их индивидуальных особенностей и физиологического состояния. Чем крупнее клетки, тем более чувствительны они к воздействию ультразвука; палочки и извитые формы более чувствительны, чем кокки. При длительном воздействии наблюдается полная гибель микроорганизмов, что используется в целях стерилизации. Ультразвук применяют и для разрушения клеток с целью извлечения из них некоторых биологически активных веществ.

Кроме охарактеризованных физических факторов на развитие микроорганизмов оказывает воздействие изменение напряжения магнитных полей. Этот фактор в настоящее время рассматривается, как экологический, определяющий протекание многих биологических процессов. Особенно чувствительны к изменению напряжения магнитного поля магниточувствительные микроорганизмы, содержащиеся в клетках магнитосомы.

Небезразличны микроорганизмы также к действию земного притяжения, сотрясений, а также электрического тока.

4.3. Антимикробное действие антибиотиков

Антибиотики (антибиотические вещества) – низкомолекулярные продукты метаболизма микроорганизмов, растений и животных или их модификации, задерживающие рост или полностью подавляющие развитие других микроорганизмов. Большинство известных в настоящее время антибиотиков образуются именно клетками микроорганизмов.

Первый антибиотик был открыт шотландским бактериологом А.Флемингом в 1929 году. Флеминг А. выделил плесневый грибок, ко-

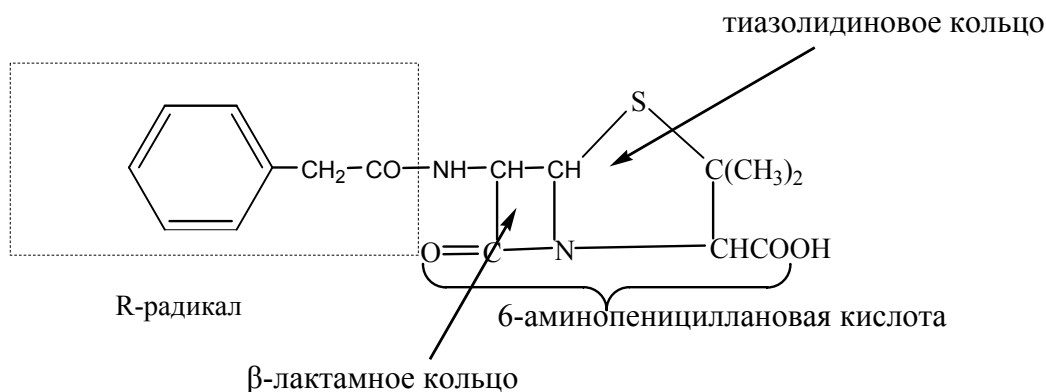
торый был определен как *Penicillium notatum*, и установил, что культуральная жидкость этой плесени способна оказывать антибактериальное действие по отношению к патогенным коккам. Культуральная жидкость гриба, содержащая антибактериальное вещество, названа А.Флемингом пенициллином. Хотя попытки А.Флеминга выделить активное начало, образуемое грибом *P.notatum* не увенчались успехом, но большой его заслугой является то, что он указал на перспективы практического применения обнаруженного им агента.

Спустя примерно десять лет после сообщения А.Флеминга пенициллин начал изучать Э.Чейн. Он был убежден, что это вещество – фермент. В 1940 году Х.Флори и Э.Чейн получили в кристаллическом виде пенициллин и установили, что это не фермент, а низкомолекулярное вещество пептидной природы.

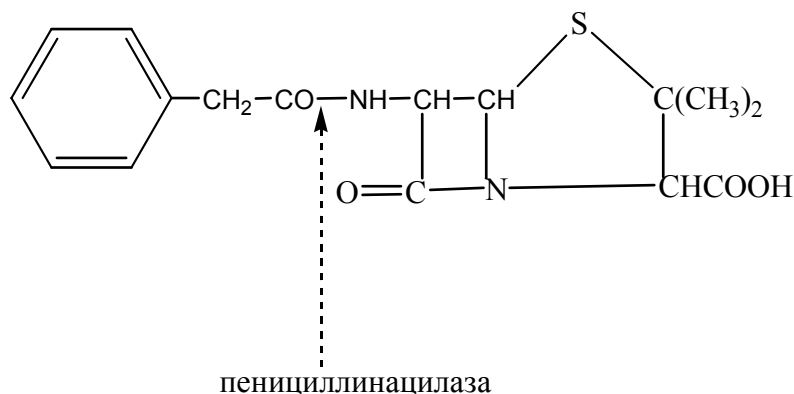
Изучение пенициллина в бывшем Советском Союзе было начато З.В.Ермольевой. В 1942 году под ее руководством в лаборатории биохимии микробов Всесоюзного института экспериментальной медицины в Москве был получен первый отечественный антибиотик, сходный с пенициллином, – крустоцин, сыгравший огромную роль в спасении жизней воинов в годы Великой Отечественной войны.

После того как было установлено, что пенициллин обладает активностью в отношении возбудителей септических инфекций, пневмонии, эпидемического менингита и других заболеваний, начались интенсивные поиски продуцентов этого антибиотика. В результате было установлено, что пенициллин могут синтезировать не только *Penicillium notatum*, но и многие другие виды грибов, например, *P.chrysogenum*, *P.nigricans*, *Aspergillus flavus*, *A.nidulans*.

Пенициллины, синтезируемые различными микроорганизмами, близки по химическому строению. Они относятся к группе β -лактамовых антибиотиков, общим для которых является наличие 4-х членного β -лактамового кольца, входящего в состав 6-аминопенициллановой кислоты. К 6-аминопенициллановой кислоте присоединен радикал. В зависимости от того, какой радикал присоединен к 6-аминопенициллановой кислоте, все антибиотики пенициллинового ряда разделяют на природные и полусинтетические. В качестве примера рассмотрим строение бензилпенициллина или пенициллина G:

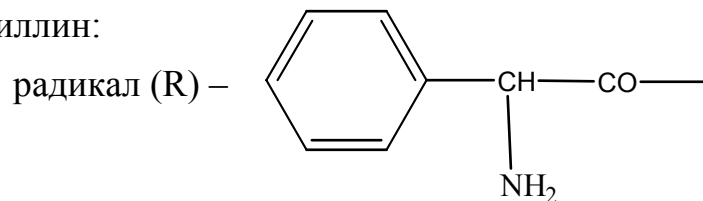


Исходным продуктом для получения полусинтетических пенициллинов является 6-аминопенициллановая кислота, которую чаще всего получают путем расщепления природных пенициллинов ферментом пенициллинацилазой, синтезируемым многими микроорганизмами:

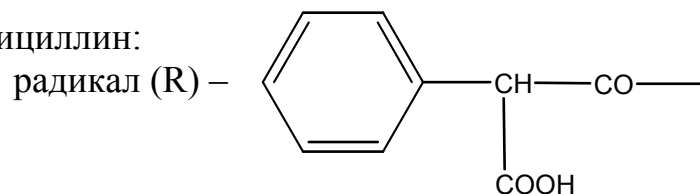


Затем к 6-аминопенициллановой кислоте химическим путем присоединяют различные радикалы. Примером полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда являются:

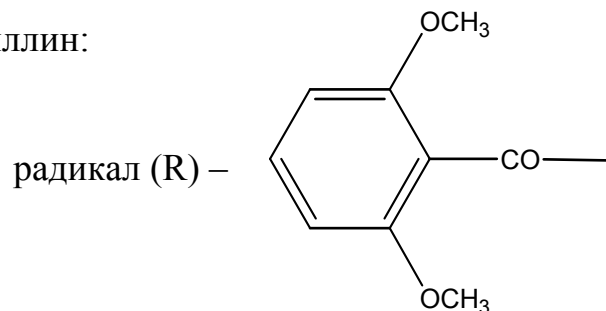
- ампициллин:



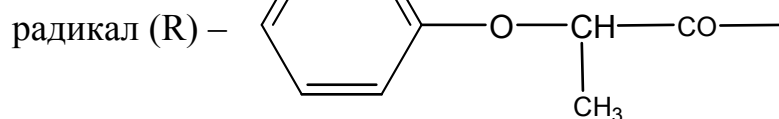
- карбенициллин:



- метициллин:



- фенициллин:



Полусинтетические антибиотики в отличие от природных хороши тем, что они не инактивируются β -лактамазами, которые в молекулах природных антибиотиков расщепляют β -лактамное кольцо. Поскольку этот фермент синтезируется многими микроорганизмами и они устойчивы к природным пенициллинам, то лечить заболевания, возбудителями которых являются такие микроорганизмы, ими нельзя. Прибегают в данном случае к полусинтетическим антибиотикам.

К настоящему времени выделено и описано более 3000 антибиотиков. Примерно 50% известных антибиотиков синтезируются штаммами, принадлежащими к актиномицетам, причем главным образом к одному из родов – роду *Streptomyces*. Большое число антибиотиков являются продуктами жизнедеятельности других бактерий, но среди этих антибиотиков лишь немногие нашли пока практическое применение. Почти все антибиотики бактериального происхождения по химической природе являются пептидными. Среди бактерий следует выделить спорообразующие бактерии *Bacillus subtilis*, которые способны образовывать около 70 различных полипептидных антибиотиков, *Bacillus polymyxa* – 20 антибиотиков, которые относятся к семейству полимиксиновых, *Bacillus brevis* – 23 антибиотика. Антибиотики продуцируются также многими видами плесневых грибов.

Способность к синтезу антибиотиков не является строго специфическим признаком. Один и тот же антибиотик может образовываться микроорганизмами, относящимися к разным видам, родам и даже порядкам. С другой стороны, штаммы, относящиеся к одному виду, могут синтезировать разные антибиотики. Однако, как правило, чем

дальше отстоят друг от друга организмы в таксономическом отношении, тем меньше вероятность, что они синтезируют один и тот же тип антибиотика.

Антибиотики в химическом отношении представляют очень гетерогенную группу соединений:

- молекулярная масса антибиотиков варьирует от 150 до 5000 дальтон, т.е. это низкомолекулярные вещества;

- молекулы одних антибиотиков состоят или только из атомов С и Н, но чаще из С, О, Н и N; другие антибиотики содержат также атомы серы, фосфора и галогенов;

- в молекулах антибиотиков представлены почти все функциональные группы, известные в органической химии (гидроксильная, карбоксильная, карбонильная, азотсодержащие функциональные группы и т.д.), а также алифатические и алициклические цепи, ароматические кольца и т.д.

Общим для всех антибиотиков является то, что они могут быть получены в кристаллическом виде.

Отличие антибиотиков от других продуктов метаболизма микроорганизмов, также подавляющих рост отдельных видов, как, например, спирты, органические кислоты, перекиси состоит в следующем:

- во-первых, антибиотики обладают высокой биологической активностью. Например, для подавления роста грамположительных бактерий (стрептококков, микрококков и др.) требуется концентрация антибиотика эритромицина, равная всего 0,01 – 0,25 мкг/мл. Конечно, при таких ничтожно малых концентрациях спирта или органической кислоты никакого ингибирующего бактерии эффекта быть не может;

- во-вторых, антибиотики обладают избирательностью биологического действия. Это означает, что не все микроорганизмы чувствительны к конкретному антибиотику. В этой связи микроорганизмы делят на две группы: чувствительные к определенным антибиотикам и резистентные, или устойчивые, к ним.

Антибиотики часто объединяют в группы в зависимости от того, рост каких микроорганизмов они подавляют. Выделяют следующие группы антибиотиков: противовирусные, антибактериальные, противогрибковые, антипротозойные, противоопухолевые.

Чувствительность различных бактерий к антибиотикам определяется в значительной мере структурой клеточной стенки, поскольку от этого зависит способность антибиотика проникать в бактериальную клетку. В соответствии с активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий антибактериальные антибиотики

можно разделить на две группы. Большинство антибиотиков действуют на грамположительные бактерии, через клеточную стенку которых эти соединения легче проникают, так как в ней нет дополнительного барьера наружной мембраны. Такие антибиотики относят к соединениям с узким спектром действия. Антибиотики, активные в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, называются антибиотиками широкого спектра действия.

Бактерицидный или бактериостатический эффект, вызываемый антибиотиками, как правило, связан с нарушением отдельных звеньев метаболизма или структур бактериальных клеток.

В зависимости от механизма действия антибиотики делят на несколько групп:

- ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, бацитрацин, ванкомицин, цефалоспорины и др.);
- нарушающие функционирование цитоплазматической мембраны (грамидины, валиномицин, полиены, трихомицин и др.);
- подавляющие синтез РНК (рифампицины, стрептоварицины и др.);
- подавляющие синтез ДНК (митомицин С, противоопухолевые, новобиоцин и др.);
- ингибирующие синтез белка (хлорамфеникол, стрептомицин, канамицин, эритромицин, линкомицин, пуромицин, фузидиевая кислота, тетрациклины и др.).

Рассмотрим механизм действия некоторых антибиотиков.

Пенициллин ингибирует синтез пептидогликана муреина, входящего в состав клеточной стенки. В частности он нарушает образование пептидных связей в процессе синтеза пептидогликана, инактивируя ключевой фермент транспептидазу, ответственный за этот процесс. Синтезируется несшитый пептидогликан, в результате чего образуется «ослабленная» клеточная стенка, неспособная выдержать увеличивающееся в результате роста клетки, давление, что приводит к разрушению и лизису клеток.

Митомицин С блокирует синтез ДНК за счет того, что его молекулы связываются с ДНК в области репликативной вилки, образуя поперечные сшивки между цепями и препятствуя их разделению. ДНК-полимераза не может продвигаться по ДНК и осуществлять репликацию.

Актиномицин Д связывается с ГЦ-богатыми участками в молекуле ДНК и препятствует перемещению ДНК-зависимой РНК-полимеразы вдоль ДНК-матрицы из-за невозможности локального распле-

тания цепей и, следовательно, подавляет синтез информационной РНК.

Рифампицин подавляет синтез всех видов РНК, связываясь с β -субъединицей РНК-полимеразы.

Фузидиевая кислота блокирует функционирование фактора элонгации G, что препятствует транслокации рибосом и, следовательно, нарушает синтез белка.

Аминогликозидные антибиотики (стрептомицин, неомицин, канамицин и т.п.), группа тетрациклинов связываются с 30S-субъединицей рибосом, что прекращает биосинтез белка.

Хлорамфеникол и эритромицин ингибируют реакцию транспептидации, связываясь с 50S-субъединицами рибосом.

Грамицидин А включается в структуру клеточной мембраны, образуя каналы, стенки которых имеют липофильную природу снаружи и гидрофильную внутри, что позволяет катионам выходить из клетки.

Практическое использование антибиотиков заключается в следующем:

- при лечении инфекционных заболеваний человека и животных. Однако они могут оказывать побочное действие: вызывать аллергии, дисбактериоз, анафилактический шок и даже смерть, поэтому принимать антибиотики следует с большой осторожностью;
- для защиты растений от болезней, вызываемых бактериями и грибами;
- для стимуляции роста сельскохозяйственных животных;
- для предотвращения порчи мяса, рыбы и других продуктов;
- в качестве инструментов для исследования специфических функций клетки (синтеза пептидогликана муреина, биосинтеза белка, транспорта ионов через мембрану и т.д.).

ГЛАВА 5. ПИТАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ЗАКОНОМЕРНОСТИ МИКРОБНОГО РОСТА

5.1. Питание микроорганизмов

Питание – включение в метаболические реакции любого характера тех или иных соединений среды.

Питательным веществом следует считать любое химическое вещество, которое призвано удовлетворять энергетические потребности, либо анаболические функции, либо тем и другим.

Потребности в питательных веществах у микроорганизмов весьма разнообразны. Но можно говорить о каких-то общих принципах питания.

Все химические элементы необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов подразделяют на макро- и микроэлементы. К макроэлементам относятся десять элементов, содержащихся во всех организмах: С, О, Н, N, S, P, К, Са, Mg, Fe. Микроэлементы: Mn, Мо, Zn, Cu, Со, Ni, Ва, В, Cr, Na, Se, Si, W и др., в которых нуждаются не все организмы. Из макро- и микроэлементов бактерии синтезируют все вещества необходимые для построения клетки: белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, витамины, липиды и т.д.

Некоторые виды микроорганизмов не способны сами синтезировать отдельные аминокислоты, азотистые основания, витамины, вследствие чего не могут расти при их отсутствии в питательной среде. Такие соединения являются для них факторами роста. Микроорганизмы, нуждающиеся в определенном факторе роста, называются **ауксотрофными**, в отличие от **прототрофных**, которые синтезируют все необходимые для них соединения. Примером природных ауксотрофных микроорганизмов являются молочнокислые бактерии, которые зависимы почти по всем аминокислотам и витаминам.

По способу поступления питательных веществ в клетку микроорганизмов различают 2 типа питания: **осмотрофное** и **фаготрофное**. Подавляющее большинство микроорганизмов питается по осмотрофному типу (поглощение растворенных в воде веществ). Фаготрофное питание у большинства микроорганизмов невозможно, так как их клетки имеют ригидные клеточные стенки и поэтому они не способны захватывать твердые частицы.

По источникам углерода все микроорганизмы разделяются на автотрофы и гетеротрофы.

Автотрофы (от греч. *autos* – сам, *trophe* – пища, питание) – это микроорганизмы, способные усваивать или фиксировать углекислоту воздуха в качестве единственного источника углерода и синтезировать из нее органические вещества своих клеток.

Гетеротрофы – организмы, нуждающиеся в готовых органических веществах.

Как автотрофы, так и гетеротрофы подразделяют на две группы в зависимости от того, какой источник энергии они используют, т.е. по отношению к источникам энергии как питательным веществам: **фототрофы** – используют энергию света и трансформируют ее в химическую, **хемотрофы** – энергию, освобождаемую при реакциях окисления-восстановления.

Все микроорганизмы подразделяют также на 2 группы в зависимости от того, какие питательные вещества органические или неорганические являются донорами электронов: **органотрофы** – организмы, использующие в качестве доноров электронов органические соединения, **литотрофы** – обладают способностью использовать неорганические вещества в качестве доноров электронов (H_2 , NH_3 , H_2S , CO , Fe^{2+} и т.д.).

По трем вышеуказанным критериям (источник энергии, источник углерода, донор электронов) все микроорганизмы могут быть разделены на 8 физиологических групп (табл. 6).

Клетки микроорганизмов не могут существовать также без кислорода. Его можно рассматривать в качестве питательного вещества. Основным источником кислорода является вода. Кроме того, он содержится в CO_2 и многих органических соединениях. Многим микроорганизмам помимо этого необходим молекулярный кислород. Главная функция O_2 состоит в том, что он служит конечным акцептором электронов при аэробном дыхании; O_2 при этом восстанавливается до воды. По отношению к молекулярному кислороду все бактерии можно разделить на несколько физиологических групп:

1) **облигатные аэробы** – бактерии, способные получать энергию только путем дыхания и поэтому нуждающиеся в O_2 . Среди них следует выделить микроаэрофилы – бактерии, которые нуждаются в O_2 для получения энергии, но растут только при низком его содержании в среде (2 – 5%), т.е. более низком, чем содержание кислорода в атмосфере (21 %).

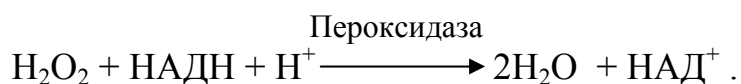
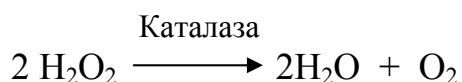
2) **факультативные анаэробы** – бактерии способные расти как в присутствии, так и в отсутствии O_2 . Они могут переключать свой

энергетический метаболизм с аэробного дыхания (в присутствии O_2) на брожение или анаэробное дыхание (в отсутствии O_2). Среди факультативных анаэробов следует выделить аэротолерантные бактерии, которые могут расти в присутствии атмосферного кислорода, но не способны его использовать в качестве акцепторов электронов – они получают энергию исключительно с помощью брожения.

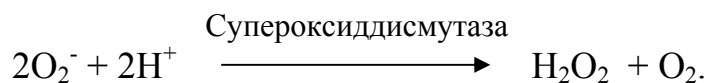
3) **облигатные анаэробы** – могут расти только в среде, лишенной молекулярного кислорода, поскольку он для них токсичен.

Установлено, что окисление флавопротеинов или других доноров электронов, а также радиация приводят к восстановлению O_2 , которое сопровождается образованием супероксид-радикалов и пероксид-анионов, которые легко связывают протоны и переходят в пероксид водорода (H_2O_2). В ходе последующих перестроек формируются также очень токсичные гидроксил-радикалы. Все эти формы являются сильными окислителями, способными окислять сульфгидрильные группы ферментов, приводя к их инактивации, а также вызывать повреждения в молекулах ДНК.

Многие клетки синтезируют ферменты каталазу и пероксидазу, защищающие их содержимое от токсичного действия радикалов кислорода:



Супероксиды разлагаются под действием супероксиддисмутазы:



Каталаза и супероксиддисмутаза обычно обнаруживаются в клетках аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, и обеспечивают им защиту от токсичного действия активных форм кислорода. Микроаэрофилы могут иметь либо не иметь каталазу (это видоспецифичный признак, используемый в систематике), но обычно содержат супероксиддисмутаза. В противоположность им, облигатные анаэробы обычно не синтезируют данные ферменты или образуют их в малых количествах. Поэтому они не способны к детоксикации радикалов кислорода и не способны развиваться в его присутствии.

Таблица 6

Типы питания бактерий

| Тип питания | Источник энергии | Донор электронов | Источник углерода | Представители |
|------------------------|--|-------------------------|-----------------------|---|
| Хемолитоавтотрофия | окислительно-восстановительные реакции | неорганические вещества | CO ₂ | нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии, железобактерии |
| Хемолитогетеротрофия | - // - - // - | - // - - // - | органические вещества | метанобразующие, сульфатредуцирующие бактерии |
| Хемоорганавтотрофия | - // - - // - | органические вещества | CO ₂ | факультативные метилотрофные бактерии |
| Хемоорганогетеротрофия | - // - - // - | - // - - // - | органические вещества | большинство бактерий (энтеробактерии, молочнокислые бактерии, маслянокислые бактерии и др.) |
| Фотолитоавтотрофия | солнечный свет | неорганические вещества | CO ₂ | некоторые виды пурпурных и зелёных бактерий, цианобактерий |
| Фотолитогетеротрофия | - // - - // - | - // - - // - | органические вещества | некоторые виды пурпурных и зелёных бактерий |
| Фотоорганавтотрофия | - // - - // - | органические вещества | CO ₂ | некоторые виды пурпурных бактерий |
| Фотоорганогетеротрофия | - // - - // - | - // - - // - | органические вещества | некоторые виды пурпурных и зелёных бактерий, цианобактерий, галобактерий |

Одним из основных элементов, из которых построены клетки микроорганизмов является азот. В расчете на сухие вещества его содержится около 10%. В природе азот встречается в форме окисленных и восстановленных соединений, а также в виде молекулярного азота атмосферы. Большинство прокариот потребляют азот в восстановленной форме в виде солей аммония (NH₄⁺) и аммиака (NH₃). Многие бактерии используют органические азотсодержащие вещества – белки, аминокислоты, мочевины, разрушая их с выделением аммиака. Окисленные формы азота – нитраты (NO₃⁻) и нитриты (NO₂⁻) – также усваиваются различными группами бактерий. Некоторые бактерии способны усваивать атмосферный азот. Это уникальное свойство характерно для азотфиксирующих микроорганизмов. К ним относятся сво-

бодноживущие (азотобактерии, некоторые цианобактерии, азоспириллы, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium pasteurianum*, бактерии родов *Azomonas* и *Beijerinckia* и др.) и симбиотические (клубеньковые бактерии, брадиризобии, актиномицеты рода *Frankia*, некоторые цианобактерии и др.). Фиксация молекулярного азота приводит к восстановлению его до аммиака. Азотфиксирующие бактерии обеспечивают важный этап в круговороте азота в природе.

5.2. Закономерности микробного роста

Под ростом понимают согласованное увеличение количества всех химических компонентов, формирующих клеточные структуры. Рост клеток обычно сопровождается увеличением их массы и размеров. Однако это не обязательно, так как клетки способны просто накапливать запасные или резервные вещества (т.е. масса может увеличиваться, но роста при этом не наблюдается). Однако в подходящей среде, к которой бактерии полностью адаптированы, они находятся в состоянии сбалансированного роста. В период сбалансированного роста удвоение биомассы сопровождается удвоением всех других учитываемых параметров популяции, например количества белка, ДНК, РНК и внутриклеточной воды. Иными словами, культуры растущие сбалансированно, сохраняют постоянный химический состав. И поэтому при сбалансированном росте легко определить скорость роста бактериальной популяции в каждый момент времени, если измерить прирост любого компонента клетки по отношению к исходному количеству этого компонента. Другими словами, в культуре, растущей сбалансированно, скорость прироста вещества клеток в любой данный момент пропорциональна числу или массе имеющихся в это время бактерий. Коэффициент пропорциональности (μ) называют **удельной скоростью роста**. Она различна для разных культур и даже для одной культуры удельная скорость роста может меняться в зависимости от условий выращивания клеток. Удельную скорость роста можно рассчитать из следующих формул:

$$\frac{d N}{d t} = \mu N \quad \text{и} \quad \frac{d X}{d t} = \mu X,$$

где N – число клеток в единице объема, X – масса клеток в единице объема, t – время, μ – удельная скорость роста. Интегрируя, получаем

$$\ln N - \ln N_0 = \mu (t - t_0),$$

а после перехода к десятичным логарифмам

$$\lg N - \lg N_0 = \frac{\mu}{2,303} (t - t_0)$$

и

$$\mu = \frac{2,303 (\lg N - \lg N_0)}{(t - t_0)} .$$

Зная удельную скорость роста, можно определить **время генерации** (g) (время, необходимое для удвоения числа клеток популяции):

$$g = \frac{1}{\mu} .$$

Если рост клеток в культуре ограничен количеством внесенного в питательную среду какого-то компонента, то между начальной концентрацией внесенного в среду этого компонента и полученной биомассой клеток существует постоянная линейная зависимость (при условии ограничения роста только одним параметром). Поэтому масса клеток, образованная на единицу использованного компонента среды, представляет собой величину, которую называют **экономическим коэффициентом** (или выходом биомассы) – Y . Эту величину определяют по уравнению:

$$Y = \frac{X - X_0}{S_0 - S} ,$$

где X – масса сухого вещества клеток в 1 мл культуры, вступившей в стационарную фазу роста; X_0 – масса сухого вещества клеток в 1 мл среды сразу после инокуляции среды; $(X - X_0)$ – урожай бактериальной культуры (урожай зависит от количества и природы используемых питательных веществ, а также от условий культивирования); $(S_0 - S)$ – количество потребленного субстрата (компонента среды).

Используют два основных способа культивирования микроорганизмов: периодическое (статическое) и непрерывное (проточное).

Рост бактерий в периодической культуре происходит до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых им компонентов питательной среды не достигнет минимума, после чего рост прекращается. Если на протяжении этого времени не добавлять питательных веществ и не удалять конечных продуктов метаболизма, то получим так называемую периодическую культуру (популяцию клеток в ограниченном жизненном пространстве).

Изменение численности популяции клеток при **периодическом культивировании** имеет определенную закономерность. Если по оси абсцисс отложить время, а по оси ординат – логарифм числа жизнеспособных клеток, то можно построить кривую роста бактерий. Типичная кривая роста имеет S-образную форму (рис. 31). Анализируя кривую можно различить несколько фаз роста, сменяющих друг друга в определенной последовательности:

- 1) начальную (или лаг-) фазу,
- 2) экспоненциальную или логарифмическую фазу,
- 3) стационарную фазу,
- 4) фазу отмирания.

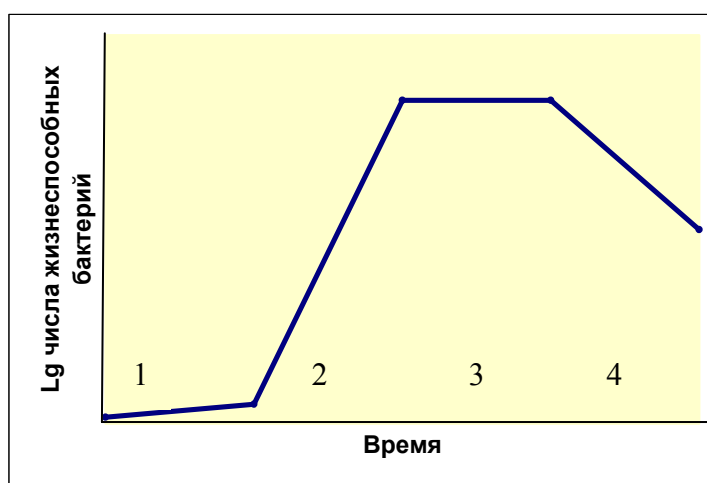


Рис. 31. Кривая роста бактериальной культуры:
1 – лаг-фаза; 2 – экспоненциальная фаза; 3 – стационарная фаза;
4 – фаза отмирания.

Лаг-фаза или фаза задержанного роста охватывает промежуток времени между инокуляцией бактерий и достижением максимальной скорости деления.

В клетках бактерий в эту фазу идут в основном процессы, связанные с приспособлением их к условиям культивирования (среда, температура, рН и др.). Продолжительность этой фазы зависит в основном от следующих факторов:

- предшествующих условий культивирования инокулята (посевного материала). Если источники энергии и углерода в новой среде отличаются от тех, какие были в предшествующей культуре, то приспособление 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.

- возраста посевного материала. Чем старше культура, которую используют для инокуляции новой питательной среды, тем больше продолжительность лаг-фазы. Однако при значительном количестве молодого материала культура может развиваться без лаг-фазы.

Если проанализировать количественный состав бактериальной клетки в течение лаг-фазы, то можно отметить, что во время нее происходит быстрое увеличение количества РНК (в 8–12 раз). Это подтверждает тот факт, что в эту фазу происходит синтез индуцибельных ферментов, нужных для использования новых субстратов среды.

Лаг-фаза переходит в начальную фазу размножения или фазу ускорения роста, когда клетки начинают делиться сначала медленно, затем все быстрее.

Фаза экспоненциального роста характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток или скоростью роста. Эта скорость зависит от вида бактерий. Например, бактерии *E.coli* при 37° С делятся примерно каждые 20 минут, а бактерии родов *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* – 5–10 часов.

Во время экспоненциальной фазы все клетки имеют приблизительно одинаковый размер, содержание белка в них тоже постоянно. Клетки содержат максимальное количество РНК. Во время экспоненциальной фазы клетки наиболее жизнеспособны и обладают высокой биохимической активностью.

Стационарная фаза наступает тогда, когда число живых клеток достигает максимума и перестает увеличиваться, так как скорость размножения бактерий равна скорости их отмирания. В связи с тем, что скорость роста зависит от концентрации субстрата, то 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 O₂ или накопления токсичных продуктов обмена. Все эти факторы вызывают переход к стационарной фазе. Переход из экспоненциальной фазы в стационарную включает период несбалансированного роста, когда разные компоненты синтезируются с различными скоростями. Поэтому, в стационарной фазе химический состав клеток отличается от их состава в экспоненциальной фазе. Химиче-

ский состав клеток зависит от фактора, ограничивающего рост, кроме того, клетки в стационарной фазе меньше по размеру, содержат меньше РНК, более устойчивы к физическим воздействиям и химическим агентам, чем в экспоненциальной фазе роста культур. В этот период в клетках и в среде не редко накапливаются продукты вторичного метаболизма (антибиотики, пигменты, бактериоцины и др.). Продолжительность этой фазы может быть от нескольких часов до недели в зависимости от вида микроорганизма.

В стационарную фазу роста поведение клеток в бактериальной популяции регулирует такое явление как **апоптоз**. Суть его сводится к тому, что при исчерпании питательного субстрата голодающая популяция разделяется на две субпопуляции, одна из которых гибнет и подвергается автолизу, а клетки другой субпопуляции, используя продукты автолиза как субстрат, продолжают размножаться. Механизм генетического контроля апоптоза у бактерий *E.coli* установлен. Он осуществляется особым опероном *maz* из двух генов: *maz E* и *maz F*. Продукт гена *maz F* – стабильный цитотоксический белок-киллер, а продукт гена *maz E* – нестабильный белок *Maz E*, разрушающий белок-киллер. Истощение фонда аминокислот в питательной среде приводит к блокированию оперона *maz*, в результате этого синтез белка *Maz E* прекращается, а белок-киллер вызывает гибель и автолиз части популяции. Фонд аминокислот в среде за счет этого пополняется, синтез белка *Maz E* у оставшихся живых клеток активизируется, и они продолжают размножаться.

В **фазе отмирания** происходит экспоненциальное снижение числа живых клеток. Скорость отмирания бактерий широко варьирует в зависимости от условий и особенностей организма. Например, энтеробактерии отмирают медленно в отличие от некоторых видов бактерий рода *Bacillus*, которые отмирают быстро. Причины отмирания клеток могут быть разными. Это и накопление органических кислот (как у бактерий родов *Escherichia*, *Lactobacillus*), автолиз (лизис над действием собственных ферментов), накопление антибиотиков, бактериоцинов и другие причины.

Непрерывное (проточное) культивирование заключается в том, что в сосуд, содержащий популяцию бактерий, периодически подается свежая питательная среда и одновременно удаляется из него избыток среды с клетками микроорганизмов. Это позволяет на длительное время задержать культуру в состоянии экспоненциального роста.

Проточное культивирование осуществляется в аппаратах двух типов: хемостатах и турбидостатах. Хемостат состоит из сосуда-культиватора, в который из другого резервуара с заданной постоянной скоростью поступает питательная среда. Для равномерного распределения питательных веществ содержимое культиватора механически перемешивается. Содержимое культиватора аэрируется стерильным воздухом для снабжения клеток кислородом. Излишняя микробная масса с питательной средой через сливной сифон вытекает из культиватора.

Турбидостат – это такой же хемостат, но снабженный фотоэлектрическим элементом, регистрирующим мутность среды. Когда плотность биомассы увеличивается относительно некоторого выбранного уровня, фотоэлемент, соединенный системой реле, включает подачу свежей питательной среды.

Для глубинного культивирования бактерий с аэрацией в промышленных и лабораторных условиях применяют биореакторы или ферментеры. Ферментеры представляют собой герметические котлы, в которые заливается жидкая питательная среда. Ферментеры снабжены автоматическими приспособлениями, позволяющими поддерживать постоянную температуру, оптимальные рН и редокс-потенциал, дозированное поступление необходимых дополнительных питательных веществ. Кроме того, они постоянно продуваются стерильным воздухом и в них установлены мешалки, с помощью которых среда постоянно перемешивается.

Непрерывное культивирование широко используется в промышленной микробиологии. Кроме того, оно используется при проведении физиологических, биохимических и генетических исследований, так как при данном культивировании наблюдается постоянство плотности популяции и концентрации всех компонентов питательной среды. Однако, часто для изучения процессов обмена веществ на протяжении цикла клеточного деления необходимо, чтобы все клетки суспензии делились одновременно (синхронно). Культуры, в которых все клетки находятся на одинаковой стадии клеточного цикла и делятся одновременно, называют **синхронными**. Синхронизировать деление в какой либо популяции клеток можно с помощью различных искусственных приёмов, таких как изменение температуры, воздействие света (для фототрофных микроорганизмов), ограничение количеств питательных веществ или пропускание микроорганизмов через специальный фильтр, чтобы получить клетки одного размера. Но синхронизи-

рованная культура после двух, трёх генераций переходит к асинхронному делению.

Культивирование иммобилизованных клеток микроорганизмов находит широкое применение в биотехнологии, а именно в производстве ценных органических веществ, в деградации вредных природных соединений и промышленных отходов с целью очистки сточных вод от загрязнений.

Методы иммобилизации клеток основаны на способности микроорганизмов к адсорбции на твердых поверхностях. Существуют химические, механические и физические методы иммобилизации микроорганизмов.

Химический способ заключается в образовании ковалентной связи между какой-то из функциональных групп на поверхности клетки и носителем. Этот метод применяется редко, так как клетки в этом состоянии могут терять активность.

Механический метод основан на полимеризации какого-либо мономера, смешанного с суспензией бактерий. В результате микроорганизм оказывается заключенным в ячейку, которая ограничивает его перемещение, но не препятствует поступлению питательных веществ. Чаще всего в качестве носителя используют полиакриламидный гель. В настоящее время разрабатываются методы иммобилизации клеток путем их включения в белковые мембраны с использованием коллагена, казеина, миозина и других белков или полипептидов. Мембраны с иммобилизованными клетками сворачивают в рулон и помещают в колонку, через которую пропускают субстрат.

Физический метод иммобилизации заключается в адсорбции микроорганизмов на поверхности различных синтетических пористых материалов.

Иммобилизованные клетки сохраняют высокую ферментативную активность, что позволяет использовать их в непрерывно действующих технологических процессах. При этом также облегчается выделение продуктов биосинтеза.

5.3. Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях

Для культивирования микроорганизмов в лабораторных условиях используют питательные среды. Питательная среда должна содержать все вещества, необходимые для их роста. В связи с тем, что конструктивные и энергетические процессы у микроорганизмов крайне разно-

образны, универсальных сред, одинаково пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует.

Основными компонентами любой питательной среды для культивирования микроорганизмов являются соединения углерода и азота. Именно эти соединения определяют специфичность подавляющего большинства сред.

Для культивирования автотрофных микроорганизмов необходимо обеспечить клетки углекислотой, так как концентрация углекислоты в воздухе не превышает 0,03% и ее поступления в среду за счет диффузии недостаточно для интенсивного роста микроорганизмов. Поэтому в среды для культивирования автотрофов вносят чаще всего углекислый кальций (CaCO_3) или другие карбонаты. Можно вносить также бикарбонат натрия (NaHCO_3). В некоторых случаях через среду продувают воздух, искусственно обогащенный 1–5% углекислоты.

Потребности гетеротрофов не могут быть удовлетворены углекислотой. Для их развития среда должна содержать органические соединения. В зависимости от индивидуальных особенностей микроорганизмы-гетеротрофы способны использовать различные соединения углерода – органические кислоты, спирты, углеводы, углеводороды, ароматические соединения и др. Но чаще всего в лабораторной практике используют в качестве источника углерода глюкозу, так как это наиболее усвояемое микроорганизмами соединение углерода.

Вторым основным компонентом питательной среды является источник азота. Азот входит в состав органических веществ клетки главным образом в восстановленной форме – в виде амино ($-\text{NH}_2$)- или имино ($-\text{NH}$)- групп. Потребности микроорганизмов в источнике азота могут быть удовлетворены различными азотсодержащими соединениями, в которых азот имеет разную степень восстановленности. Для очень многих микроорганизмов это могут быть соли аммония. В этом случае вносят в среды NH_4Cl или $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Следует однако помнить, что аммонийные соли – физиологически кислые соли, так как по мере использования иона аммония в среде накапливается анион соответствующей кислоты, что приводит к заметному возрастанию кислотности среды и может отрицательно повлиять на развитие микроорганизмов.

Потребности значительного числа микроорганизмов в азоте могут быть удовлетворены нитратами. Питательные среды для культивирования таких микроорганизмов содержат KNO_3 или NaNO_3 . В отличие от солей аммония нитраты – это физиологически щелочные соли, так

как при использовании аниона NO_3^- в среде накапливаются катионы K^+ или Na^+ . Нитриты для многих микроорганизмов токсичны, поэтому в качестве источника почти не используются.

Наиболее требовательные к азоту микроорганизмы культивируют на питательных средах, содержащих белки или продукты их неполного расщепления – пептоны. Пептоны представляют собой смесь поли- и олигопептидов, аминокислот, органических азотных оснований, солей и микроэлементов. Их получают в результате воздействия протеолитических ферментов на белки животного (мышечный белок, казеин) или растительного (соевая мука) происхождения. Необходимо иметь в виду, что пептон микроорганизмы могут использовать не только как источник азота, но и как источник углерода и энергии.

Кроме источников углерода и азота микроорганизмам для построения веществ клетки необходимы: сера, фосфор, калий, магний, кальций и другие макроэлементы. Все они должны содержаться в питательной среде в доступной для микроорганизмов форме. Потребности в этих элементах удовлетворяются обычно за счет минеральных солей. Так, потребности подавляющего большинства микроорганизмов в сере удовлетворяются сульфатами, хотя в клетке сера находится в основном в восстановленной форме, в виде сульфгидрильных групп. Соли фосфорной кислоты удовлетворяют потребности микроорганизмов в фосфоре. Все необходимые металлы – K, Na, Ca, Mg – и другие элементы микроорганизмы получают в форме катионов или анионов неорганических солей. Например, источником магния служит MgSO_4 , источником натрия – NaCl , кальция – CaCO_3 или CaCl_2 .

Помимо макроэлементов многие микроорганизмы требуют наличия в среде так называемых факторов роста. Факторы роста могут быть двух типов: неорганические и органические. К неорганическим факторам роста относятся микроэлементы – Co, Zn, Mo, Mn, Fe, Cu и другие. Микроэлементы входят в состав активных групп многих ферментов. В качестве органических факторов служат витамины, пурины, пиримидины и аминокислоты. Факторы роста добавляют в питательную среду в значительно меньших количествах, чем макроэлементы. Следует помнить, что микроорганизмы не усваивают аминокислоты в *D*-форме, а лишь в *L*-форме.

Потребности микроорганизмов сразу в нескольких аминокислотах часто удовлетворяют, добавляя к среде гидролизат белка. Для получения гидролизатов используют белки животного (мясо, рыбу, желатину, казеин) или растительного (семена сои, подсолнечника, кукуру-

зы) происхождения, а также клетки микроорганизмов (дрожжи, водоросли, бактерии). Гидролиз проводят с помощью протеолитических ферментов или кипячением с минеральными кислотами либо с крепкими щелочами.

Некоторые натуральные вещества содержат сразу различные факторы роста (витамины, минеральные соли, аминокислоты). К ним относятся дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт.

Все питательные среды по составу делятся на натуральные или синтетические. Натуральными называют среды, которые состоят из продуктов животного или растительного происхождения. К таким средам относятся овощные или фруктовые соки; животные ткани; молоко; отвары мяса, почвы; различные части растений; клетки микроорганизмов. На натуральных средах хорошо развиваются многие микроорганизмы, поскольку такие среды содержат все компоненты, необходимые для их роста и развития. Однако эти среды имеют сложный, непостоянный химический состав и мало пригодны для изучения обмена веществ микроорганизмов, так как в них трудно учесть потребление ряда компонентов и образование продуктов метаболизма. Натуральные среды используются главным образом для поддержания культур микроорганизмов, накопления биомассы и для диагностических целей. Синтетические среды – это среды, в которые входят лишь соединения определенного химического состава, взятые в точно указанных количествах. Синтетические среды широко используются при исследовании обмена веществ, физиологии и биохимии микроорганизмов.

Наряду с натуральными и синтетическими средами выделяют полусинтетические среды. Главными компонентами полусинтетических сред являются соединения известного химического состава – углеводы, соли аммония или нитраты, фосфаты и др. Однако в их состав всегда включаются вещества неопределенного состава, такие как дрожжевой экстракт, почвенный экстракт, кукурузный экстракт или гидролизат казеина. Эти среды находят широкое применение в промышленной микробиологии для получения аминокислот, витаминов, антибиотиков и других важных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

По назначению среды подразделяют на селективные и дифференциально-диагностические. Селективные среды предназначены для выделения микроорганизмов из мест их естественного обитания. Они обеспечивают преимущественное развитие определенной физиологи-

ческой группы микроорганизмов. Дифференциально-диагностические среды дают возможность быстро отличить одни виды микроорганизмов от других и выявить некоторые их особенности. Эти среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации микроорганизмов. Примером таких сред являются среды Гисса, которые используются для изучения сахаролитических свойств микроорганизмов, т.е. способности ферментировать те или иные углеводы и спирты. В состав среды Гисса входит основной фон (пептон и K_2HPO_4), индикатор (бромтимоловый синий, бромкрезоловый пурпурный, водный голубой + розоловая кислота, Андрее и др.) и один из изучаемых углеводов или спиртов. Различают малый и большой пестрый ряд Гисса. В малый ряд Гисса входят следующие углеводы и спирты: глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза и маннит. В большой пестрый ряд Гисса входят кроме тех, что образуют малый ряд Гисса, другие углеводы и спирты, например, арабиноза, рамноза, сорбит, дульцит и т.д. Среда Гисса можно использовать в жидком или полужидком состоянии. В последнем случае к жидкой среде добавляют 0,5 % агар-агара. Рост микроорганизмов на средах Гисса может приводить к накоплению органических кислот, нейтральных продуктов и газов. Выделение этих продуктов регистрируется по изменению рН среды. Например, если среда Гисса содержит индикатор бромтимоловый синий, то цвет ее будет изменяться в зависимости от рН следующим образом: рН = 7,0 – зеленый; рН > 7,0 – синий; рН < 7,0 – желтый.

По физическому состоянию различают жидкие, сыпучие и плотные или твердые среды. Жидкие среды применяют для накопления биомассы или продуктов обмена, для исследования физиологии и биохимии микроорганизмов. Сыпучие среды применяют главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений. К таким средам относятся, например, разваренное пшено, отруби и др. Плотные среды используют для выделения чистых культур, для определения количества жизнеспособных микроорганизмов, для хранения культур в коллекциях, для накопления биомассы и др. С целью уплотнения сред применяют агар-агар, желатину или силикагель (кремнекислый гель). Чаще всего используют для уплотнения агар-агар. Он представляет собой сложный полисахарид, в состав которого входят агароза и агаропектин. Агар-агар получают из красных морских водорослей. Агар-агар удобен тем, что большинство микроорганизмов не используют

его в качестве субстрата для роста. В воде он образует гель, который плавится примерно при 100 °С и затвердевает при температуре 40 °С. Поэтому на агаризованных средах можно культивировать микроорганизмы при относительно высокой температуре. Желатина – это экстракт, получаемый из субстратов, богатых коллагеном – белком костей, хрящей, сухожилий, чешуек. Образующий желатиной гель плавится при температуре 25 °С, которая ниже обычной температуры инкубации многих микроорганизмов (30 – 37 °С). Кроме того, желатина разжижается протеолитическими ферментами, которые многие микроорганизмы выделяют в среду. Эти свойства желатины ограничивают ее применение в качестве уплотняющего средства. Кремнекислый гель (силикагель) используют как твердую основу для синтетических сред строго определенного состава.

Для жизнедеятельности микроорганизмов существенное значение имеют не только состав питательной среды, но и такие факторы, как плотность среды, аэрация, температура, свет и влажность. Развитие микроорганизмов возможно лишь в определенных пределах каждого фактора, причем для различных групп микроорганизмов эти пределы часто неодинаковы.

Так как рН среды имеет решающее значение для роста многих микроорганизмов, то в приготовленных средах всегда следует определять значение рН. рН сред может изменяться в процессе стерилизации, поэтому после стерилизации его следует проверить и довести до нужного значения, если это требуется, стерильными растворами низкой концентрации кислоты или щелочи. рН среды часто меняется в процессе культивирования микроорганизмов. Чтобы не допустить чрезмерного изменения рН в культурах микроорганизмов и удержать его на необходимом уровне, используют различные приемы. Иногда в среды добавляют буферные растворы или избыточное количество мела, который нейтрализует образовавшиеся кислоты. Но лучше всего контролировать рН среды в ферментерах, приспособленных для проточного культивирования. Мы уже установили, что микроорганизмы по-разному относятся к молекулярному кислороду. Это определяет различия и в способе их культивирования.

Культивирование аэробных микроорганизмов:

- культивирование на поверхности плотных сред и в тонком слое жидких сред. В этом случае микроорганизмы получают кислород непосредственно из воздуха;

- глубинное культивирование в жидких средах. При этом способе культивирования микроорганизмы используют растворенный кислород. Так как растворимость кислорода в воде невелика, поэтому, чтобы обеспечить рост аэробных микроорганизмов в толще среды ее необходимо постоянно аэрировать. Наиболее простой и широко распространенный в лабораторной практике способ глубинного культивирования – выращивание на шейкерах, обеспечивающих встряхивание колб или пробирок со скоростью 100 – 200 и более оборотов в минуту. Помимо перемешивания аэрировать культуру микроорганизмов можно продуванием под давлением через толщу среды стерильного воздуха.

Культивирование анаэробных микроорганизмов более сложно, чем выращивание аэробов, так как здесь должно быть сведено к минимуму соприкосновение микроорганизмов с молекулярным кислородом. Для этого используют различные принципы создания анаэробных условий. Их подразделяют на: физические, химические и биологические. Они все основаны на том, что микроорганизмы культивируют в каком-то замкнутом пространстве. К физическим принципам создания анаэробных условий относится выращивание микроорганизмов в микроанаэротатах – вакуумных металлических камерах, снабженных манометром. Анаэротатом может служить обычный стеклянный эксикатор с притертой крышкой. Из анаэротата откачивают воздух, а затем, как правило, заполняют его газовой смесью, состоящей из азота (80 – 90%) и углекислоты (10 – 20%) до давления порядка 500 мм.рт.ст.

К химическим принципам создания анаэробных условий относится использование химических веществ, поглощающих кислород. В качестве поглотителей кислорода в лабораторной практике используют щелочной раствор пиросульфата, дитионит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), металлическое железо, хлорид одновалентной меди, и некоторые другие реактивы. Поглотители помещают на дно химического эксикатора. В него помещают анаэробные микроорганизмы, засеянные в пробирку, колбу или чашку Петри. Эксикатор закрывают притертой крышкой. При этом способе создания анаэробных условий необходимо учитывать поглощающую способность реактивов и объем замкнутого пространства, в котором выращивается культура.

Биологический способ создания анаэробных условий заключается в следующем. Питательную среду в чашке Петри разделяют желобком на две половины. На одной половине засевают бактерии – строгие аэ-

робы, а на второй – строгие анаэробы. Чашку закрывают, щель между доньшком и крышкой заливают парафином или воском. Затем ее помещают в термостат с оптимальной для роста микроорганизмов температурой. Сначала растут аэробные микроорганизмы (до тех пор пока есть O_2), потом начинают размножаться анаэробы.

Наиболее простыми способами ограничения доступа воздуха к культуре являются:

- выращивание в высоком слое среды;
- выращивание в толще плотной среды;
- культивирование в вязких средах. Диффузия молекулярного кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее вязкости;
- заливка среды с посевом высоким слоем стерильного вазелинового масла или парафина.

Глава 6. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Метаболизм – это совокупность биохимических процессов, протекающих в клетке и обеспечивающих её жизнедеятельность. Клеточный метаболизм складывается из двух противоположно направленных процессов: энергетического метаболизма (катаболизма) и конструктивного метаболизма (анаболизма).

Энергетический метаболизм (катаболизм) – это совокупность реакций окисления различных восстановленных органических и неорганических соединений, сопровождающихся выделением энергии, аккумулируемой клеткой в форме фосфатных связей.

Конструктивный метаболизм (анаболизм) – это совокупность реакций биосинтеза, в результате которых за счёт веществ, поступающих извне, и промежуточных продуктов, образующихся при катаболизме (амфиболитов), синтезируется вещество клеток. Этот процесс связан с потреблением свободной энергии, запасенной в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях.

Конструктивный и энергетический метаболизмы состоят из множества последовательных ферментативных реакций. Их условно можно разделить на три этапа. На начальном этапе воздействию подвергаются молекулы химических веществ, служащих исходными субстратами. Иногда эту часть метаболического пути называют **периферическим метаболизмом**, а ферменты, катализирующие первые этапы превращения субстрата – периферическими. Последующие превращения включают ряд ферментативных реакций и приводят к образованию промежуточных продуктов – **промежуточный метаболизм**. Образующиеся на последних этапах конечные продукты конструктивных путей используются для построения вещества клеток, а энергетических выделяются в окружающую среду.

Конструктивные и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. У большинства прокариот они тесно связаны между собой. В процессе анаболизма синтезируются многочисленные ферменты, участвующие в энергетическом метаболизме. С другой стороны, реакции катаболизма не только дают энергию для биосинтеза, но и являются источником многих промежуточных продуктов, которые используются для синтеза веществ, необходимых для построения клеточных структур.

Метаболизм прокариот, как энергетический, так и конструктивный, отличается чрезвычайным разнообразием. Это является результатом того, что бактерии могут использовать в качестве источников

энергии и углерода самый широкий набор органических и неорганических соединений. Такая способность обусловлена различиями в наборе клеточных периферических ферментов или **экзоферментов**, которые выделяются наружу и разрушают макромолекулы исходных субстратов на более низкомолекулярные вещества. Эти ферменты относятся к классу гидролаз. Образующиеся в результате действия таких ферментов вещества поступают в клетку бактерий и подвергаются действию ферментов промежуточного метаболизма. Эти ферменты называются **эндоферментами**, так как они локализуются внутри клетки. Эндоферменты, синтезируемые микроорганизмами, относятся ко всем известным классам ферментов – оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, лигазы, изомеразы и др. Многие из эндоферментов локализованы на мембранах или на рибосомах. Они называются связанными ферментами. Другие ферменты находятся в свободном, растворённом состоянии в цитоплазме.

Набор ферментов в клетке может изменяться в зависимости от условий, в которых находятся бактерии. По этому свойству все ферменты подразделяют на 2 группы: конститутивные и индуцибельные. **Конститутивные ферменты** синтезируются постоянно, независимо от веществ субстрата. В клетке они находятся в более или менее постоянной концентрации. Примером конститутивных ферментов является ДНК-полимераза. **Индукцибельные ферменты** синтезируются в ответ на появление в среде субстрата-индуктора. К индуцибельным ферментам относится большинство гидролаз. Наличие индуцибельных ферментов обеспечивает быструю приспособляемость бактерий к конкретным условиям.

Таким образом, назначение метаболизма состоит в следующем:

- генерация энергии в молекулах АТФ или других богатых энергией соединениях;
- образование субъединиц, из которых синтезируются макромолекулы основных биополимеров клетки (белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов, липидов);
- активация образованных субъединиц – перенос фосфатной группы с АТФ на субъединицы. При этом происходит затрата энергии. Однако, этот процесс необходим, потому что только активированные субъединицы способны вступать в реакции полимеризации;
- синтез специфических макромолекул из активированных субъединиц, т.е. их полимеризация. Полимеризация активированных субъединиц может происходить двумя способами:

а) реакции матричного синтеза (так синтезируются белки и нуклеиновые кислоты);

б) простая конденсация одинаковых активированных субъединиц (например, образование молекул крахмала из остатков глюкозы).

Теперь разберем как осуществляются основные типы энергетического и конструктивного метаболизма у бактерий.

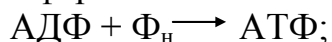
6.1. Энергетический метаболизм

Мы уже установили, что все микроорганизмы по отношению к энергетическим источникам подразделяются на две группы: фототрофы и хемотрофы.

Хемотрофные микроорганизмы используют для синтеза молекул АТФ энергию, освобождаемую при химических реакциях, фототрофные – световую энергию в процессе фотосинтеза.

Образование молекул АТФ из АДФ может происходить двумя способами:

- фосфорилирование в дыхательной или фотосинтетической электронтранспортной цепи. Этот процесс у прокариот связан с мембранами или их производными, поэтому его называют мембранным фосфорилированием. Синтез АТФ в данном случае происходит при участии фермента АТФ-синтазы:



- фосфорилирование на уровне субстрата. При этом фосфатная группа переносится на АДФ от вещества (субстрата), более богатого энергией, чем АТФ:



Такой способ синтеза АТФ получил название субстратного фосфорилирования. В клетке реакции субстратного фосфорилирования не связаны с мембранными структурами и катализируются растворимыми ферментами промежуточного метаболизма.

У хемотрофных бактерий генерация энергии в молекулах АТФ сводится к двум типам биохимических реакций: окисления и восстановления. Окисляться микроорганизмами могут самые разнообразные органические и неорганические вещества. Эти вещества являются донорами электронов. Поскольку электроны не могут самостоятельно существовать, они обязательно должны быть перенесены на молекулы, способные их воспринимать, т.е. восстанавливаться. Такие молекулы называются акцепторами электронов. Донором электронов не может быть предельно окисленное вещество, а их акцептором – предельно восстановленное.

дельно восстановленное. Таким образом, окисление субстратов происходит путём переноса электронов от донора к акцептору. При биологическом окислении чаще всего происходит одновременный перенос двух электронов; при этом от субстрата отщепляются также два протона (H^+). Такое окисление субстрата, происходящее с отщеплением двух протонов и двух электронов, называется дегидрированием. Поэтому нередко термины донор водорода и донор электронов употребляются как синонимы.

Все окислительно-восстановительные реакции энергетического метаболизма у хемотрофных микроорганизмов можно разделить на 3 типа, т.е. различают три типа энергетического метаболизма:

- аэробное дыхание или аэробное окисление,
- анаэробное дыхание,
- брожение.

Основным процессом энергетического метаболизма многих прокариот является **аэробное дыхание**, при котором донором водорода или электронов являются органические (реже неорганические) вещества, а конечным акцептором – молекулярный кислород. Основное количество энергии при аэробном дыхании образуется в электронтранспортной цепи, т.е. в результате мембранного фосфорилирования.

Анаэробное дыхание – цепь анаэробных окислительно-восстановительных реакций, которые сводятся к окислению органического или неорганического субстрата с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а других неорганических веществ (нитрата – NO_3^- , нитрита – NO_2^- , сульфата – SO_4^{2-} , сульфита – SO_3^{2-} , CO_2 и др.), а также органических веществ (фумарата и др.). Молекулы АТФ в процессе анаэробного дыхания образуются в основном в электронтранспортной цепи, т.е. в результате реакций мембранного фосфорилирования, но в количестве меньшем, чем при аэробном дыхании.

Брожение – совокупность анаэробных окислительно-восстановительных реакций, при которых органические соединения служат как донорами, так и акцепторами электронов. Как правило, доноры и акцепторы электронов образуются из одного и того же субстрата, подвергающегося брожению (например, из углевода). Сбраживанию могут подвергаться различные субстраты, но лучше других используются углеводы. АТФ при брожении синтезируется в результате реакций субстратного фосфорилирования.

Наиболее выгодным типом окислительно-восстановительных реакций у бактерий, в результате которых генерируется энергия в молекулах АТФ, является аэробное дыхание, так как здесь происходит больший выход молекул АТФ. Наименее выгодным типом таких реакций является брожение, сопровождающееся минимальным энергетическим выходом.

Поскольку большинство микроорганизмов используют в качестве источника энергии углеводы, и в первую очередь глюкозу, рассмотрим основные пути её расщепления или катаболизма.

У бактерий возможны три пути катаболизма глюкозы:

1) гликолиз или фруктозодифосфатный путь или путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (по имени исследователей, внесших большой вклад в изучение этого процесса);

2) окислительный пентозофосфатный путь или гексозомонофосфатный путь или путь Варбурга-Диккенса-Хореккера;

3) 2-кето-3-дезоксиглюконоатный путь (КДФГ-путь) или путь Энтнера-Дудорова.

Следует отметить, что все перечисленные пути катаболизма глюкозы у микроорганизмов могут протекать при разных типах энергетического метаболизма (аэробное дыхание, анаэробное дыхание, брожение).

Все пути катаболизма начинаются с того, что глюкоза в клетке сначала фосфорилируется при участии фермента гексокиназы и АТФ как донора фосфата. Образуется глюкозо-6-фосфат, который представляет метаболически активную форму глюкозы в клетке и служит исходным пунктом для любого из трёх путей катаболизма.

Пути расщепления глюкозы состоят из многих биохимических реакций, каждая из которых катализируется специфическим ферментом.

Наиболее распространённым путём катаболизма глюкозы у многих микроорганизмов является **гликолиз**. При этом глюкозо-6-фосфат изомеризуется с помощью глюкозофосфатизомеразы и фосфорилируется далее в фруктозо-1,6-дифосфат, который затем расщепляется на 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и фосфодиоксиацетон. Фосфодиоксиацетон под действием фермента триозофосфатизомеразы превращается в 3-ФГА. Таким образом, из одной молекулы глюкозы образуется 2 молекулы 3-ФГА. На эти реакции превращения глюкозы в 3-ФГА затрачивается энергия двух молекул АТФ. Далее происходит окисление каждой молекулы 3-ФГА до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК) (рис. 32).

1,3-ФГК – высокоэнергетическое соединение, содержащее макроэргическую фосфатную связь, – реагирует с АДФ (фермент фосфоглицераткиназа), отдавая высокоэнергетическую фосфатную группу, в результате чего синтезируется молекула АТФ. Таким образом, энергия, освободившаяся при окислении 3-ФГА, путём субстратного фосфорилирования оказывается аккумулированной в молекуле АТФ. Образуется 3-ФГК.

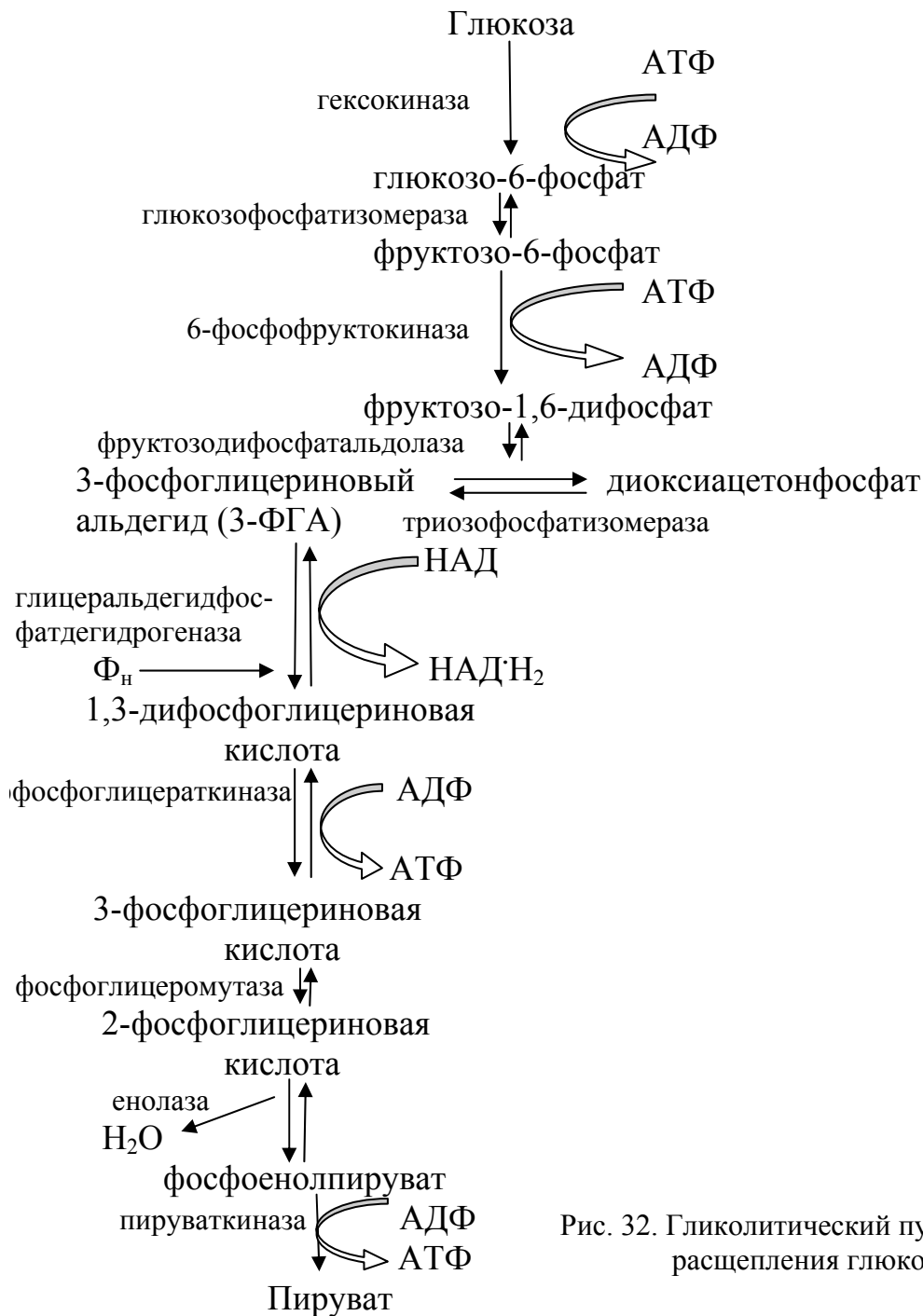
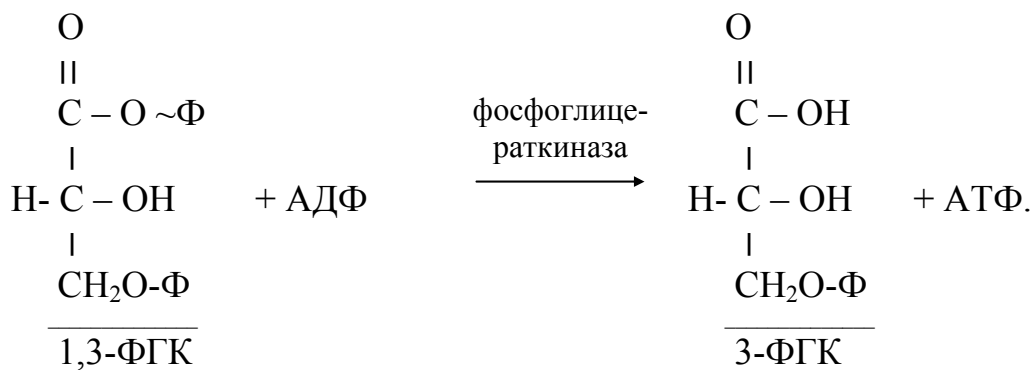


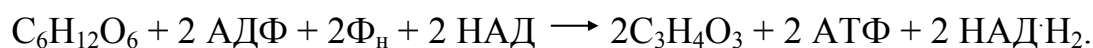
Рис. 32. Гликолитический путь расщепления глюкозы.



Далее 3-ФГК под действием фермента фосфоглицеромутазы превращается в 2-ФГК, из которой в результате отщепления воды образуется фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП). Это также высокоэнергетический фосфат, с которого богатая энергией фосфатная группа переносится пируваткиназой на АДФ, образуется молекула АТФ и пировиноградная кислота (ПВК). Это второе фосфорилирование на уровне субстрата:



Таким образом, при распаде одной молекулы глюкозы образуется четыре молекулы АТФ, в которых аккумулируется освободившаяся при гликолизе энергия. Поскольку в самом начале процесса на активирование глюкозы были израсходованы две молекулы АТФ, чистый выход АТФ на одну молекулу глюкозы составляет 2 молекулы. Суммарное уравнение гликолиза можно записать следующим образом:



Второй, **пентозофосфатный** путь расщепления углеводов, характерен для некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также для гетероферментативных молочнокислых бактерий и некоторых маслянокислых бактерий.

В этом цикле глюкозо-6-фосфат, образующийся путём активирования глюкозы молекулой АТФ, превращается через ряд промежуточных реакций в 6-фосфоглюконовую кислоту, которая подвергается окислению и декарбоксилированию с образованием рибулозо-5-фосфата, CO_2 и НАДФ $\cdot\text{H}_2$. Рибулозо-5-фосфат включается в сложный цикл, приводящий к образованию из его трёх молекул двух молекул глюкозо-6-фосфата и одной молекулы 3-фосфоглицеринового альдегида. Глюкозо-6-фосфат может снова включаться в цикл. А 3-ФГА превращается гликолитическим путём в пировиноградную кислоту.

С энергетической точки зрения этот путь катаболизма углеводов в два раза менее эффективен, чем гликолитический, так как на 1 молекулу глюкозы образуется только 1 молекула АТФ. Однако большое значение этого пути в том, что он обеспечивает клетки бактерий пентозами (рибулозо-5-фосфат), которые являются предшественниками нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Кроме того, в этом цикле образуются 2 молекулы НАДФ $\cdot\text{H}_2$, которые необходимы клетке для восстановительных реакций биосинтеза.

Путь Энтнера-Дудорова встречается у прокариот реже, чем другие. Он характерен в основном для псевдомонад и уксуснокислых бактерий. От пентозофосфатного пути он отличается тем, что 6-фосфо-глюконовая кислота превращается в пировиноградную кислоту и 3-ФГА. 3-ФГА гликолитическим путём также превращается в пировиноградную кислоту. Из 1 молекулы глюкозы в этом пути синтезируется 1 молекула АТФ, 1 молекула НАДФ $\cdot\text{H}_2$ и 1 молекула НАД $\cdot\text{H}_2$.

Следует подчеркнуть, что путь Энтнера-Дудорова является самым кратчайшим механизмом расщепления углеводов до пировиноградной кислоты.

Энергетическую значимость различных путей катаболизма глюкозы можно представить из схемы (рис. 33).

Таким образом, рассмотрев пути катаболизма глюкозы, мы можем заключить, что важнейшим продуктом, образующимся в них, является пировиноградная кислота, которая подвергается дальнейшим превращениям. Пируват занимает центральное положение в промежуточном метаболизме и может служить предшественником многих продуктов.

Что же происходит с пировиноградной кислотой при различных типах энергетического метаболизма: аэробном дыхании, анаэробном дыхании и брожении?

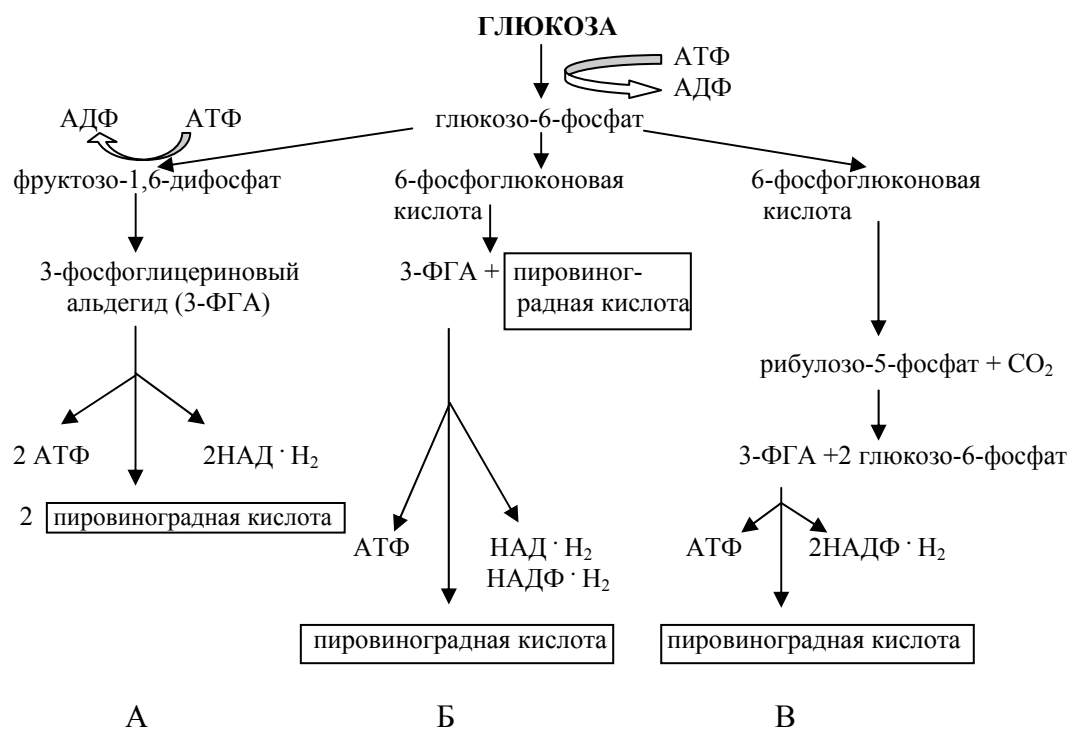
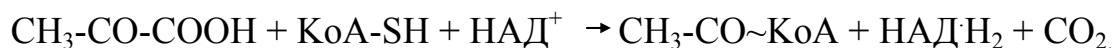


Рис. 33 . Схема путей катаболизма глюкозы в клетках прокариот:
 А – гликолиз; Б – путь Энтнера-Дудорова; В – пентозофосфатный путь.

6.1.1. Аэробное дыхание

Пировиноградная кислота, образуемая одним из трех вышеперечисленных путей катаболизма глюкозы, окисляется до ацетил-КоА. В данном процессе работают ферменты пируватдегидрогеназы:



Ацетил-КоА является исходным субстратом цикла трикарбоновых кислот (цикла Кребса).

В цикл Кребса включается одна молекула ацетил-КоА, которая соединяется с оксалоацетатом. Этот процесс катализируется цитратсинтетазой. Продуктами реакции являются лимонная кислота и свободный коэнзим А. Лимонная кислота с помощью фермента аконитазы превращается в цис-акотиновую и изолимонную кислоты. Изолимонная кислота через щавелевоянтарную кислоту превращается в α -кетоглутаровую кислоту, которая подвергается дальнейшему декарбонированию.

В конечном счете окисление ацетил-КоА в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК) даёт: 2 молекулы CO_2 , 1 молекулу АТФ и 8 атомов водорода, из них 6 атомов водорода на уровне пиридиннуклеотидов и 2 атома – на уровне флавопротеинов (рис. 34).

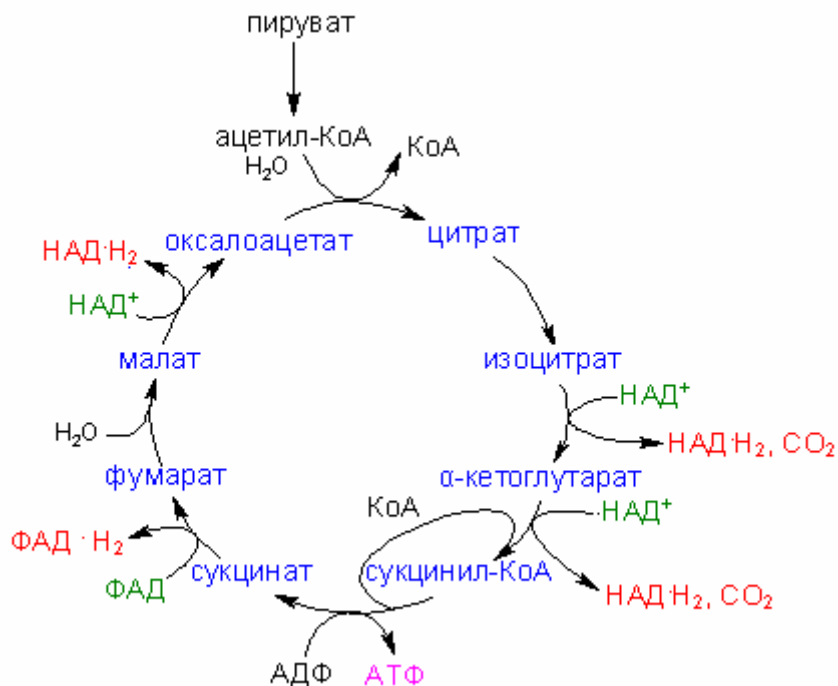


Рис. 34. Цикл Кребса.

Таким образом, цикл трикарбоновых кислот выполняет функцию конечного окисления органических веществ. Но, кроме этого, цикл трикарбоновых кислот обеспечивает биосинтетические процессы клетки различными предшественниками, такими как оксалоацетат, сукцинат, α -кетоглутарат и др.

У некоторых бактерий цикл трикарбоновых кислот «разорван». Наиболее часто отсутствует ферментативный этап превращения α -кетоглутаровой кислоты в янтарную. В таком виде ЦТК не может функционировать в системе энергодающих механизмов клетки. Основная функция «разорванного» ЦТК – биосинтетическая.

NADH_2 и ФАДH_2 , образовавшиеся на разных этапах окисления органических веществ, поступают в дыхательную цепь, которая у бактерий находится в цитоплазматической мембране, а у эукариот в мембране митохондрий. В дыхательной цепи NADH_2 и ФАДH_2 вновь окисляются до НАД и ФАД, а отщепившийся от них водород передаётся не менее через пять переносчиков к концу цепи, где соединяется с молекулярным кислородом, образуя воду (рис. 35).

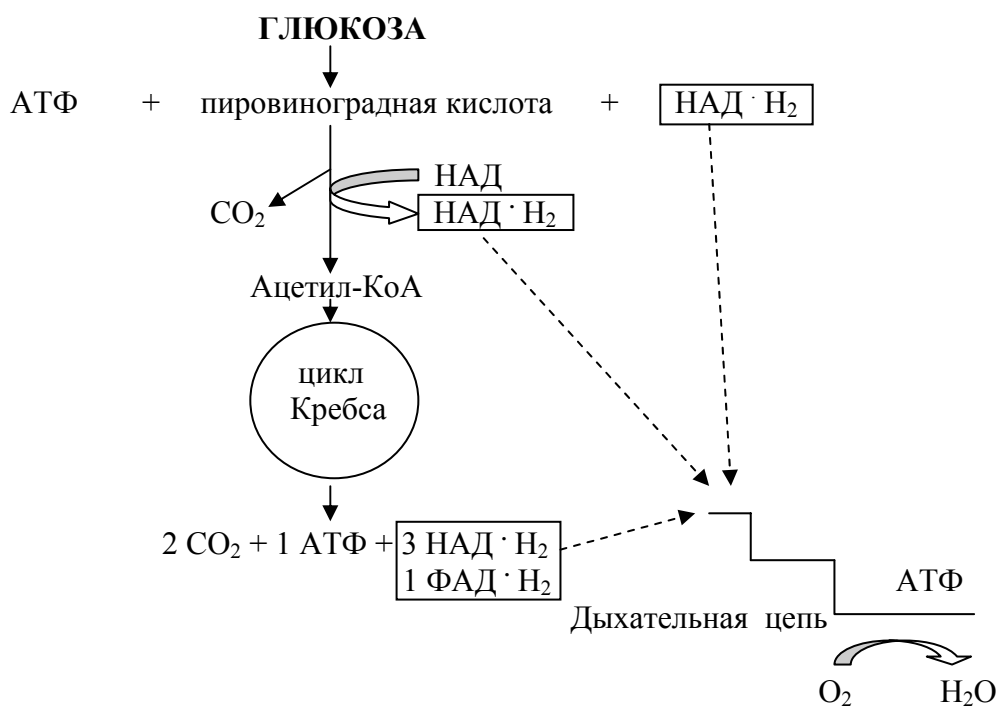


Рис. 35 Схема аэробного дыхания.

Переход водорода по дыхательной цепи состоит из ряда окислительно-восстановительных реакций. В некоторых из этих реакций выделяется достаточно энергии для образования АТФ, и такой процесс носит название **окислительного фосфорилирования**. В реакциях окислительного фосфорилирования принимает участие специальный фермент АТФ-синтаза, который катализирует превращение АДФ в АТФ.

Дыхательные цепи микроорганизмов состоят из следующих важнейших локализованных в мембране переносчиков атомов водорода или электронов: флавопротеины, железосерные белки, хиноны и цитохромы.

Флавопротеины – коферменты, в состав которых входит витамин В₂. В качестве простетических групп в них выступают флавинмононуклеотид (ФМН) или флавинадениндинуклеотид (ФАД). Флавопротеины осуществляют перенос атомов водорода, т.е. являются дегидрогеназами. Дегидрогеназа, содержащая в качестве простетической группы ФМН, является НАДФН₂-дегидрогеназой. Это стартовый переносчик дыхательной цепи, она осуществляет перенос водорода с НАДФН₂ на последующие компоненты дыхательной цепи. Дегидрогеназа, содержащая в качестве простетической группы ФАД, действует как сукцинатдегидрогеназа. Она катализирует окисление янтарной

кислоты в фумаровую. Атомы водорода от ФАДН₂ поступают сразу на хинон.

Железосерные белки (FeS-белки) содержат железосероцентры, в которых атомы железа связаны, с одной стороны, с серой аминокислоты цистеина, а с другой – с неорганической сульфидной серой (рис. 36).

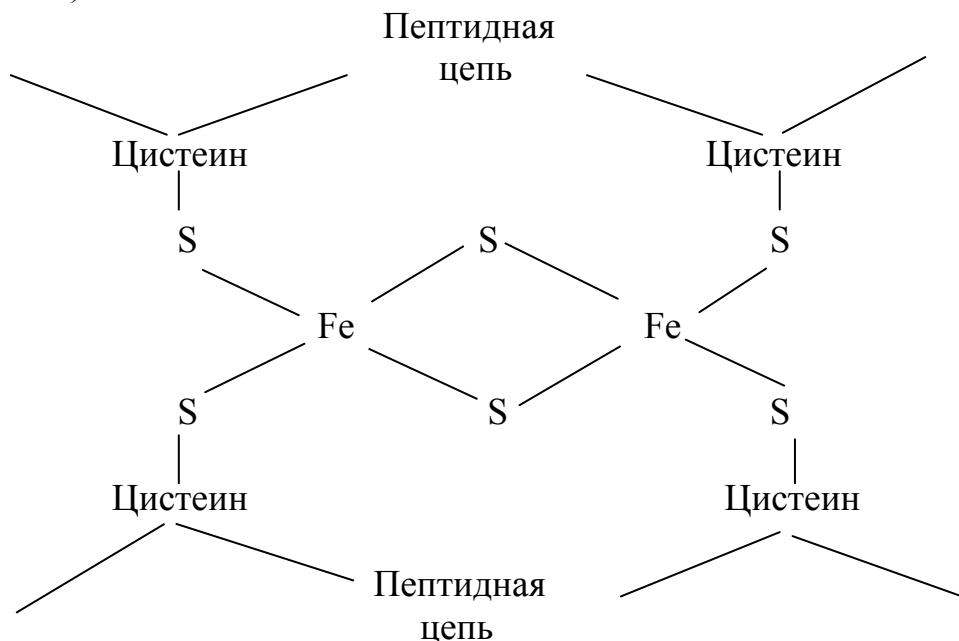


Рис. 36. Железосероцентры (FeS - центры) белков.

Железосероцентры входят в состав некоторых флавопротеинов, например сукцинатдегидрогеназы и НАДФН₂ - дегидрогеназы, или же служат в качестве единственных простетических групп белков. Дыхательные цепи содержат большое число FeS-центров. Железосероцентры в зависимости от строения могут осуществлять одновременный перенос 1 или 2 электронов, что связано с изменением валентности атомов железа.

Хиноны – жирорастворимые соединения. У грамотрицательных бактерий хиноны представлены убихиноном (кофермент Q) или менахиноном (рис. 37).

Хиноны липофильны и поэтому локализуются в липидной фазе мембраны. Они переносят атомы водорода. По сравнению с другими компонентами дыхательной цепи хиноны содержатся в 10 – 15-кратном избытке. Они служат «сборщиками» водорода, поставляемого различными коферментами и простетическими группами в дыхательной цепи, и передают его цитохромам. Таким образом, они функцио-

нируют в дыхательной цепи на участке между флавопротеинами и цитохромами.

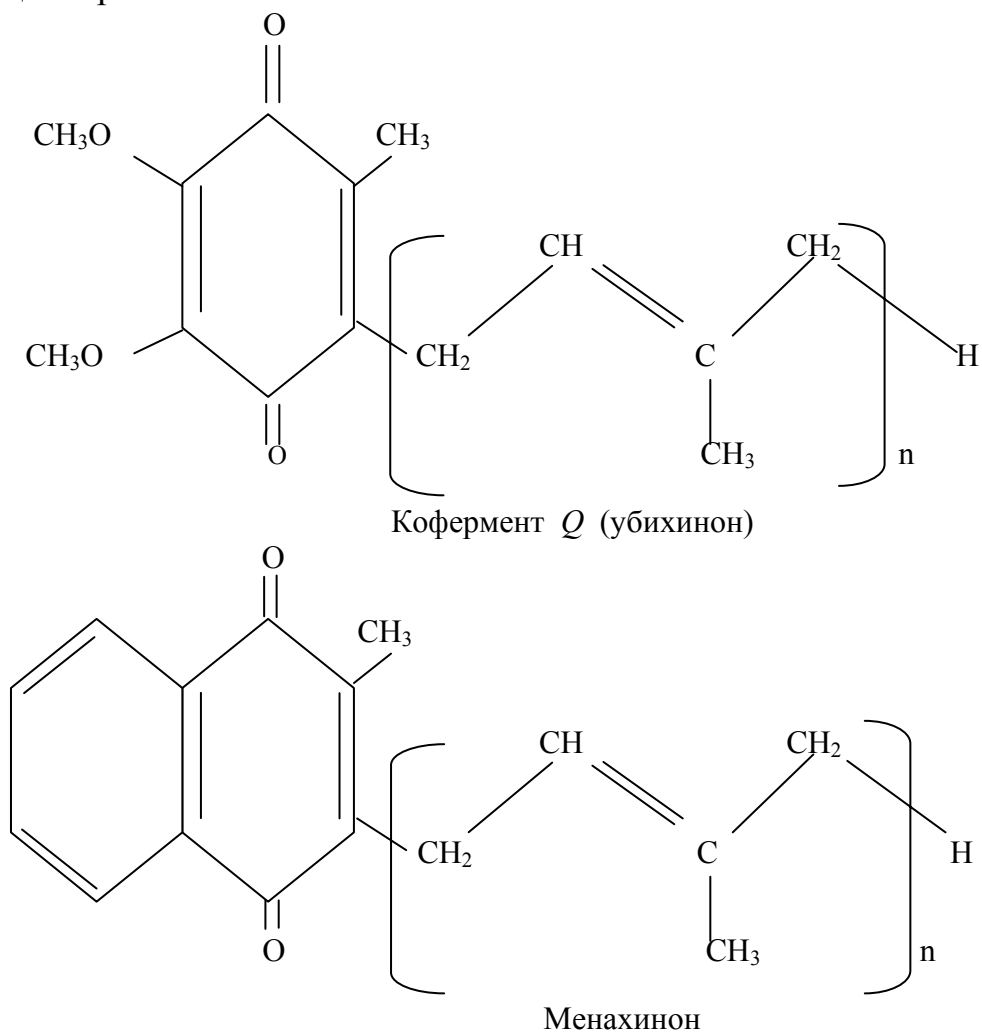


Рис. 37. Хиноны грамотрицательных бактерий.

Цитохромы принимают участие на заключительном этапе цепи переноса электронов, водород они не транспортируют. К цитохромам электроны поступают от хинонов. В качестве простетической группы цитохромы содержат гем. Цитохромы окрашены; они отличаются друг от друга спектрами поглощения и окислительно-восстановительными потенциалами. Различают цитохромы *a*, *a₃*, *b*, *c*, *o* и ряд других. Наиболее широко распространен цитохром *c*. Он найден почти у всех организмов, обладающих дыхательной цепью. Конечные (терминальные) цитохромы дыхательной цепи – это цитохромы *a+a₃* или цитохромоксидаза. Они передают электроны на молекулярный кислород, т.е. катализируют восстановление молекулярного кислорода до воды.

В реакционном центре цитохромоксидазы содержатся помимо двух гемов два атома меди.

Таким образом, дыхательная цепь построена так, что одни компоненты ее переносят только атомы водорода, а другие – только электроны. Флавопротеины и хиноны осуществляют перенос атомов водорода, а FeS-белки и цитохромы – электронов. Переносчики атомов водорода и переносчики электронов последовательно чередуются в дыхательной цепи.

По составу дыхательные цепи различаются у разных микроорганизмов. В качестве примера сравним дыхательные цепи в митохондриях дрожжей и у бактерий *E.coli*.

Из рисунка 38 видно, что митохондриальная дыхательная цепь у дрожжей содержит четыре комплекса:

комплекс 1 – это НАДН₂-дегидрогеназа; в него входят флавинмоноклеотид (ФМН) и железосерные белки; он переносит водород от НАДН₂ к коферменту Q;

комплекс 2 – это сукцинатдегидрогеназа, содержащая флавадениндинуклеотид. Сукцинатдегидрогеназа отдает водород в дыхательную цепь на уровне кофермента Q;

комплекс 3 – это цитохром *b* и цитохром *c*₁. Он принимает электроны от кофермента Q и передает их на цитохром *c*;

комплекс 4 – это цитохромоксидаза, осуществляющая перенос электронов на молекулярный кислород.

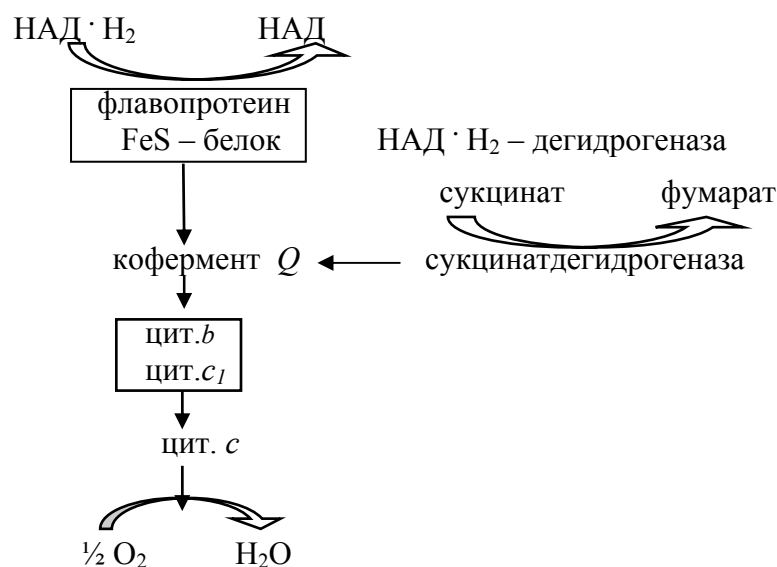


Рис. 38. Компоненты дыхательной цепи митохондрий у дрожжей.

Дыхательная цепь бактерий *E. coli* по своему составу отличается от дыхательной цепи митохондрий дрожжей:

- в нее не входит цитохром *c*;
- дыхательная цепь у *E. coli* разветвлена (рис. 39).

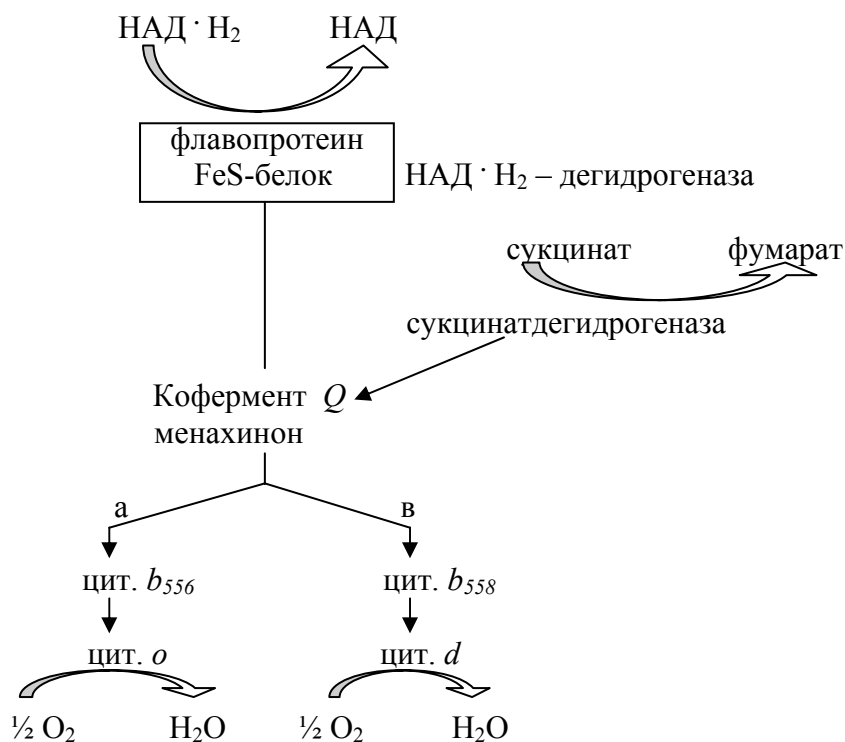


Рис. 39. Компоненты дыхательной цепи бактерий *E. coli*:
 а – путь при росте в аэробных условиях;
 в – путь при росте с ограниченным снабжением кислородом.

В клетках, растущих в сильно аэробных условиях, восстановительные эквиваленты передаются к кислороду преимущественно через кофермент Q , цитохром b_{556} и цитохром o . При ограниченном снабжении кислородом клетки используют в качестве переносчиков электронов менахинон или убихинон и цитохромы b_{558} и d . В случае последнего пути, количество АТФ образуется меньше, чем в случае пути а.

Установлено, что в дыхательной цепи митохондрий дрожжей существует три пункта фосфорилирования, которые соответствуют участкам выхода протонов во внешнюю среду. Первый участок локализован в начале дыхательной цепи и связан с функционированием $\text{НАД} \cdot \text{Н}_2$ -дегидрогеназы. Второй определяется способностью убихинона переносить водород. Последний локализован в конце дыхательной цепи и связан с активностью цитохромоксидазы. Если роль донора водорода выполняет $\text{ФАД} \cdot \text{Н}_2$, то возможны только 2 пункта фосфо-

рирования, так как при этом выпадает участок дыхательной цепи, где располагается НАДФ·Н₂-дегидрогеназа (рис. 40).

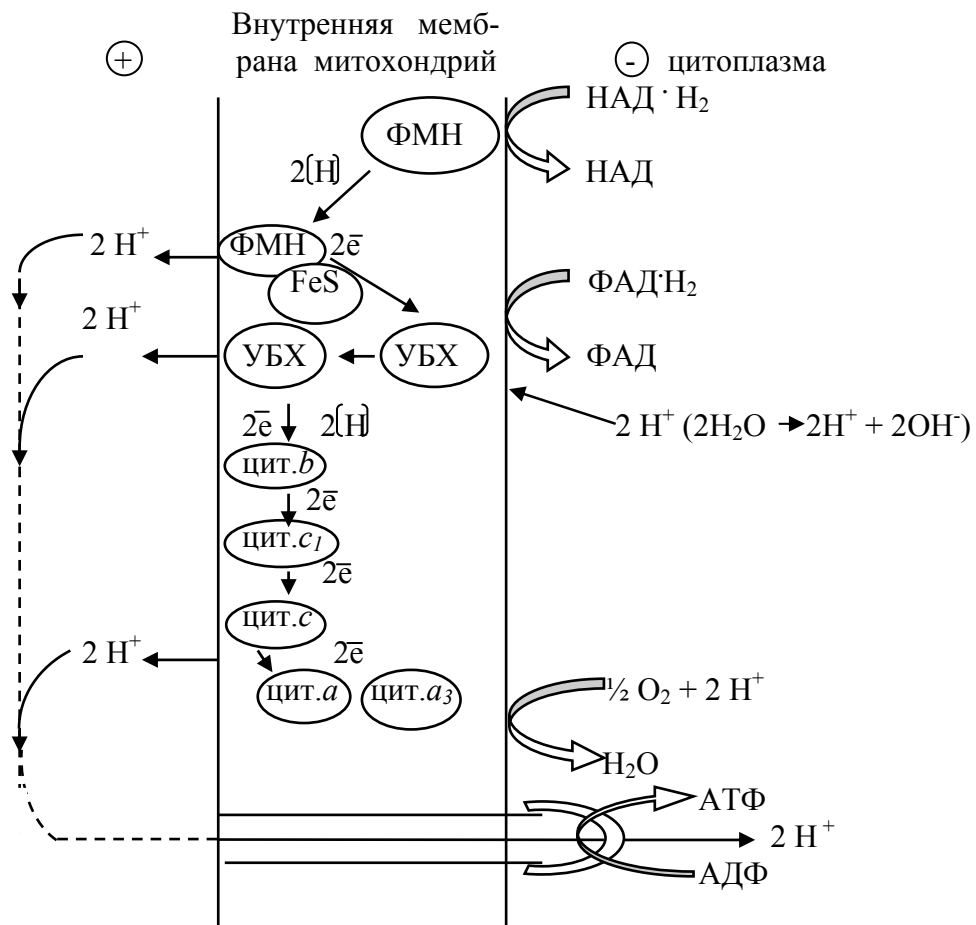


Рис. 40. Функциональная организация компонентов дыхательной цепи митохондрий дрожжей: цит. – цитохром; УБХ – убихинон.

Как видно из схемы, потребление протонов происходит на внутренней стороне мембраны, а освобождение их на наружной стороне. Так как внутренняя мембрана митохондрий и цитоплазматическая мембрана бактерий непроницаемы для ионов, в том числе для H^+ и OH^- , то создается электрохимический градиент между наружной и внутренней сторонами мембраны (иначе протонный градиент). Протоны могут пройти обратно через мембрану только в определенных местах. В некоторых из этих мест располагаются специфические белки АТФ-синтазы. Фермент АТФ-синтаза имеет мол.массу $350 \cdot 10^3$ и сложное строение – состоит из головки, построенной из нескольких субъединиц, ножки и основания. Основание погружено в липидный слой мембраны. АТФ-синтаза катализирует присоединение фосфата к АДФ с отщеплением воды, в результате чего образуется АТФ. Каким

образом поток электронов или протонный градиент осуществляет эту реакцию фосфорилирования, пока 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.

Установлено, что синтез молекулы АТФ связан с переносом 2 протонов через АТФ-синтазу. Так как при окислении НАДН₂ молекулярным кислородом выделяется 6 протонов, то, следовательно, максимальный выход АТФ в этом процессе составляет 3 молекулы. При окислении ФАДН₂, возможны 2 фосфорилирования.

Теперь подсчитаем, каков энергетический выход при окислении одной молекулы глюкозы при аэробном дыхании у дрожжей:

- в процессе гликолиза образуются 2 молекулы АТФ, 2 молекулы НАДН₂ и 2 молекулы пирувата;

- при окислительном декарбоксилировании 2 молекул пирувата образуются 2 молекулы ацетил-КоА и 2 молекулы НАДН₂;

- окисление 2 молекул ацетил-КоА в цикле Кребса приводит к образованию 6 молекул НАДН₂, 2 молекул ФАДН₂ и 2 молекул АТФ.

Итого: 4 молекулы АТФ, 10 молекул НАДН₂, 2 молекулы ФАДН₂.

Мы установили, что при окислении одной молекулы НАДН₂ максимально образуется 3 молекулы АТФ. При окислении одной молекулы ФАДН₂ – 2 молекулы АТФ. Значит: 10 молекул НАДН₂ дают 30 молекул АТФ, а 2 молекулы ФАДН₂ – 4 молекулы АТФ.

Всего: 4+30+4 = 38 молекул АТФ – суммарный энергетический выход аэробного дыхания у эукариотических микроорганизмов, когда катаболизм глюкозы осуществляется гликолитическим путём.

Суммарное уравнение аэробного дыхания:



Для аэробных прокариот характерна меньшая степень сопряжения электронного транспорта в дыхательной цепи с фосфорилированием. Рассмотрим на примере бактерий *E.coli*. Как видно из рисунка 41, в дыхательной цепи этих бактерий имеется только два пункта, в которых происходит «выброс» протонов, а не три, как в случае митохондриальной цепи у дрожжей. Следовательно, при окислении одной молекулы НАДН₂ образуется только 2 молекулы АТФ, а при окислении молекулы ФАДН₂ – 1 молекула АТФ.

И поэтому при аэробном дыхании у бактерий *E.coli*, когда катаболизм глюкозы происходит гликолитическим путем, образуется 26 молекул АТФ:

- 2 молекулы АТФ синтезируются в гликолизе;
- 2 молекулы АТФ синтезируются в двух оборотах цикла Кребса;
- 10 молекул НАДН₂ приводят к синтезу 20 молекул АТФ;
- 2 молекулы ФАДН₂ приводят к синтезу 2 молекул АТФ.

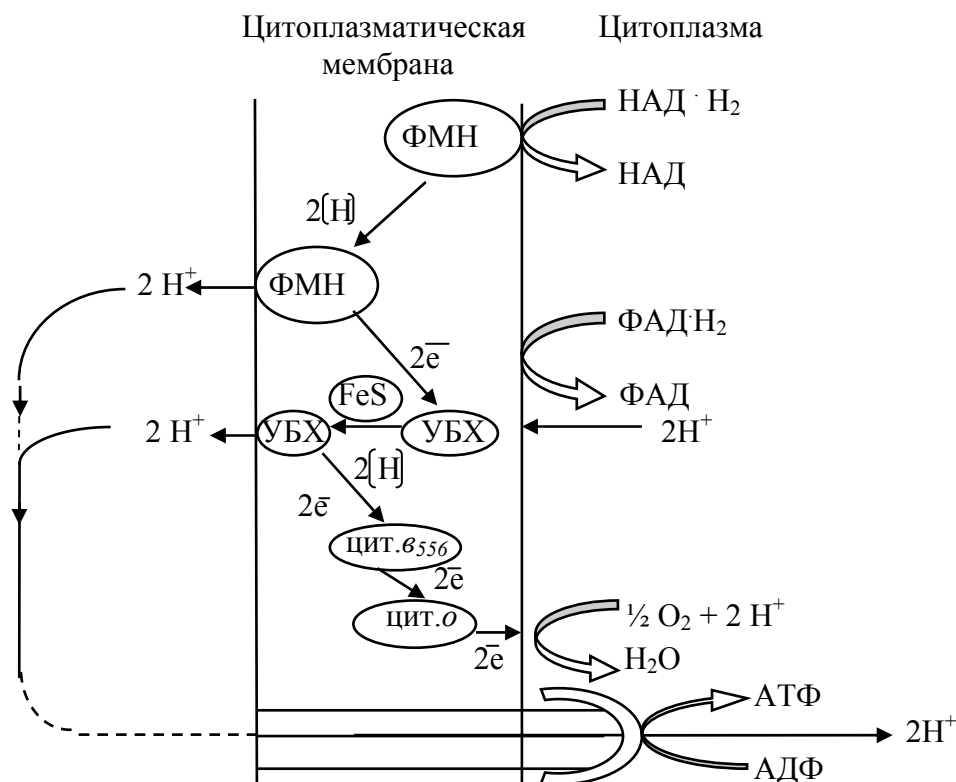


Рис. 41. Функциональная организация компонентов дыхательной цепи бактерий *Escherichia coli*.

У других прокариот, таких как *Corynebacterium diphtheriae* в дыхательной цепи имеется только один пункт «выброса» протонов. У *Mycobacterium phlei* – 3, как в дыхательной цепи митохондрий дрожжей. Из этого можно сделать вывод, что дыхательные цепи различных бактерий существенно различаются и они в основном значительно менее энергетически эффективны.

6.1.2. Анаэробное дыхание

Мы уже определили, что при анаэробном дыхании конечным акцептором электронов в электронтранспортной цепи являются неорганические или органические соединения, но не молекулярный кисло-

род. Если конечными акцепторами электронов является SO_4^{2-} , то процесс называют сульфатным дыханием, а бактерии – сульфатвосстанавливающими или сульфатредуцирующими. Если конечными акцепторами электронов служат NO_3^- и NO_2^- , то процесс называется нитратным дыханием или денитрификацией, а бактерии, осуществляющие этот процесс, называются денитрифицирующими. Если конечным акцептором является CO_2 , то процесс называют карбонатным дыханием, а бактерии – метанобразующими. Если конечным акцептором является фумарат, то этот процесс называют фумаратным дыханием.

Бактерии, способные к анаэробному дыханию, имеют укороченные электронтранспортные или дыхательные цепи, т.е. они не содержат всех переносчиков, характерных для дыхательных цепей, функционирующих в аэробных условиях. Кроме того, в дыхательных цепях анаэробов цитохромоксидаза заменена соответствующими редуктазами. У строгих анаэробов не функционирует цикл Кребса или же он разорван и выполняет только биосинтетические функции, но не энергетические. Основное количество молекул АТФ при анаэробном дыхании синтезируется в процессе мембранного фосфорилирования.

По отношению к молекулярному кислороду бактерии, осуществляющие анаэробное дыхание, являются факультативными или облигатными анаэробами. К облигатным анаэробам относятся сульфатвосстанавливающие и метанобразующие бактерии. К факультативным анаэробам – денитрифицирующие бактерии и бактерии, осуществляющие фумаратное дыхание. Факультативные анаэробы могут переключать свой энергетический метаболизм с аэробного дыхания в присутствии в среде молекулярного кислорода на анаэробное дыхание в отсутствии молекулярного кислорода.

Выход АТФ при анаэробном дыхании меньше, чем при аэробном дыхании, но больше, чем при брожении.

Разберем некоторые основные типы анаэробного дыхания.

6.1.2.1. Нитратное дыхание или денитрификация

Как мы уже установили, конечными акцепторами электронов при нитратном дыхании являются нитраты (NO_3^-) или нитриты (NO_2^-). В результате нитратного дыхания происходит восстановление NO_3^- или NO_2^- до газообразных продуктов (NO , N_2O или N_2).

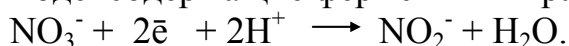
Следует отметить, что к денитрификации способны только бактерии, у эукариот этот процесс не происходит.

Суммарную реакцию нитратного дыхания, где окисляемым субстратом является глюкоза, а конечным акцептором – нитраты, можно записать следующим уравнением:



Полный процесс денитрификации состоит из 4 восстановительных этапов, каждый из которых катализируется специфической мембран-связанной редуктазой.

Первый этап – восстановление нитрата до нитрита катализируют молибденсодержащие ферменты нитратредуктазы:



Второй этап – восстановление нитрита в окись азота катализируют нитритредуктазы:

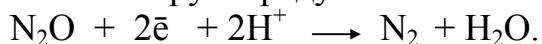


Нитрат- и нитритредуктазы очень чувствительны к молекулярному кислороду. Кислород ингибирует активность этих ферментов, а также репрессирует их синтез. Поэтому эти реакции (восстановление нитрата до нитрита и восстановление нитрита до окиси азота) могут протекать только в том случае, когда кислорода нет совсем или когда его концентрация незначительна.

Третий этап – восстановление окиси азота в закись азота катализируют редуктазы окиси азота:



Четвертый этап – восстановление закиси азота в молекулярный азот катализируют редуктазы закиси азота:



Редуктазы связаны с дыхательной или электронтранспортной цепью.

У денитрифицирующих бактерий, которые являются факультативными анаэробами, функционирует полная электронтранспортная цепь при аэробном дыхании (в присутствии O_2 в среде) и укороченная – при анаэробном дыхании (в отсутствии O_2 в среде). Электронтранспортные цепи денитрификаторов в анаэробных условиях содержат все основные типы связанных с мембранами переносчиков: флавопротеины, хиноны, цитохромы типа *b* и *c*. Цитохромоксидазы в этих условиях не синтезируются. Вместо них функционируют редуктазы (нитратредуктазы, нитритредуктазы, редуктазы окиси и закиси азота). Установлено, что нитратредуктазы денитрифицирующих бактерий связаны с дыхательной цепью на уровне цитохрома *b*, а нитритредуктазы и редуктазы окиси и закиси азота на уровне цитохрома *c*. При

полном процессе денитрификации, когда происходит восстановление NO_3 до N_2 , транспорт электронов в дыхательной цепи можно представить следующим образом (рис. 42):

Количество синтезируемых молекул АТФ зависит от строения дыхательной цепи, наличия и свойств соответствующих редуктаз. При «полной» денитрификации, когда происходит восстановление NO_3^- до N_2 , энергии запасается больше, чем при «усеченной» денитрификации, когда осуществляются отдельные этапы этого процесса: $\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^-$; $\text{NO} \longrightarrow \text{N}_2\text{O}$; $\text{N}_2\text{O} \longrightarrow \text{N}_2$.

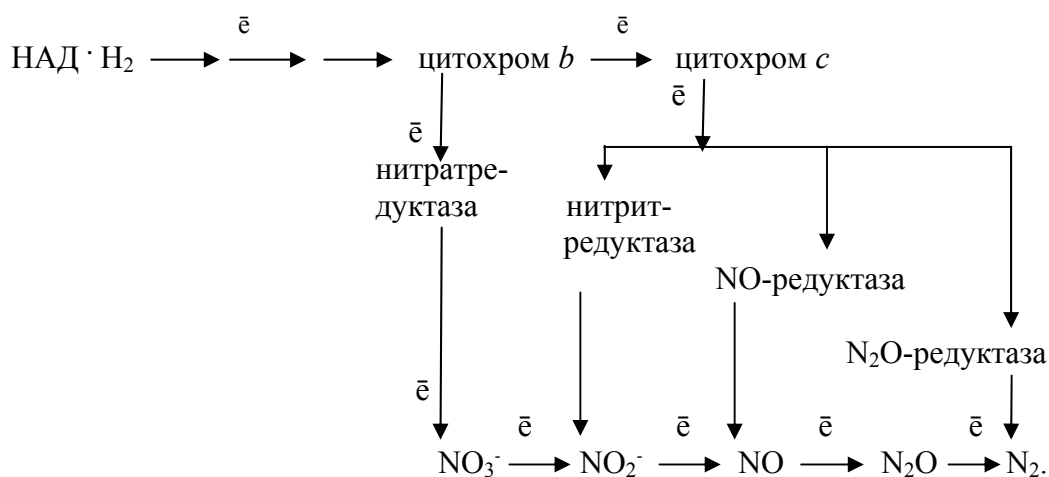


Рис. 42. Транспорт электронов при полном процессе денитрификации.

Схематично нитратное дыхание при окислении глюкозы можно изобразить следующим образом (рис. 43):

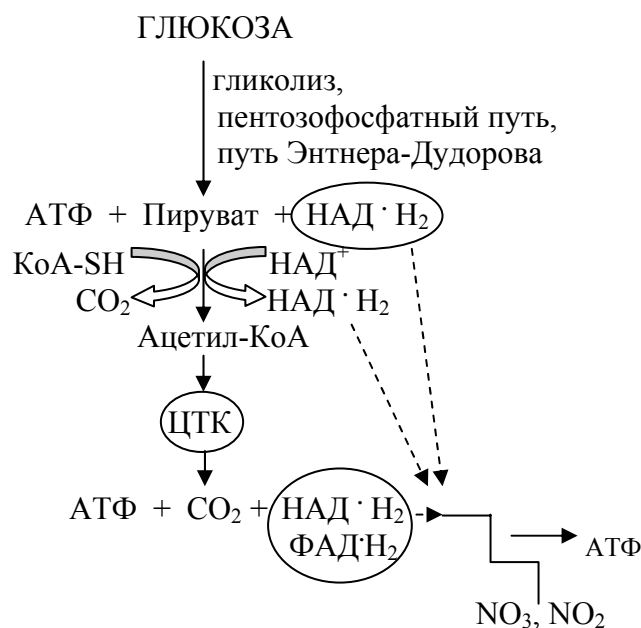


Рис. 43. Схема нитратного дыхания.

Денитрифицирующие бактерии широко распространены в природе. Они принадлежат ко всем основным физиологическим группам: фототрофным, хемолитотрофным, грамположительным и грамотрицательным факультативным анаэробам. Но в большей степени способность к денитрификации распространена у бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Денитрифицирующие бактерии это обитатели пресных и морских водоёмов, почв разного типа. Но процесс денитрификации у них происходит только в анаэробных условиях, т.е. когда содержание кислорода падает ниже 0,2 %. Этот процесс считается вредным для сельского хозяйства, так как доступные для растений нитраты превращаются в недоступный для них молекулярный азот, что приводит к обеднению почвы азотом. В то же время денитрифицирующие бактерии являются важным звеном в круговороте азота в природе, обогащая атмосферу молекулярным азотом. Кроме того, эти бактерии играют положительную роль в освобождении подземных вод и почв от накопившихся в результате деятельности человека (внесение высоких доз удобрений, промышленные стоки) нитратов и нитритов, которые в больших концентрациях токсичны для живых организмов. В связи с этим денитрифицирующие бактерии используют для очистки сточных вод от нитратов.

6.1.2.2. Сульфатное дыхание или диссимиляционная сульфатредукция

Это процесс окисления в анаэробных условиях субстрата (органических соединений или молекулярного водорода), при котором конечным акцептором электронов является сульфат (SO_4^{2-}). В результате этого происходит восстановление сульфата до H_2S . Бактерии, осуществляющие этот процесс, получили название сульфатвосстанавливающих или сульфатредуцирующих.

Сульфатвосстанавливающие бактерии – строгие анаэробы. Они разнообразны по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам. В настоящее время в состав группы сульфатвосстанавливающих бактерий входит более 40 видов. Среди них есть и одноклеточные и нитчатые формы. К одноклеточным бактериям относятся представители родов: *Desulfovibrio* (слегка изогнутые, не образующие эндоспор палочки с полярно расположенным жгутиком) и *Desulfotomaculum* (спорообразующие палочки с перитрихально рас-

положенными жгутиками). Нитчатые формы – представители рода *Desulfonema* (для них характерен скользящий тип движения).

Все сульфатвосстанавливающие бактерии за исключением представителей двух родов (*Desulfotomaculum* и *Desulfosarcina*) имеют клеточную стенку грамотрицательного типа.

В качестве источника углерода и энергии сульфатвосстанавливающие бактерии используют главным образом органические кислоты, в первую очередь пируват и лактат. Некоторые виды могут потреблять также сукцинат, фумарат, малат. Обнаружена способность использовать жирные кислоты, содержащие от 1 до 12 – 18 углеродных атомов, такие как формиат, ацетат, пропионат, бутират. Отдельные сульфатвосстанавливающие бактерии могут использовать спирты (этанол, пропанол, бутанол), некоторые сахара, циклические и C_1 -соединения, холин.

У видов *Desulfonema limicola* и *Desulfosarcina variabilis* обнаружена способность к автотрофии. Эти бактерии используют в качестве источника углерода – CO_2 , в качестве источника энергии – молекулярный водород, а в качестве конечного акцептора электронов – SO_4^{2-} .

Источниками азота для сульфатвосстанавливающих бактерий являются аммиак, аминокислоты. Некоторые виды способны к азотфиксации.

Сульфатвосстанавливающие бактерии могут получать энергию для роста разными способами. Некоторые виды растут на средах с органическими субстратами без сульфатов. В этом случае единственным источником энергии служит процесс брожения, при котором АТФ синтезируется в реакциях субстратного фосфорилирования. Основными субстратами являются пируват, лактат, этанол, при сбраживании которых выделяется молекулярный водород. Однако специфическим способом получения энергии, послужившим основанием для выделения ряда прокариот в отдельную физиологическую группу – группу сульфатвосстанавливающих бактерий, является сульфатное дыхание.

Процесс получения энергии в результате сульфатного дыхания как и при любом дыхании состоит из трех этапов:

- отрыва электронов от энергетического субстрата;
- переноса их по дыхательной цепи;
- присоединения их к веществам, функционирующим в качестве конечных акцепторов электронов.

Первый этап – этап отрыва электронов от энергетических субстратов катализируют различные субстратные дегидрогеназы (лактат-, пируват-, этанолдегидрогеназы) и гидрогеназы. С помощью дегидрогеназ и гидрогеназ электроны передаются сразу в дыхательную цепь. Сульфатвосстанавливающие бактерии содержат ферменты реакций цикла Кребса. Но этот цикл «разорван» и функционирует только в конструктивном метаболизме.

В качестве компонентов дыхательной цепи у сульфатвосстанавливающих бактерий идентифицированы флавопротеины, FeS-белки (ферредоксин, рубредоксин), хиноны типа менахинона, цитохромы типа *b* и *c*. Особенностью дыхательной цепи многих сульфатвосстанавливающих бактерий является высокое содержание цитохрома *c*₃. Точная локализация компонентов, их последовательность в дыхательной цепи пока не установлена. Однако установлено, что окисление в частности H₂ происходит на наружной стороне мембраны, а реакции восстановления SO₄²⁻ – на внутренней. Перенос электронов по дыхательной цепи сопровождается возникновением электрохимического градиента с последующим генерированием энергии в молекулах АТФ.

Последний этап, заключается в акцептировании сульфатом электронов с помощью нескольких редуктаз, и называется собственно диссимиляционной сульфатредукцией.

У некоторых микроорганизмов, использующих в качестве источника серы сульфаты, происходит ассимиляционная сульфатредукция. При этом происходит восстановление сульфата до сульфида, который затем идет на синтез серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин). Основные отличия диссимиляционной сульфатредукции от ассимиляционной сводятся к следующему:

- 1) диссимиляционное восстановление сульфата присуще только узкому кругу высокоспециализированных прокариот;
- 2) активность процесса диссимиляционной сульфатредукции намного выше, чем ассимиляционной, следствием чего является накопление в среде больших количеств H₂S;
- 3) различны механизмы обоих процессов.

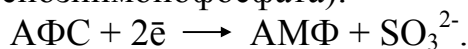
Разберем химизм диссимиляционной сульфатредукции.

Восстановление сульфата начинается с его активирования с помощью АТФ в реакции, катализируемой АТФ-зависимой сульфурилазой:

$$\text{SO}_4^{2-} + \text{АТФ} + 2 \text{H}^+ \longrightarrow \text{АФС} + \text{ФФ}.$$

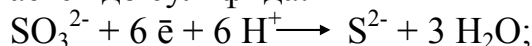
В результате образуется аденозинфосфосульфат (АФС) и пиррофосфат (ФФ). Пиррофосфат расщепляется пиррофосфатазой. Аденозин-

фосфосульфат с помощью аденозинфосфосульфатредуктазы восстанавливается до сульфита, что сопровождается образованием АМФ (аденозинмонофосфата):

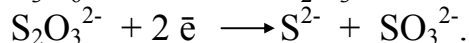
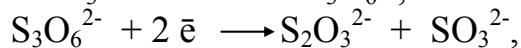
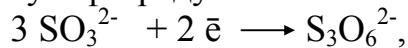


Восстановление сульфита (SO_3^{2-}) до сульфида (S^{2-}) происходит у разных видов бактерий по-разному:

- у одних сульфит с помощью сульфитредуктазы прямо восстанавливается до сульфида:

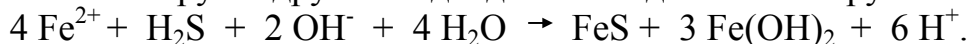


- второй механизм состоит в последовательном трехступенчатом восстановлении сульфита с образованием промежуточных продуктов, таких как тритионат и тиосульфат, при участии сульфит-, тритионат- и тиосульфатредуктазы:



Сульфатвосстанавливающие бактерии распространены в анаэробных зонах водоёмов разного типа, почвах и пищеварительном тракте животных. Наиболее интенсивно восстановление сульфатов происходит в соленых озерах и морских лиманах, где почти нет циркуляции воды и содержится много сульфатов, вызывая замор рыбы.

Являясь основными продуцентами сероводорода, сульфатвосстанавливающие бактерии могут приносить вред, вызывая коррозию металлических труб и других подводных и подземных сооружений:



6.1.2.3. Карбонатное дыхание

Карбонатное дыхание – процесс окисления молекулярного водорода, при котором конечным акцептором электронов является CO_2 . Бактерии, осуществляющие этот процесс, называются метанобразующими.

Метанобразующие бактерии объединены в одну группу на основании двух общих для всех ее представителей свойств:

- строгий анаэробизм;
- способность образовывать метан.

В настоящее время к метанобразующим бактериям относятся бактерии более 40 видов. Они объединены в 13 родов, сгруппированы в 6 семейств и 3 порядка.

Среди метанобразующих бактерий встречаются: прямые или изогнутые палочки разной длины; клетки неправильной формы; извитые формы. У некоторых видов обнаружена тенденция формировать нити или пакеты. Клетки неподвижные или передвигающиеся с помощью перитрихально или полярно расположенных жгутиков. Обнаружены виды, образующие споры.

Метанобразующие бактерии имеют необычный химический состав клеточных стенок. Они не содержат ни ацетилмурамовой кислоты, ни *D*-аминокислот. У этой группы прокариот описаны клеточные стенки трех типов:

- состоящие из пептидогликана особого химического строения, получившего название псевдомуреин;
- построенные из белковых глобул;
- клеточные стенки гетерополисахаридной природы.

Цитоплазматическая мембрана этих бактерий содержит липиды, представленные простыми эфирами глицерина и терпеноидных спиртов. Сложных эфиров, состоящих из глицерина и жирных кислот, у них не обнаружено.

Кроме того, механизм трансляции нечувствителен к антибиотикам, подавляющим синтез белка у других бактерий.

На основании этих, а также ряда других отличительных признаков, согласно современной классификации, метанобразующие бактерии относят к классу архебактерий.

Большинство метанобразующих бактерий имеет температурный оптимум для роста в области 35 – 40° С, но есть виды, у которых оптимальная зона сдвинута в сторону более низких (20 – 25° С) или высоких (65 – 70° С) температур.

В качестве источника азота метанобразующие бактерии используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Источником серы могут служить сульфаты, сульфиды или серосодержащие аминокислоты.

В качестве источников углерода для биосинтетических целей метанобразующие бактерии используют узкий круг соединений. Около половины изученных видов не нуждаются для роста в каких-либо органических соединениях. Они способны расти на синтетических средах, содержащих молекулярный водород и СО₂. При этом СО₂ служит не только для акцептирования электронов при окислении Н₂, но и единственным источником углерода. У таких автотрофных штаммов ассимиляция СО₂ происходит без участия фермента рибулозо-1,5-

дифосфаткарбоксилазы – ключевого фермента цикла Кальвина. Представители этой группы бактерий ассимилируют молекулы CO_2 с помощью реакций карбоксилирования. Первыми или ранними продуктами этих реакций являются ацетил-КоА и пируват, которые идут на синтез клеточных веществ (рис. 44):

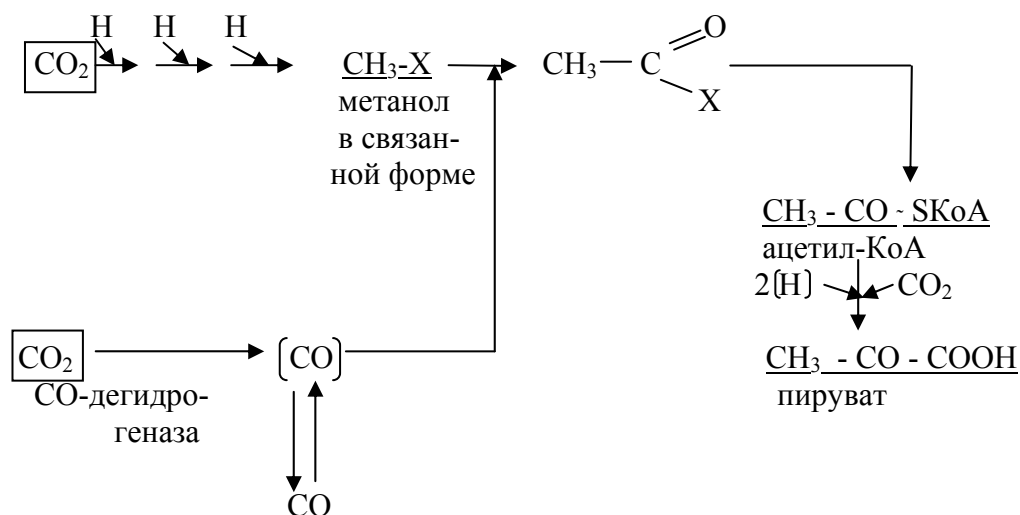
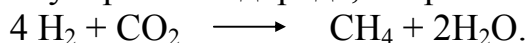
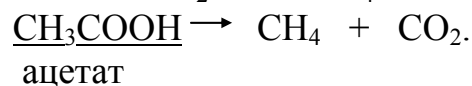
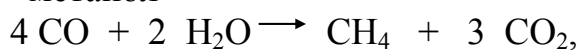
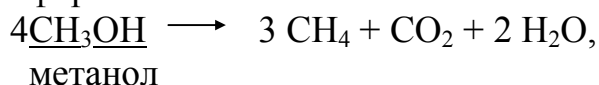
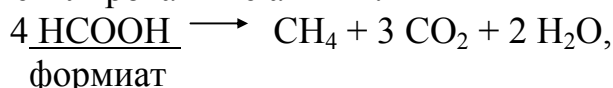


Рис. 44. Ассимиляция CO_2 метанобразующими бактериями.

Рассмотрим сам процесс карбонатного дыхания, т.е. как метанобразующие бактерии получают энергию. Как мы установили метанобразующие бактерии в основном получают энергию за счет окисления молекулярного водорода, сопряженного с восстановлением CO_2 :



Кроме как из H_2 и CO_2 многие метанобразующие бактерии могут использовать для получения энергии формиат, метанол, ацетат, а также метилированные амины:



Механизм энергетических процессов у метанобразующих бактерий полностью ещё не изучен, но общие принципиальные положения установлены. Показано, что получение энергии связано с функционированием электронтранспортной цепи, которая состоит из дегидрогеназ (или гидрогеназ), переносчиков электронов и редуктаз.

Перенос электронов по дыхательной цепи приводит к образованию трансмиссивного протонного градиента, разрядка которого с помощью АТФ-синтазы сопровождается синтезом АТФ.

Природа всех переносчиков электронов по дыхательной цепи у метанообразующих бактерий пока не установлена. Но показано, что все изученные метанообразующие бактерии имеют необычные переносчики электронов, содержащих ряд коферментов и простетических групп, которые найдены только у метанообразующих бактерий: фактор F_{420} (производное 5-дезафлавина, назван по максимуму флуоресценции в окисленной форме при 420 мкм), кофермент М (2-меркаптоэтанол-сульфат), метаноптерин, метанофуран, фактор F_{430} , фактор F_B .

При участии фактора F_{420} , а также гидрогеназы осуществляется одновременный перенос 2 электронов от H_2 в реакции, катализируемые редуктазами. Редуктазы связаны с переносчиками дыхательной цепи. При этом образуются промежуточные продукты. Обратимся к рисунку 45:

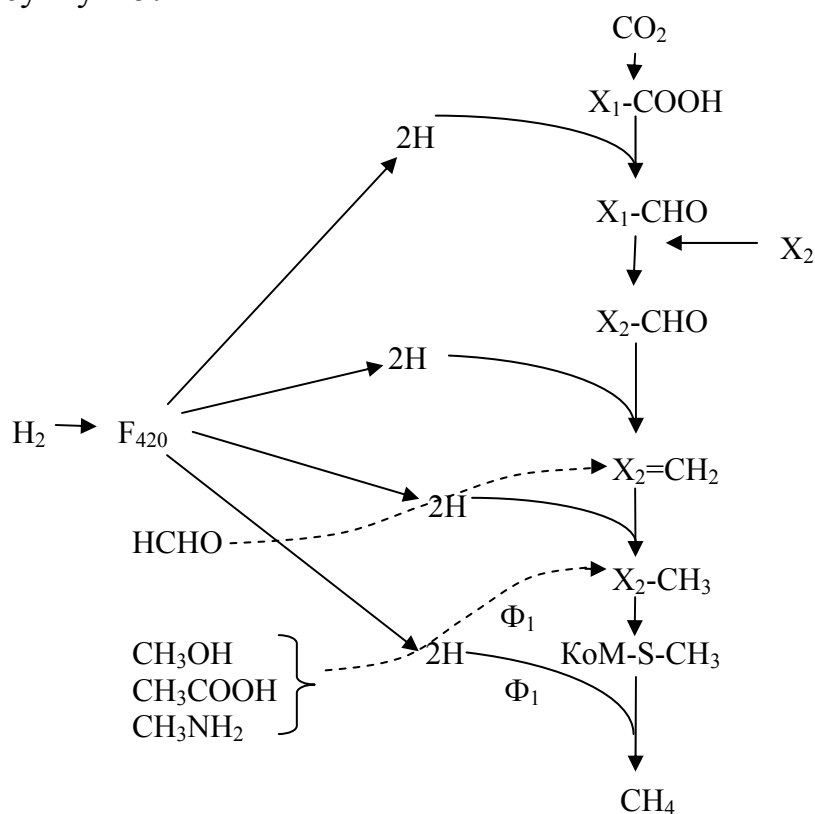


Рис. 45. Схема восстановления CO_2 до CH_4 метанообразующими бактериями: X_1-COOH – карбоксипроизводная; X_1-CHO – формилпроизводная; X_2-CH_2 – метиленпроизводная; X_2-CH_3 – метилпроизводная; F_1 – метилредуктазная система; $K_0M-S-CH_3$ – метилкофермент М.

Из схемы видно, что восстановление CO_2 до CH_4 требует переноса 8 электронов (или 8 атомов водорода), что осуществляется с помощью нескольких редуктаз, т.е. процесс проходит ступенчато. Образующиеся при этом промежуточные продукты остаются связанными с переносчиками дыхательной цепи неизвестной природы. Идентифицирован к настоящему времени только один переносчик, участвующий на последнем этапе образования метана. Это кофермент М. Этот переносчик присоединяет к себе метильную группу, образующуюся в результате ступенчатого восстановления CO_2 . Затем с помощью соответствующей редуктазы происходит освобождение молекулы метана.

Метаболические свойства метанобразующих бактерий (строгий анаэробиз, зависимость от молекулярного водорода) определяют их распространение в природе. Обычными местами обитания этих бактерий является анаэробная зона разных водоемов, богатых органическими соединениями. Это иловые отложения озёр и рек, болота, заболоченные почвы, осадочные слои морей и океанов. Метанобразующие бактерии – обитатели пищеварительного тракта животных и человека. Они являются важным компонентом микрофлоры рубца жвачных животных.

Метанобразующие бактерии представляют определенный практический интерес как продуценты газообразного топлива – метана (биогаз). Метанобразующие бактерии участвуют в разложении органических веществ в отстойниках сточных вод при биологической очистке, в переработке экскрементов животных вместе с отбросами, содержащими целлюлозу, в навозных ямах.

6.1.2.4. Фумаратное дыхание

Фумаратное дыхание отличается от всех описанных ранее способов анаэробного дыхания: во-первых, это единственный пример, когда роль конечного акцептора электронов в дыхательной цепи играет органическое вещество (фумаровая кислота); во-вторых, этот способ запасания энергии не является самостоятельным (единственным) для какой-либо таксономической группы бактерий. Во всех известных случаях бактерии, способные осуществлять фумаратное дыхание, являются хемоорганотрофами и обладают способностью к брожению. Таким образом, использование фумарата в качестве акцептора электронов при дыхании является лишь дополнительным механизмом, позволяющим бактериям добывать повышенное количество энергии в анаэробных условиях.

Процесс восстановления фумарата в бактериальных клетках часто сопровождается образованием сукцината, который может выделяться в среду в довольно больших количествах. Поэтому осуществляющие его бактерии называют сукциногенными. К ним относят, в первую очередь, некоторые виды родов *Bacteroides*, *Fibrobacter*, *Wolinella*. Все они являются микроаэрофилами, способными к аэробному дыханию при низких концентрациях кислорода, но в отсутствие O_2 могут использовать альтернативный акцептор электронов – фумарат.

Кроме сукциногенных бактерий к фумаратному дыханию способны многие другие хемоорганотрофы, но их метаболизм не сопровождается выделением заметных количеств янтарной кислоты. К числу таких микроорганизмов можно отнести энтеробактерии (роды *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella* и др.), представителей рода *Propionibacterium*. Все перечисленные виды добывают энергию в анаэробных условиях в процессах брожения. При этом пропионовокислые бактерии в ходе брожения осуществляют этап фумаратного дыхания. Для перечисленных бактерий добавление фумарата к питательной среде значительно улучшает рост, что связано с увеличением эффективности синтеза АТФ за счет окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи при восстановлении фумарата.

6.1.3 Брожение

Мы установили, что брожение – это способ получения энергии, при котором АТФ образуется в процессе анаэробного окисления органических субстратов в реакциях субстратного фосфорилирования. При брожении продукты расщепления одного органического субстрата могут одновременно служить и донорами и акцепторами электронов.

При сбраживании углеводов и ряда других веществ образуются (по отдельности или в смеси) такие продукты, как этанол, молочная кислота, муравьиная кислота, янтарная кислота, ацетон, CO_2 , H_2 и др. В зависимости от того какие продукты преобладают или являются особенно характерными различают спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое, пропионовокислое и другие типы брожения.

6.1.3.1. Спиртовое брожение

Процесс спиртового брожения проходит по гликолитическому пути до образования пировиноградной кислоты. Далее осуществляется

декарбоксилирование ее пируватдекарбоксилазой при участии тиаминапирофосфата, в результате чего образуются ацетальдегид и CO_2 . Образовавшийся ацетальдегид выступает конечным акцептором водорода. Он при помощи алкогольдегидрогеназы восстанавливается до этанола (рис. 46).

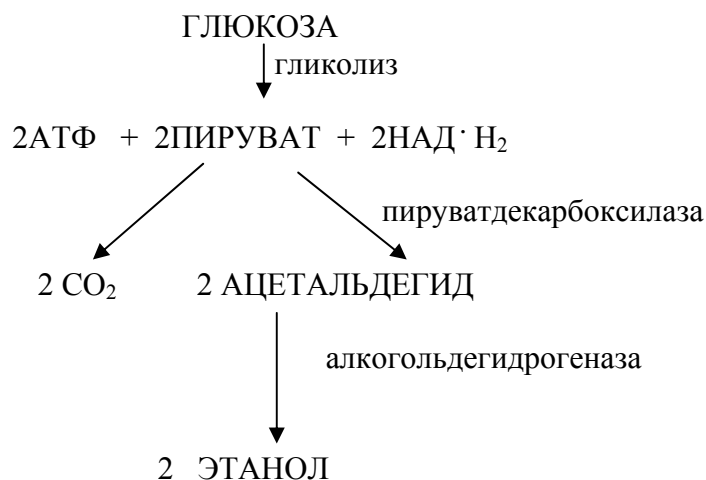


Рис. 46. Схема спиртового брожения.

Суммарно процесс спиртового брожения можно выразить следующим уравнением:



Энергетический выход спиртового брожения составляет 2 молекулы АТФ на 1 молекулу катаболизированной глюкозы.

Главными возбудителями спиртового брожения являются некоторые виды дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*, *S.uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* и др.) и бактерий (*Erwinia amylovora*, *Sarcina ventriculi*, *Zygomonas mobilis*). Кроме этого, этанол образуют такие мезофильные бактерии, как *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium sporogenes*, *Spirochaeta aurantia*, а также термофильные бактерии: *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermohydrosulfuricum*, *C.thermocellum*.

Спиртовое брожение широко используется для получения технического спирта, вина и пива, а также в хлебопечении. В последнем случае имеет значение не спирт, а углекислый газ, который образуется в большом количестве и вызывает разрыхление и подъем теста.

6.1.3.2. Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение проходит в строго анаэробных условиях и осуществляют его облигатно-анаэробные бактерии рода *Clostridium*. В основе его лежит гликолитический путь сбраживания углеводов до пировиноградной кислоты, которая подвергается далее декарбоксилированию с образованием ацетил-КоА. Основной продукт брожения – масляная кислота образуется в результате конденсации двух молекул ацетил-КоА. Превращения ацетил-КоА в масляную кислоту сопряжены с процессами восстановления, в которых в качестве доноров водорода используются молекулы НАДН₂, образующиеся в процессе гликолиза. Кроме того, одна из молекул ацетил-КоА, присоединяя неорганический фосфат, может подвергаться фосфорилированию, превращаясь в ацетилфосфат и далее в ацетат, что сопровождается синтезом АТФ в процессе субстратного фосфорилирования. Это третья молекула АТФ, которая синтезируется при маслянокислом брожении (две другие молекулы АТФ образуются при расщеплении глюкозы по гликолитическому пути) (рис. 47).



Рис. 47 . Схема маслянокислого брожения.

Выведение уравнения маслянокислого брожения и определение его энергетического выхода затруднено из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений, одного – окислительного, ведущего к образованию ацетата и АТФ, другого – восстановительного, функция которого – акцептирование водорода, образующегося в процессе гликолиза. Количественное соотношение между обоими ответвлениями зависит от многих внешних факторов (состав среды, стадия роста бактерий и др.). Расчеты показали, что в целом на 1 молекулу сбраживаемой глюкозы в маслянокислом брожении образуется 3,3 молекулы АТФ. Это наиболее высокий энергетический выход брожения, т.е. получения энергии за счет субстратного фосфорилирования.

Маслянокислое брожение имеет практическое применение для получения масляной кислоты, используемой в парфюмерной промышленности. Для ее производства используют картофель, зерно, мелассу (отходы сахарного производства). Маслянокислые бактерии нередко причиняют вред, вызывая порчу продуктов – прогоркание масла, сметаны, квашеных овощей, силоса, а также при недостаточной стерилизации – порчу консервированных грибных и мясных продуктов.

6.1.3.3. Молочнокислое брожение

Различают 2 типа молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное. При гомоферментативном молочнокислом брожении образуется практически одна молочная кислота ($\approx 90\%$ всех продуктов брожения). Катаболизм глюкозы при этом типе брожения происходит по гликолитическому пути (рис. 48). Образующаяся при этом пировиноградная кислота не подвергается декарбоксилированию, а под действием лактатдегидрогеназы восстанавливается до молочной кислоты. Конечным акцептором водорода выступает пировиноградная кислота.

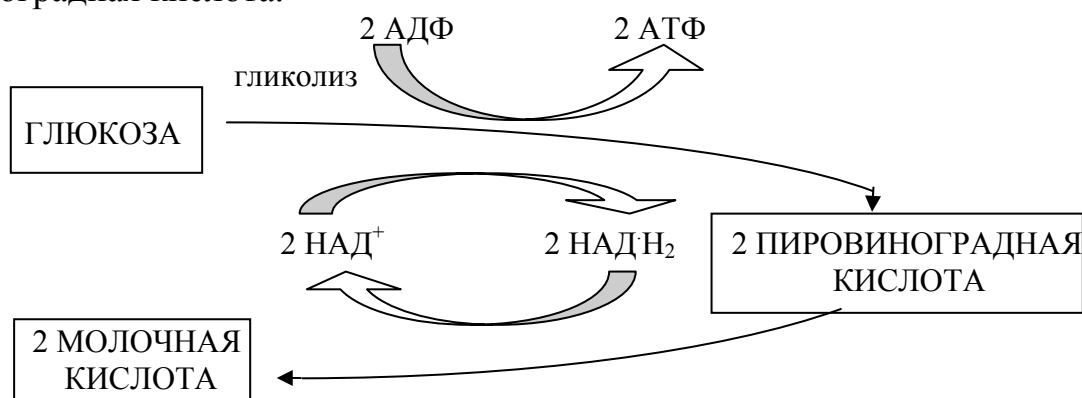


Рис. 48. Схема гомоферментативного молочнокислого брожения.

Процесс гомоферментативного молочнокислого брожения идет по следующему суммарному уравнению:



Возбудителями гомоферментативного молочнокислого брожения являются, например, бактерии *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* и др.

Гетероферментативное молочнокислое брожение приводит к образованию разнообразных продуктов: молочной и уксусной кислот, этилового спирта, углекислоты и глицерина. При этом типе брожения расщепление углеводов происходит по пентозофосфатному пути. Конечными акцепторами водорода являются пировиноградная кислота и ацетальдегид. Возбудителями гетероферментативного молочнокислого брожения являются бактерии видов *Leuconostoc mesenteroides*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus brevis* и др.

Молочнокислые бактерии находят широкое применение в различных отраслях хозяйственной деятельности человека – для приготовления кисломолочных продуктов, сырокопченых колбас, квашения овощей и фруктов, в хлебопечении, для силосования кормов, для биологической выделки кож. Они входят в состав нормальной микрофлоры человека и животных. Многие представители патогенны.

6.1.3.4. Пропионовокислое брожение

Основным продуктом, образующимся при пропионовокислом брожении является пропионовая кислота. Кроме нее образуются уксусная кислота и CO₂. Пропионовокислые бактерии расщепляют углеводы по гликолитическому пути до пировиноградной кислоты, которая подвергается дальнейшим превращениям с образованием пропионовой кислоты, уксусной кислоты и CO₂:



Поскольку пропионовокислые бактерии развиваются, как правило, в тех же субстратах, что и молочнокислые (рубец и кишечник жвачных животных), то предпочтительным субстратом для них является молочная кислота, образующаяся в результате молочнокислого брожения:



Существуют 2 метаболических пути образования пропионовой кислоты:

- акрилатный путь, в котором лактат постепенно восстанавливается до пропионата;

- сукцинат-пропионовый путь, в котором лактат превращается в пропионат через стадии образования пирувата и сукцината.

Акрилатный путь присущ, по-видимому, только нескольким микроорганизмам (*Clostridium propionicum*, *Bacteroides ruminicola*, *Megaspheera elsdenii*). Субстратами для данного метаболического пути могут служить *L*-, *D*-, или *LD*-лактат. В клетках указанных бактерий присутствует фермент рацемаза, катализирующий взаимопревращения стереоизомеров. *L*-лактат превращается в *L*-лактил-КоА, который в результате пока ещё не изученных детально реакций превращается в акрилоил-КоА. Акрилоил-КоА восстанавливается до пропионил-КоА и далее образуется пропионат (рис. 49).

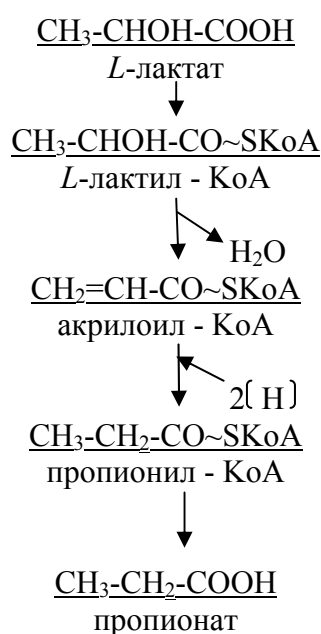


Рис. 49. Акрилатный путь пропионовокислого брожения.

Кроме пропионата в акрилатном брожении образуется также ацетат и CO_2 . Выход АТФ при этом виде брожения составляет 1 молекулу на 3 молекулы лактата.

Сукцинат-пропионатный путь или метилмалонил-КоА-путь имеет у большинства микроорганизмов, образующих пропионат. Сукцинат в этом пути синтезируется в качестве промежуточного продукта, но может продуцироваться также в качестве конечного продукта в малых или больших количествах. С другой стороны, бактерии, использующие акрилатный путь не образуют сколько-нибудь значительных количеств сукцината.

Этот тип брожения называют ещё метилмалонил-КоА-путём потому, что в нем образуется характерный промежуточный продукт – метилмалонил-КоА (рис. 50).

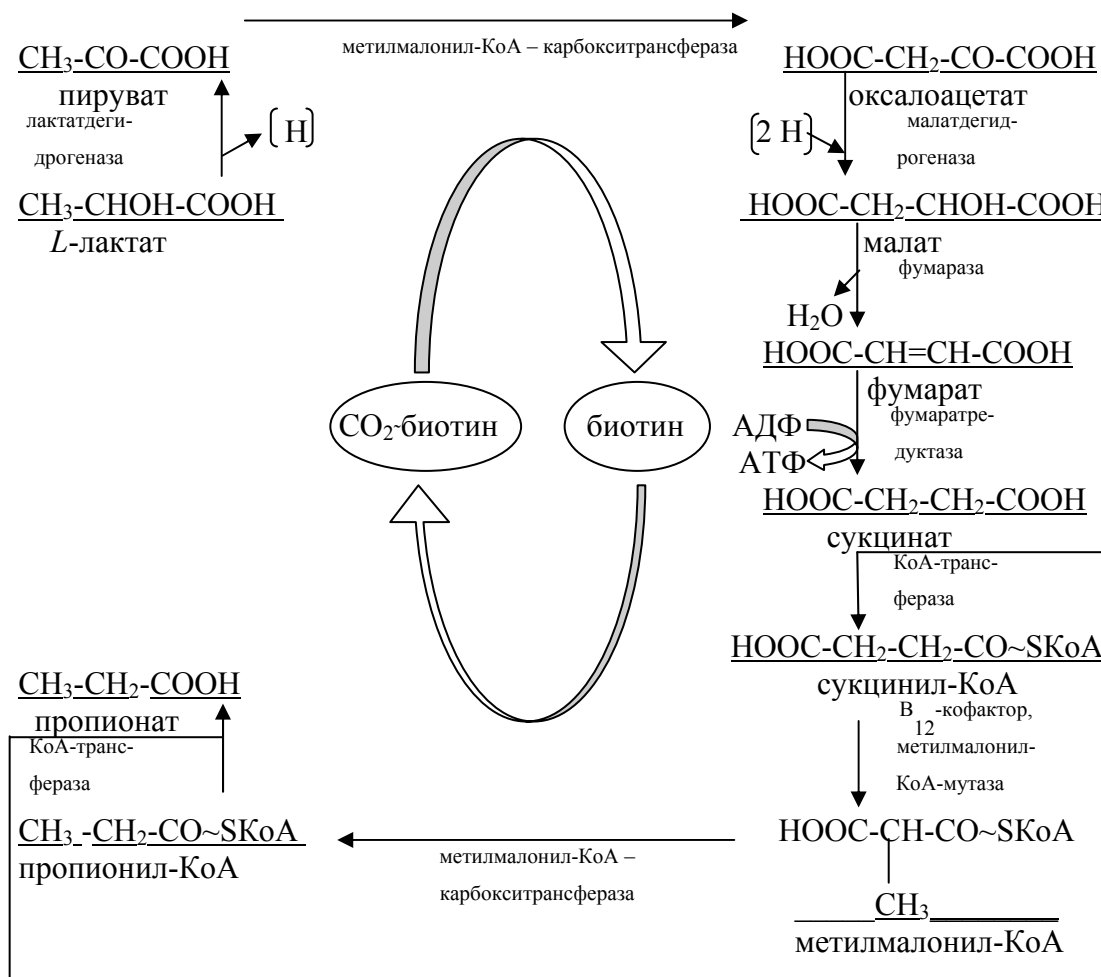


Рис. 50. Метилмалонил-КоА - путь образования пропионовой кислоты бактериями.

Сначала лактат окисляется до пирувата. Затем пируват при участии комплекса биотин- CO_2 карбоксилируется ферментом метилмалонил-КоА-карбокситрансферазой и восстанавливается до оксалоацетата. Далее оксалоацетат через малат и фумарат восстанавливается до сукцината. На этапе превращения фумарата в сукцинат происходит фосфорилирование и образуется молекула АТФ. Затем сукцинат с помощью фермента КоА-трансферазы присоединяется к КоА и таким образом активируется, образуя сукцинил-КоА. Сукцинил-КоА под действием метилмалонил-КоА-мутазы и при участии кофактора B_{12} превращается в метилмалонил-КоА. От метилмалонил-КоА отщепля-

ется CO_2 и синтезируется пропионил-КоА. CO_2 связывается с метил-малонил-КоА-карбокситрансферазой и вновь образуется комплекс биотин- CO_2 . Далее из пропионил-КоА синтезируется пропионат, в результате того что КоА-трансфераза переносит КоА на сукцинат. Таким образом, в процессе образования пропионата КоА и CO_2 переносятся с последующего продукта на предшествующий, не освобождаясь. Следует отметить, что в этом процессе участвуют три кофактора (биотин, КоА и кофермент B_{12}).

Пропионовокислое брожение используется в сыроделии: при созревании твердых сыров, которое длится 2 – 3 месяца. Источником пропионовокислых бактерий служит сычужный фермент – водный экстракт телячьих желудков. Пропионовокислые бактерии превращают молочную кислоту в пропионовую и уксусную кислоты, придающие сыру острый вкус, а благодаря выделению углекислоты в сырной массе образуются поры («глазки»). В связи с тем, что пропионовокислые бактерии способны накапливать в своих клетках большие количества витамина B_{12} , их также используют для промышленного получения этого витамина.

6.1.3.5. Брожение смешанного типа или муравьинокислое брожение

Этот вид брожения характерен для энтеробактерий (сем. *Enterobacteriaceae*). К этой группе бактерий относятся *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Erwinia amylovora*, возбудители брюшного тифа (*Salmonella typhi*) дизентерии (*Shigella dysenteriae*), чумы (*Yersinia pestis*) и др.

Энтеробактерии являются факультативными анаэробами: при доступе воздуха у них происходит аэробное дыхание, а в анаэробных условиях они осуществляют брожение, продуктами которого являются уксусная, муравьиная, янтарная и молочная кислоты, этанол, ацетоин, 2,3-бутандиол, CO_2 и молекулярный водород. Брожение получило название муравьинокислого, потому что характерным, хотя и не главным продуктом брожения, является муравьиная кислота. Наряду с муравьиной кислотой выделяются другие продукты, поэтому такое брожение ещё называют брожением смешанного типа.

При брожении смешанного типа гексозы расщепляются в основном по гликолитическому пути и только у незначительной части микроорганизмов по пентозофосфатному пути. Катаболизм глюконата идет по пути Энтнера-Дудорова.

В зависимости от того, какие продукты образуются при смешанном брожении различают 2 типа брожения:

1. Брожение, характерное для бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia*. При этом брожении образуются главным образом кислоты (молочная, уксусная, янтарная, муравьиная). Кроме кислот выделяются газообразные продукты CO_2 и H_2 (в соотношении 1:1), синтезируется этанол и совсем не образуется 2,3-бутандиол (рис. 51):

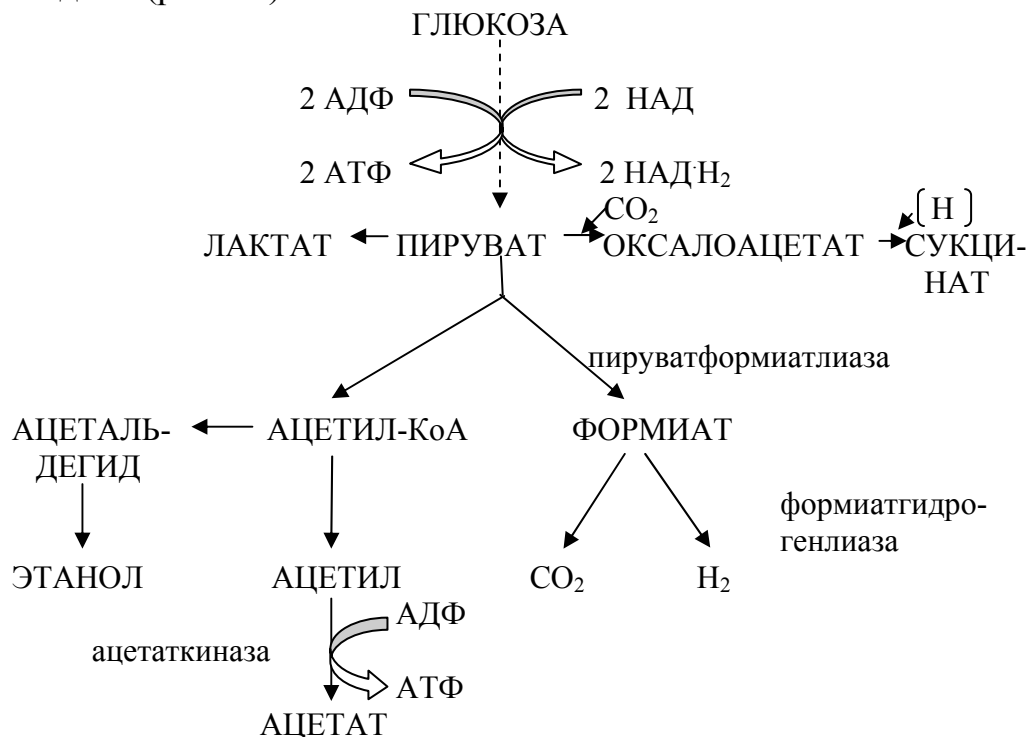


Рис. 51. Брожение у бактерий родов *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Yersinia*.

Выход **АТФ** в этом типе смешанного брожения составляет 2 – 2,5 молекулы **АТФ** на 1 молекулу глюкозы. Кроме 2 молекул **АТФ**, образующихся в гликолитическом пути, ещё некоторое количество **АТФ** синтезируется в реакции, катализируемой ацетаткиназой.

2. Брожение, характерное для бактерий родов *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Erwinia*. При этом брожении органических кислот синтезируется значительно меньше, чем в брожении первого типа. Но зато больше образуется CO_2 и этанола. Кроме того, основным продуктом такого брожения является 2,3-бутандиол. Поэтому этот тип брожения называют ещё бутандиоловым (рис. 52):

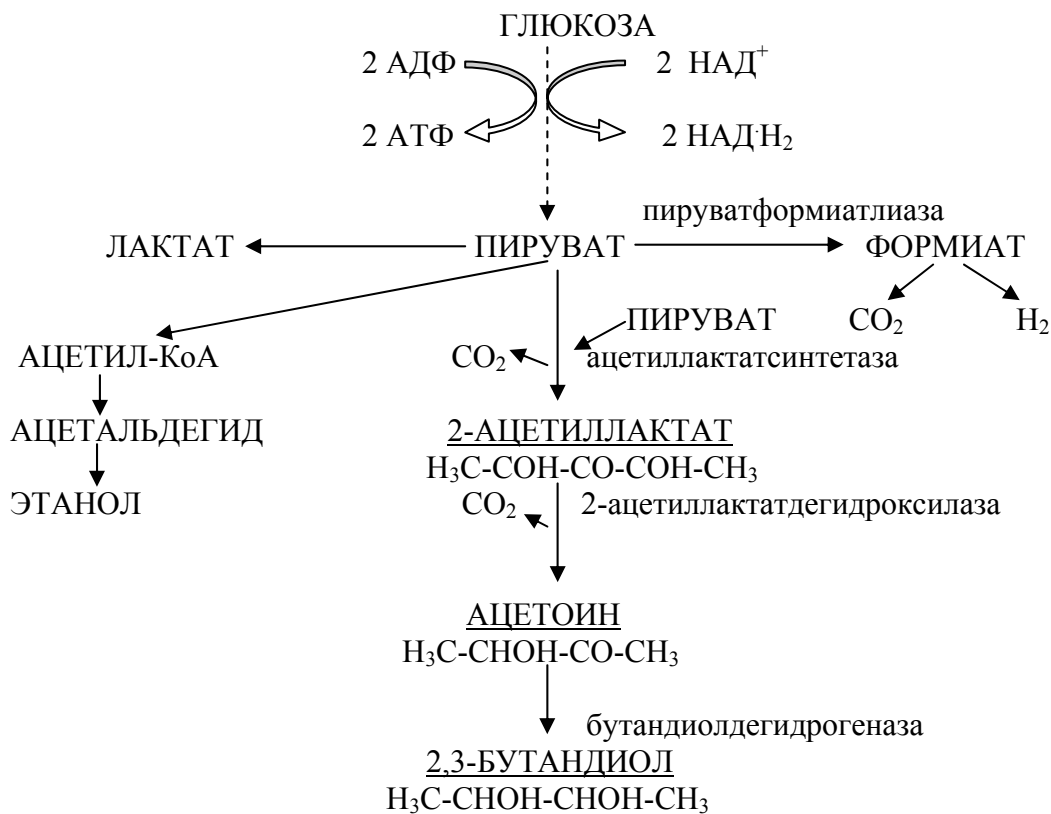


Рис. 52. Бутандиоловое брожение.

Ацетоин образуется из 2 молекул пирувата. Процесс образования ацетоина включает двукратное декарбоксилирование. Поэтому в бутандиоловом брожении CO_2 выделяется намного больше, чем в предыдущем типе брожения. Но в этом брожении синтезируется меньше кислот, так как образование бутандиола конкурирует за промежуточный продукт – пируват. Выход АТФ – 2 молекулы на 1 молекулу глюкозы.

Таким образом, анализируя выше изложенное можно сделать вывод, что наиболее выгодным с энергетической точки зрения является маслянокислое брожение, при котором из одной молекулы глюкозы образуются в среднем 3,3 молекулы АТФ.

6.2. Конструктивный метаболизм

Рассмотрим на примере бактерий *Escherichia coli*. Установлено, что у бактерий *E.coli*, растущих в аэробных условиях на среде с глюкозой, около 50% глюкозы окисляется до CO_2 . При этом образуются молекулы АТФ, в которых аккумулируется энергия. Остальные 50% глюкозы превращается в клеточный материал. На эти превращения и

уходит большая часть энергии АТФ, образовавшейся в результате аэробного окисления.

Более 95% клеточного материала бактерий *E.coli* и других микроорганизмов состоит из макромолекул или полимеров: белков, полисахаридов, липидов, РНК, ДНК. На долю белков приходится 52%, а на долю нуклеиновых кислот – 19% массы сухого вещества. Около 3% сухого вещества клеток составляют низкомолекулярные органические соединения и соли.

Образованию полимеров из глюкозы предшествует синтез составляющих их мономеров. В случае полисахаридов – различных моносахаридов, в случае нуклеиновых кислот – рибо- и дезоксирибонуклеотидов, в случае белков – аминокислот и т.д. (рис. 53):

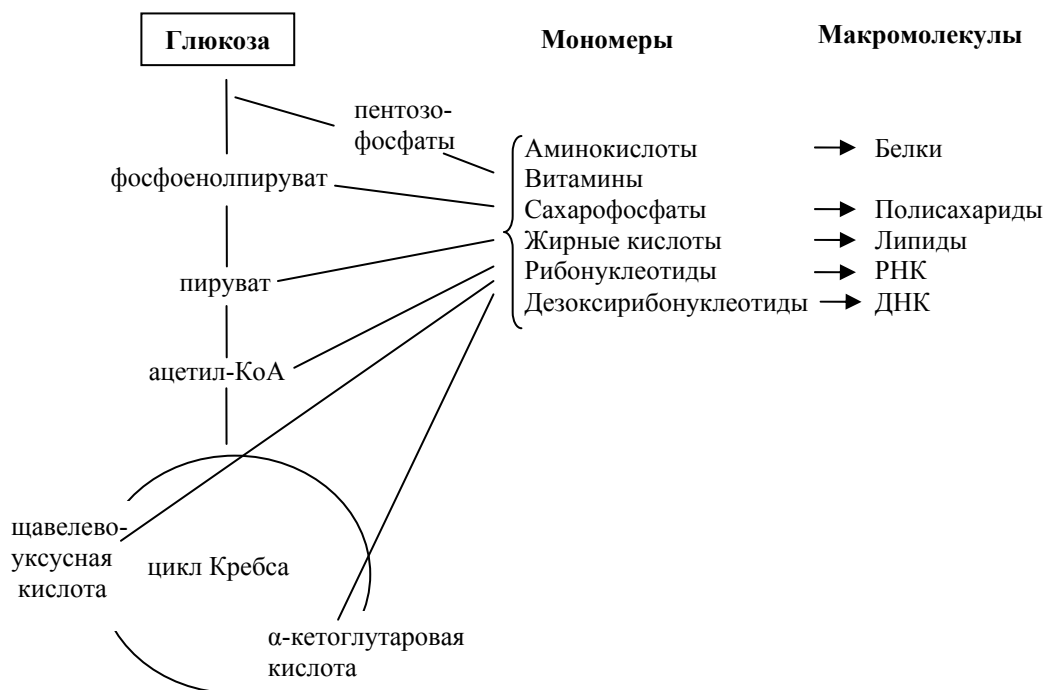


Рис. 53. Общая схема путей биосинтеза клеточного материала из глюкозы.

Мономеры синтезируются из промежуточных метаболитов (амфиболитов), которые образуются при катаболизме глюкозы. Такими промежуточными метаболитами являются: пентозофосфаты, фосфоенолпируват, пируват, ацетил-КоА, щавелевоуксусная кислота, α -кетоглутаровая кислота. Они являются исходным материалом для синтеза всех необходимых аминокислот, витаминов, фосфосахаров,

жирных кислот, рибо- и дезоксирибонуклеотидов. Затем реакции полимеризации приводят к образованию макромолекул.

6.2.1. Биосинтез аминокислот

Большинство бактерий способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав клеточных белков. Предшественниками для синтеза аминокислот служат промежуточные продукты метаболизма, такие как α -кетоглутаровая кислота, щавелевоуксусная кислота, пировиноградная кислота, 3-фосфоглицериновая кислота и другие соединения.

Особенностью биосинтеза аминокислот является использование общих биосинтетических путей. 20 аминокислот, входящих в состав белков, по способу их происхождения можно разделить на 6 групп (табл.7).

Таблица 7

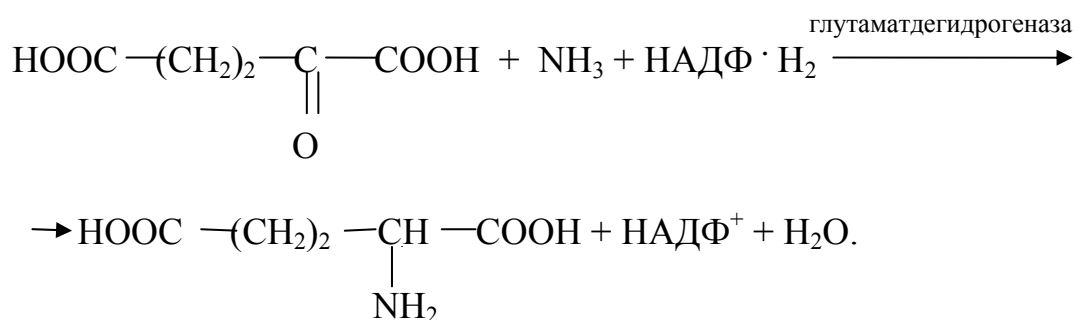
Предшественники для биосинтеза аминокислот

| Предшественник | Метаболический путь, приводящий к образованию предшественника | Аминокислоты с общими биосинтетическими путями |
|--|--|---|
| Пировиноградная кислота | гликолиз, путь Энтнера-Дудорова, окислительный пентозофосфатный путь | аланин валин лейцин |
| Щавелевоуксусная кислота | цикл Кребса, реакции карбоксилирования | аспарагиновая кислота аспарагин лизин метионин треонин изолейцин |
| α -кетоглутаровая кислота | цикл Кребса | глутаминовая кислота глутамин аргинин пролин |
| 3-фосфоглицериновая кислота | гликолиз, цикл Кальвина | серин глицин цистеин |
| фосфоенолпировиноградная кислота + эритрозо-4-фосфат | гликолиз окислительный пентозофосфатный путь | фенилаланин триптофан тирозин |
| 5-фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ | окислительный пентозофосфатный путь | гистидин |

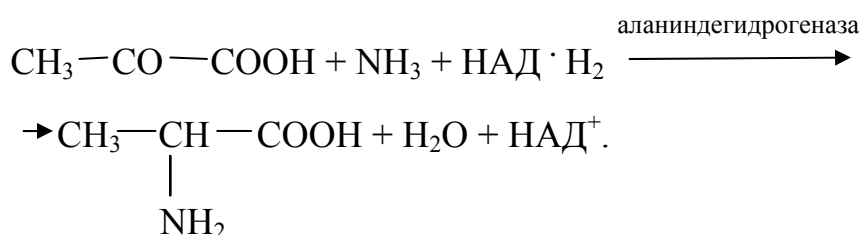
Как видно из таблицы щавелевоуксусная кислота представляет собой отправную точку для синтеза шести аминокислот, α -кетоглутаровая кислота является предшественником четырех, а пировиноградная – трех аминокислот.

Источником азота для аминокислот у разных групп бактерий являются нитраты, нитриты, молекулярный азот, аммиак. Но перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через аммиак, и поэтому нитраты, нитриты, молекулярный азот предварительно восстанавливается до аммиака и только после этого включаются в состав органических соединений.

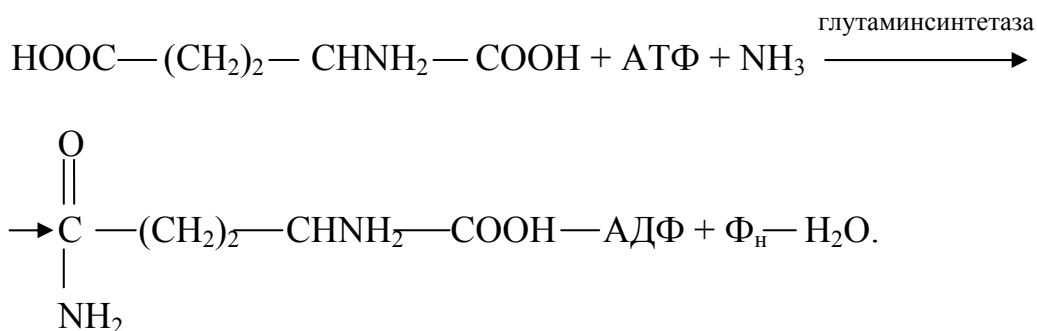
Биосинтез аминокислот происходит различными путями. Наиболее простой способ – **восстановительное аминирование кетокислот аммиаком**. Например, α -кетоглутаровая кислота, взаимодействуя с аммиаком при участии фермента глутаматдегидрогеназы образует глутаминовую кислоту:



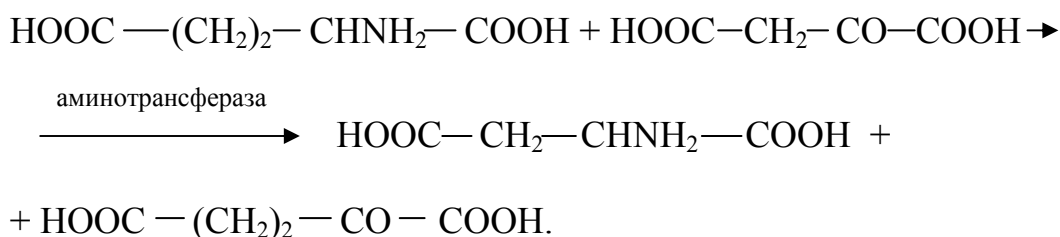
При участии фермента аланиндегидрогеназы пировиноградная кислота взаимодействует с аммиаком с образованием аланина:



Некоторые аминокислоты образуются **путем амидирования**. Так, например, из глутаминовой кислоты с участием фермента глутаминсинтетазы образуется глутамин:



Большинство же аминокислот получает свою аминогруппу от одной из первичных аминокислот в результате **трансаминирования** или **переаминирования**. Из свободных аминокислот в цитоплазме бактерий количественно преобладает глутаминовая кислота. Она служит донором аминогрупп при биосинтезе многих аминокислот. Так, например, глутаминовая кислота взаимодействует со щавелевоуксусной кислотой при участии фермента аминотрансферазы с образованием аспарагиновой кислоты. Отдав аминогруппу глутаминовая кислота превращается в α -кетоглутаровую кислоту, которая является стартовым веществом для синтеза глутаминовой кислоты:



Пути биосинтеза некоторых аминокислот очень сложны. В качестве примера рассмотрим путь биосинтеза ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина). Как мы отметили, стартовыми веществами для их синтеза являются эритрозо-4-фосфат и фосфоенолпируват. Молекулы этих веществ конденсируются с образованием C_7 -соединения, которое подвергается циклизации с образованием 5-дегидрохината. 5-дегидрохинат через ряд этапов превращается в хоризмовую кислоту. Хоризмовая кислота является общим промежуточным продуктом биосинтеза ароматических аминокислот. В этой точке биосинтетический путь разветвляется на два, один из которых ведет к триптофану через антраниловую кислоту, а другой дает префеновую кислоту, которая является предшественником как тирозина, так и фенилаланина (рис. 54).

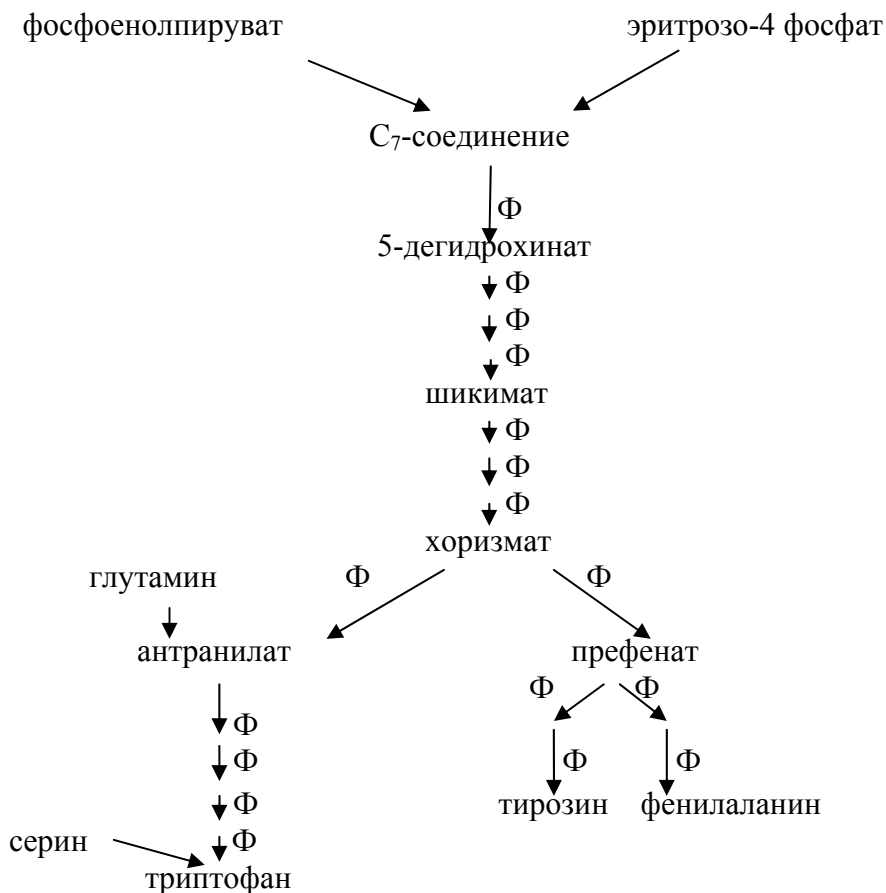


Рис. 54. Путь биосинтеза ароматических аминокислот у микроорганизмов.

Синтезируемые внутриклеточно или поступившие из среды аминокислоты полимеризуются в жизненноважные молекулы белков.

Некоторые гетеротрофные прокариоты, такие как, например, молочнокислые бактерии, не способны синтезировать все аминокислоты, поэтому их рост возможен только на сложных обогащенных питательных средах.

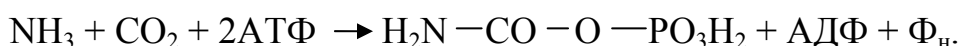
6.2.2. Биосинтез нуклеотидов

Нуклеотиды являются исходным материалом для биосинтеза нуклеиновых кислот. Кроме того, нуклеотиды входят в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминокислот, углеводов, компонентов клеточной стенки и липидов. Нуклеотиды по химической природе являются сложными соединениями и состоят из азотистых оснований (ими являются производные пурина – аденин, гуа-

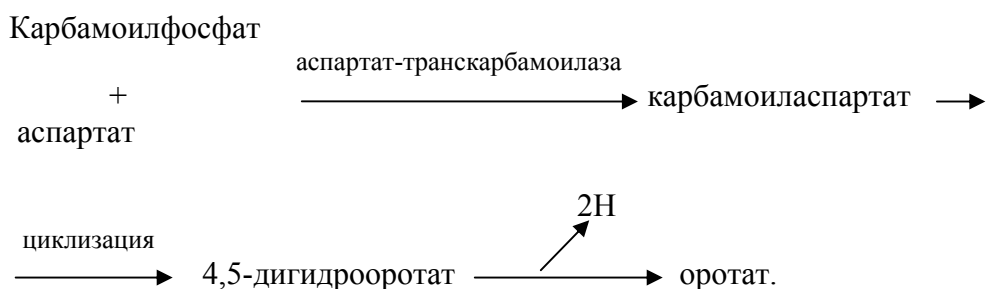
нин и пиримидина – цитозин, тимин), углеводов типа пентоз (рибоза и дезоксирибоза) и остатка фосфорной кислоты.

Большинство микроорганизмов способны синтезировать нуклеотиды из низкомолекулярных соединений. Если же нуклеотиды есть в питательной среде или они образуются при распаде нуклеиновых кислот, то клетка их не синтезирует, а использует в готовом виде.

Синтез пиримидиновых нуклеотидов. Предшественниками пиримидиновых оснований служат карбамоилфосфат и аспартат. Карбамоилфосфат синтезируется из аммиака и углекислоты:



Фермент аспартат-транскарбамоилаза конденсирует эти соединения с образованием карбамоиласпартата. Карбамоиласпартат подвергается циклизации, в результате образуется 4,5-дигидрооротат. Затем в результате дегидрирования этого соединения происходит образование оротата – первого промежуточного продукта, содержащего пиримидиновое кольцо.

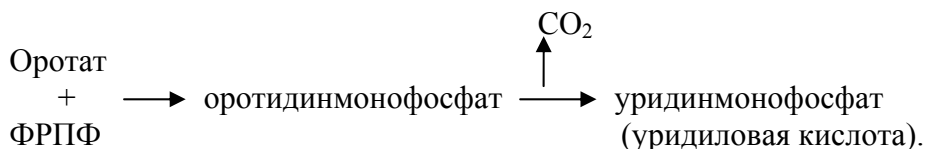


Прежде чем превратиться в одно из пиримидиновых оснований оротат связывается с рибозо-5-фосфатом, который является исходным соединением для образования пентозного компонента нуклеотидов. Как известно, рибозо-5-фосфат может синтезироваться двумя путями:

- окислительным – из глюкозо-6-фосфата через окислительный пентозофосфатный путь;
- неокислительным – из фруктозо-6-фосфата и 3-фосфоглицеринового альдегида в результате реакций, катализируемых трансальдозой и транскетолазой.

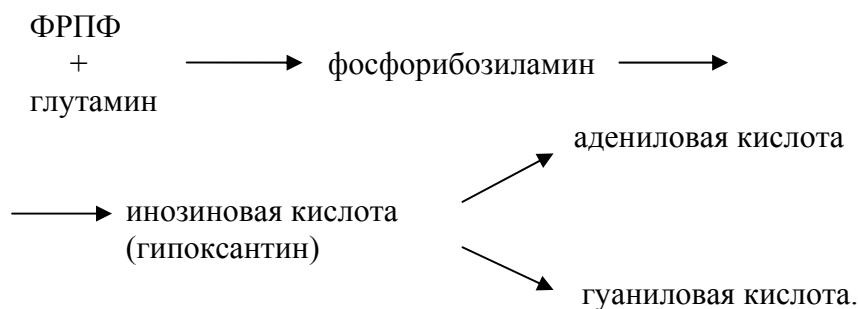
Для синтеза нуклеотидов рибозо-5-фосфат используется в высокоэнергетической форме – в виде фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ).

Фосфорибозилпирофосфат взаимодействует с оротатом, в результате образуется оротидинмонофосфат, который декарбоксилируется в уридинмонофосфат или уридиловую кислоту:



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

Синтез пуриновых нуклеотидов. Начальной стадией синтеза пуриновых нуклеотидов является взаимодействие фосфорибозилпирофосфата (ФРПФ) с глутамином с образованием фосфорибозиламина, который через ряд последовательных ферментативных реакций превращается в инозиновую кислоту (пуриновый нуклеотид гипоксантин). Инозиновая кислота служит исходным продуктом для синтеза других нуклеотидов – адениловой и гуаниловой кислот.



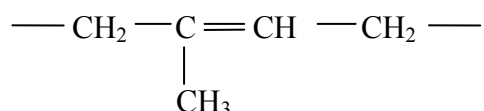
Мы рассмотрели синтез рибонуклеотидов, так как в качестве пентозы использовалась рибоза или точнее рибозо-5-фосфат.

При синтезе дезоксирибонуклеотидов происходит восстановление рибозы до дезоксирибозы. Это происходит на стадии рибонуклеотидов, т.е. синтезируются рибонуклеотиды, а затем происходит восстановление их до дезоксирибонуклеотидов.

Синтезированные клеткой или усвоенные из среды нуклеотиды при участии РНК- и ДНК-полимераз полимеризуются в полинуклеотиды – молекулы РНК и ДНК.

6.2.3. Биосинтез липидов

Липиды в клетке бактерий представлены химическими соединениями различной природы. Это: триглицериды, жирные кислоты, фосфолипиды, гликолипиды, воска. К липидам бактерий относятся также соединения, молекула которых содержит изопреновые фрагменты:



Из изопреновых фрагментов (путем их полимеризации) построены молекулы каротиноидов, хлорофиллов, хинонов. К липидам относятся и некоторые витамины и их производные.

Общими свойствами липидов является их нерастворимость в воде и растворимость в органических растворителях.

У прокариот липиды входят в состав клеточных мембран и клеточной стенки, служат запасными веществами, являются компонентами пигментных систем и цепей электронного транспорта.

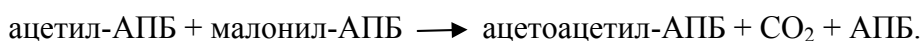
Наиболее универсальными липидными компонентами бактерий являются жирные кислоты и фосфолипиды. Рассмотрим как они синтезируются.

Синтез жирных кислот. Жирные кислоты бывают с четным и нечетным числом атомов углерода. Исходным субстратом для синтеза жирных кислот с четным числом углеродных атомов служит ацетил-КоА.

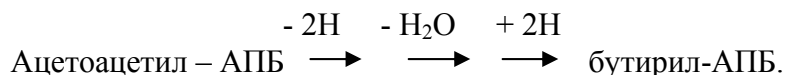
На первом этапе происходит перенос ацетильной группы от ацетил-КоА на молекулу особого белка, называемого ацилпереносящим белком (АПБ):



Ацетил-АПБ выполняет функцию затравки, к которой присоединяется C₂-фрагмент. Донором C₂-фрагмента служит молекула малонил-АПБ, синтезирующаяся также из ацетил-КоА. В результате присоединения C₂-фрагмента к ацетил-АПБ образуется ацетоацетил-АПБ:



Затем с помощью серии ферментативных реакций происходит восстановление окисленных углеродных атомов ацетоацетил-АПБ, приводящее к образованию бутирил-АПБ:

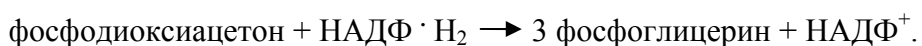


В результате конденсации бутирил-АПБ с новой молекулой малонил-АПБ и последующего восстановления продукта реакции образуется молекула С₆-жирной кислоты (капроил-АПБ). Последовательное наращивание С₂-остатков приводит к синтезу жирных кислот, содержащих обычно 16 – 18 углеродных атомов.

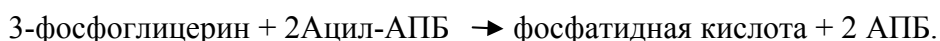
Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуются в результате начальной конденсации пропионил-АПБ с малонил-АПБ.

В клетках бактерий компонентами липидов являются в основном насыщенные жирные кислоты или содержащие одну двойную связь (мононенасыщенные). Полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие две и более двойных связей, найдены до сих пор только у цианобактерий.

Синтез фосфолипидов. Исходным субстратом служит фосфодиоксиацетон (промежуточное соединение гликолитического пути). Фосфодиоксиацетон восстанавливается и образуется 3-фосфоглицерин:



3-фосфоглицерин взаимодействует с двумя остатками жирных кислот в виде комплекса с белком АПБ. Образуются фосфатидная кислота:



Присоединение к фосфатной группе фосфатидной кислоты серина, инозита, глицерина или другого соединения приводят к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина соответственно.

6.2.4. Биосинтез углеводов

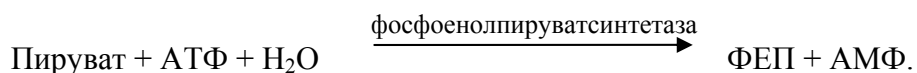
Если микроорганизмы являются автотрофами, то исходным веществом для синтеза углеводов является СО₂. Синтез углеводов происходит у большинства автотрофов в цикле Кальвина (восстановитель-

ный пентозофосфатный цикл), который функционирует так же как и у растений. Для цикла Кальвина характерны два специфических фермента, не участвующие в других метаболических путях. Это:

- фосфорибулокиназа, превращающая рибулозо-5-фосфат, при участии АТФ в рибулозо-1,5-дифосфат, который затем выступает в качестве акцептора CO_2 ;

- рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза, катализирующая реакцию фиксации CO_2 рибулозо-1,5-дифосфатом с образованием двух молекул 3-фосфоглицериновой кислоты. Последняя подвергается серии последовательных ферментативных превращений, ведущих к образованию молекулы глюкозы.

У бактерий-гетеротрофов на среде с неуглеводными предшественниками, например, аминокислотами, глицерином, молочной кислотой синтез углеводов осуществляется с использованием реакций гликолитического пути, идущих в обратном направлении. Этот процесс называется глюконеогенезом. Но некоторые ферментативные реакции гликолитического пути необратимы (реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой). Поэтому в клетках гетеротрофных прокариот, способных использовать двух- и трехуглеродные соединения, сформировались специальные ферментативные реакции, позволяющие обходить необратимые реакции гликолитического пути. Одной из таких обходных реакций у бактерий *E.coli* и других бактерий является превращение пирувата в фосфоенолпируват (ФЕП) под действием фосфоенолпируватсинтетазы:



Образовавшиеся таким образом углеводы используются на синтез олиго- и полисахаридов. Биосинтез полисахаридов осуществляется путем трансгликозилирования, т.е. путем переноса остатков моносахаридов на конец растущей цепи полисахарида. Этот процесс всегда сопровождается затратой энергии.

Глава 7. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

Генетика – это наука о наследственности и изменчивости живых организмов. В отличие от классической генетики генетика бактерий – относительно молодая отрасль науки, первые работы появились в начале 40 годов прошлого столетия. Генетика бактерий использует все термины и определения характерные для классической генетики. С момента возникновения и до сих пор генетика бактерий завоевала необычайную популярность. Такой успех обусловлен двумя главными причинами:

- во-первых, основные принципы генетики бактерий в равной степени применимы ко всем животным и растительным организмам независимо от того многоклеточные они или одноклеточные. Это выражается в том, что все живые организмы обладают сходными по ряду свойств детерминантами наследственных признаков. Это сходство распространяется на природу самих детерминантов (гены), их месторасположение (ДНК), передачу потомству, стабильность, а также и на способ контроля процессов, приводящих к развитию определенных признаков;

- во-вторых, в исследованиях наследственности бактерии в значительной степени заменили такие излюбленные объекты, как плодовая мушка, мышь, кукуруза, поскольку они очень быстро размножаются и образуют огромные популяции; кроме того, культивирование их относительно просто. Иными словами, генетический анализ можно проводить в короткие сроки на огромном числе особей и они не требуют много места. Кроме того, бактерии позволяют изучать биологические явления на клеточном уровне и избежать тем самым сложных взаимодействий и взаимозависимостей, типичных для высших организмов.

7.1. Мутации у бактерий. Доказательства существования мутаций у бактерий

Термин «мутация» введен Г. Де Фризом (1901), изучавшим изменчивость и наследственность у растений и определившим мутацию как «скачкообразное изменение наследственного признака». Это понятие М.Бейеринк (1912) позднее распространил и на бактерии.

Мутация – событие редкое и обычно происходит с частотой $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-10}$. Это означает, что мутантной является одна клетка из 10 000 или 10 млрд. клеток. Мутантная клетка несет измененную ин-

формацию и, следовательно, формирует на питательной среде мутантные клоны.

В результате ряда экспериментов были получены доказательства относительно того, что у бактерий мутации носят спонтанный и ненаправленный характер. К ним относятся эксперименты С.Лурия, М.Дельбрюка, Г.Ньюкомба и супругов Е. и Дж. Ледерберг. Рассмотрим эти эксперименты.

В 1943 году С.Лурия и М.Дельбрюк экспериментально доказали спонтанное возникновение бактериальных мутантов с помощью флуктуационного теста. В эксперименте использовали бактериофаг Т1, который обладал высокой степенью вирулентности в отношении бактерий *E.coli*. Изучалось возникновение резистентности у бактерий *E.coli* к данному фагу.

Культуру бактерий *E.coli*, выделенную из одной колонии (т.е. чистую культуру, без примесей), чувствительную к бактериофагу Т1, выращивали до определенной концентрации и делили на 2 части. Далее одну порцию распределяли по 1 мл на 100 пробирок. Вторую порцию оставляли целой. Все пробирки помещали в одинаковые условия. После равного срока выращивания на чашки с фагом Т1 производили высеv культур из каждой пробирки (одинаковое количество – по 1 мл) (рис. 54).

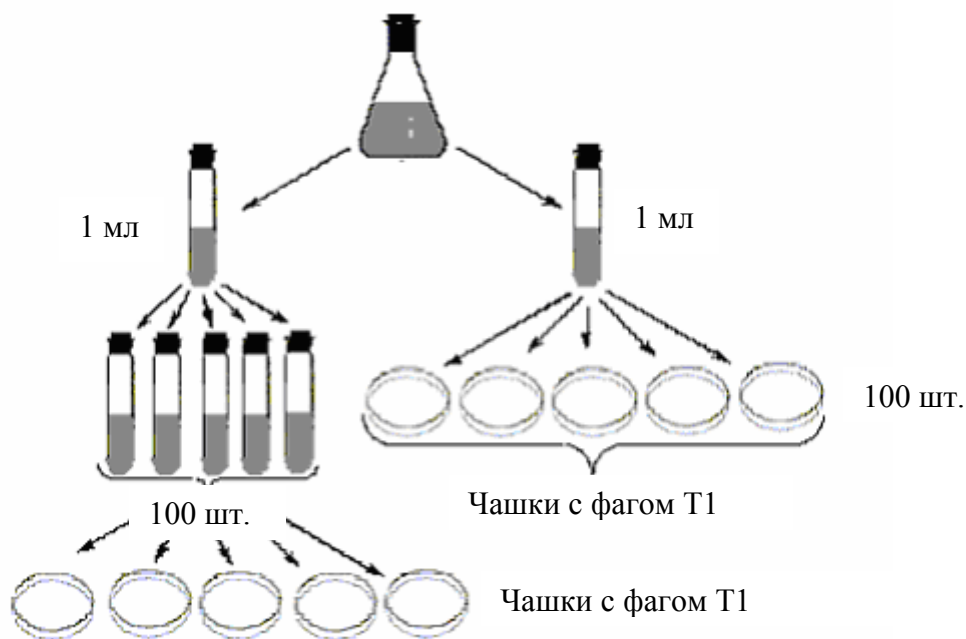


Рис. 54. Флуктуационный тест С.Лурия и М.Дельбрюка

На чашках с фагом T1 могут расти только фагоустойчивые клетки. Принцип флуктуационного теста таков: если устойчивые мутанты возникают при контакте с фагом (изменчивость адаптивная), то каждая культура независимо из какой порции она была взята должна содержать приблизительно одинаковое количество устойчивых клеток. Если устойчивые бактерии возникли спонтанно до обработки фагом, то результаты анализа независимых культур (100 штук) будут отличаться от результатов, полученных при анализе образцов, из одной и той же культуры.

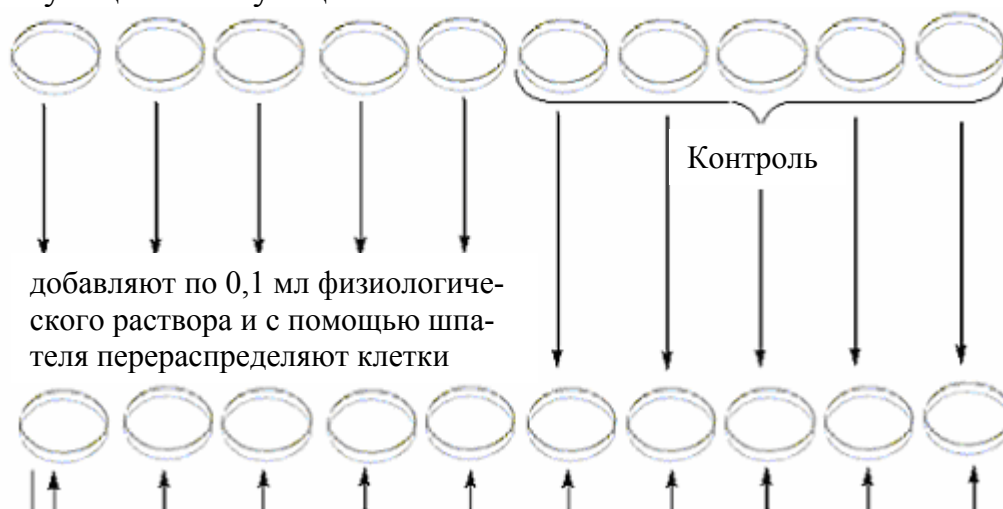
Многочисленные опыты свидетельствуют о том, что независимые культуры действительно обнаруживают значительно более резкие колебания (флуктуации) в содержании устойчивых клеток (0, 103, 62, 3, 159 и т.д.), чем пробы, взятые из одной и той же культуры (142, 140, 155, 146, 110 и т.д.). Эти данные подтверждают гипотезу спонтанной мутации.

В 1949 году ученый Г.Ньюкомб поставил новый эксперимент также с фагом T1 и бактериями *E.coli*, который в последствии получил название перераспределительного теста. Ньюкомб Г. заседал ряд чашек Петри с питательной средой культурой *E.coli*, чувствительной к фагу T1. Заседал так, чтобы был сплошной рост. Засеянные чашки инкубировал при оптимальных условиях (37 °C) в течение 5 часов. За это время из отдельных клеток сформировались микроколонии. После этого в половину чашек Петри вносил по 0,1 мл физиологического раствора и с помощью микробиологического шпателя перераспределял клетки на поверхности среды. Остальные чашки оставались нетронутыми (контроль). На все чашки с помощью пульверизатора Г.Ньюкомб наносил суспензию фага T1. Чашки повторно помещал в термостат. После инкубирования подсчитывал число колоний, развившихся из выживших устойчивых клеток.

Принцип теста: если устойчивые клетки возникли благодаря спонтанной мутации до контакта с фагом, то на чашках, где бактерии были перераспределены, должно быть больше устойчивых колоний, чем на контрольных чашках, так как каждая клетка из микроколонии устойчивых бактерий после перераспределения сформирует колонию устойчивую к фагу T1 (рис. 55).

Именно это и было обнаружено в опыте. Таким образом, из данных, полученных Г.Ньюкомбом следует, что фагоустойчивые мутанты возникли до обработки фагом в результате спонтанной мутации. Фаг в данном опыте действует лишь как селективный агент, позволяющий

выявить очень небольшое количество фагоустойчивых мутантов, присутствующих в популяции.



добавляют по 0,1 мл физиологического раствора и с помощью шпателя перераспределяют клетки

Контроль

наносят по 0,1 мл фага T1

инкубируют и подсчитывают количество колоний устойчивых к фагу T1

Рис. 55. Перераспределительный тест Г.Ньюкомба

Таким образом, флуктуационный и перераспределительный тесты доказывают, что мутации у микроорганизмов возникают ненаправленно, до воздействия селектирующего агента (фага T1).

В 1952 году супруги Е. и Дж. Ледерберг предложили не прямой отбор мутантов методом реплик или отпечатков. Этот метод осуществляется при помощи стерильных кусочков бархата с коротким, жестким и густым ворсом. Бархат помещают на столик для реплик (деревянный или металлический цилиндр) и плотно закрепляют металлическим кольцом, так чтобы поверхность была без морщин. Чашки Петри с питательной средой, на которой сформировались колонии микроорганизмов, накладывают поверхностью среды на бархат и слегка прижимают. Чашку осторожно снимают. Ткань с отпечатками колоний после этого может служить исходным штампом для засева методом реплик других чашек со средой. С одного штампа можно снять отпечаток на серию чашек, содержащих различные агаризованные среды.

Ледерберги проделали следующий опыт. Выращивали чистую культуру фагочувствительных бактерий *E.coli* в бульоне без фага, до концентрации $1 \cdot 10^8$ кл/мл. Высеивали ее на поверхность питательной среды в чашке Петри для образования сплошного роста. После того как бактерии выросли, т.е. сформировался сплошной газон на чашке, при помощи метода реплик, был произведен пересев бактерий парал-

лельно на две чашки – одна с обычной средой; другая предварительно засеянная фагом. Чашки помещали в термостат для инкубирования бактерий. На чашке, засеянной фагом, сформировались отдельные фагоустойчивые колонии. Затем чашки 1 и 2 совмещались и из чашки с обычным агаром производили пересев в бульон участка, соответствующего ареалу фагоустойчивых колоний в чашке с фагом. Размножившиеся клетки распределяли по питательной среде в новой чашке и после инкубации переносили с помощью стерильного бархатного штампа в две чашки (с обычной средой и со средой, засеянной фагом) (рис. 56).

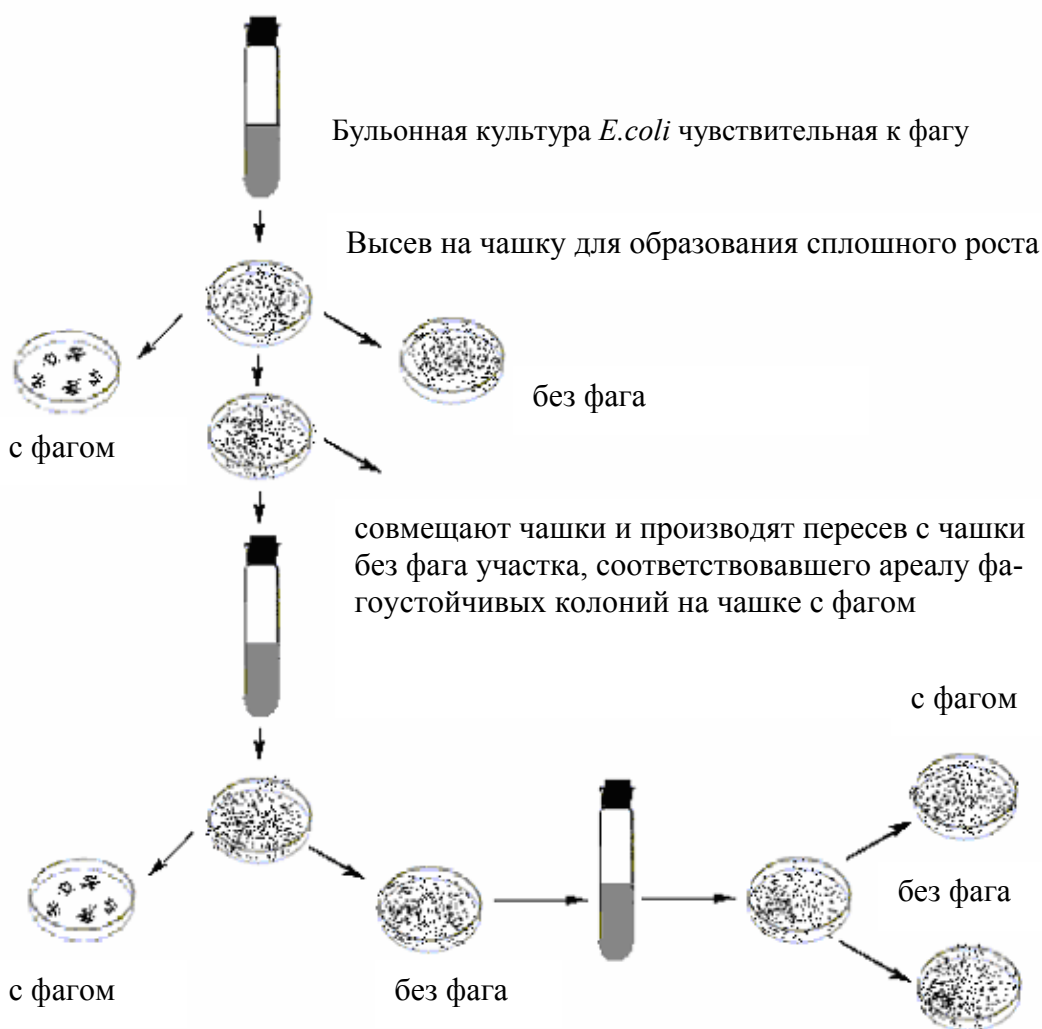


Рис. 56. Непрямой отбор мутантов методом реплик

Такую процедуру повторяли много раз, и в конце концов была получена суспензия фагоустойчивых мутантов, никогда не имевших контакта с фагом. Этот эксперимент также доказывает мутационную природу изменчивости у бактерий.

Мутационная изменчивость относится к генотипической или наследственной изменчивости, т.к. при этом возникают изменения в генетическом аппарате бактерий, которые передаются по наследству.

Кроме генотипической или мутационной изменчивости существует модификационная изменчивость, которая возникает в ответ на изменение условий окружающей среды и наблюдается до тех пор, пока действует фактор, вызывающий эти изменения. Модификационная изменчивость – это изменения на уровне фенотипа, не затрагивающие генотип. Поэтому ее называют еще фенотипической изменчивостью. Фенотипическая изменчивость проявляется у подавляющего большинства особей в популяции, в то время как при мутационной изменчивости происходит изменение генотипа только у единичных клеток.

Существует несколько типов модификационных изменений. Наиболее известны адаптивные модификации, т.е. ненаследственные изменения, полезные для организма и способствующие его выживанию в изменившихся условиях. Примером адаптивной модификации может служить адаптация клеток бактерий *E.coli* к лактозе как новому субстрату. В этих условиях начинают синтезироваться индуцибельные ферменты, т.е. происходит фенотипическое проявление генов «молчащих» в условиях отсутствия лактозы в среде.

У ряда бактерий обнаружена универсальная адаптивная реакция в ответ на различные стрессовые воздействия (высокие и низкие температуры, резкий сдвиг рН и др.). Адаптивная реакция в данном случае проявляется в интенсивном синтезе небольшой группы сходных белков. Эти белки получили название белков теплового шока, а само явление получило название синдром теплового шока. При стрессовых воздействиях на бактериальную клетку в ней ингибируется синтез обычных белков, но индуцируется синтез небольшой группы белков, функция которых заключается в противодействии стрессовому воздействию путем защиты важнейших клеточных структур, в первую очередь нуклеоида и мембран.

Таким образом, адаптивные модификации расширяют возможности организма к выживанию и размножению в более широком диапазоне условий внешней среды.

Но не все модификации обязательно адаптивны. При интенсивном действии многих агентов наблюдаются ненаследуемые изменения, случайные по отношению к вызвавшему их воздействию. Причины появления таких фенотипически измененных клеток связаны с ошибками процесса трансляции, вызванными этими агентами.

Возникающие модификации могут быть относительно стабильными или, наоборот, очень лабильными. Иногда они могут сохраняться в течение нескольких поколений.

7.2. Классификация бактериальных мутаций. Молекулярные механизмы мутационного процесса. Мутагенные факторы

Мутация – изменения, возникающие в генетическом аппарате и передающиеся по наследству.

Мутации бывают спонтанные и индуцированные. Мутации, возникающие в популяции бактерий без экспериментального вмешательства называют спонтанными. Как правило, спонтанные мутации можно объяснить случайными ошибками при репликации ДНК. Например, тимин, который обычно спаривается с аденином, может перейти в енольную форму и образовать водородные связи с гуанином. В результате в новой молекуле ДНК на том месте, где раньше находилась пара Т-А, появляется пара Г-Ц. Возникают такие мутации довольно редко. В среднем частота спонтанных мутаций составляет $10^{-4} - 10^{-10}$, т.е. измененной оказывается одна клетка на $10^4 - 10^{10}$ клеток.

Индукцированная мутация возникает с помощью воздействия тех или иных факторов – мутагенных агентов, которые существенно повышают частоту мутаций. Мутагенами могут быть химические, физические и биологические агенты. К ним относятся УФ-лучи, ионизирующие излучения, азотистая кислота, нитрозогуанидин, аналоги азотистых оснований, некоторые антибиотики, акридиновые красители, сернистый иприт, транспозоны, IS-элементы, бактериофаг μ i и др.

Все мутагены действуют на генетический аппарат бактерий, т.е. на ДНК. Мутагенные агенты не характеризуются специфичностью, т.е. нельзя используя какой-то мутаген выделить только определенный тип мутаций. Мутагены способны только повышать частоту мутаций.

Мутации по фенотипическим последствиям подразделяют на прямые и обратные или реверсии.

Мутации, приводящие к утрате или изменению какой-то функции клетки, относятся к классу прямых мутаций, так как они вызывают появление ненормального фенотипа, который отличается от дикого типа. Другими словами прямые мутации это мутации от дикого типа к мутантному. Например, бактерии *E.coli* способны сбраживать лактозу (Lac⁺ - фенотип) и поэтому мутация Lac⁺ → Lac⁻ будет прямой.

В результате обратной мутации восстанавливается у мутантного организма дикий фенотип:

$Lac^- \rightarrow Lac^+$ – обратная мутация или реверсия.

Обратные мутации бывают истинными (истинные реверсии) и вторичными. Об истинных обратных мутациях говорят лишь в тех случаях, когда вторая мутация восстанавливает исходный генотип, т.е. когда измененный при первой мутации триплет нуклеотидов будет вновь кодировать ту же аминокислоту, что и раньше. Например, если пара Т-А заменена парой Г-Ц, другая мутация, восстановившая пару Т-А, восстановит и последовательность дикого типа. Однако эффект первой мутации может быть компенсирован мутацией в другой части гена. Такие мутации называют вторичными реверсиями. Иногда возникают также мутации в других соседних генах, которые помогают каким-то образом обойти эффект первой мутации. Их называют супрессорными мутациями. Супрессорные мутации восстанавливают у мутанта только дикий фенотип, не восстанавливая первоначального состояния самого мутантного гена.

По фенотипическим проявлениям (характер измененного признака) мутации подразделяют на:

1) морфологические мутации – когда в результате мутации изменяется какой-то морфологический признак (капсульные \rightarrow бескапсульные, утрата жгутиков, изменение морфологии колоний и др.);

2) биохимические мутации:

- ауксотрофные мутанты (нуждающиеся в дополнительных факторах роста);

- мутанты, устойчивые к ингибиторам, антибиотикам, бактериоцинам, ядам или бактериофагам;

- мутанты, чувствительные к температуре (условно-летальные);

- мутанты, не способные использовать определенный субстрат ($Lac^+ \rightarrow Lac^-$) или иначе с измененной способностью к сбраживанию;

- мутанты с конститутивным синтезом катаболических ферментов (т.е. с нарушенной регуляцией);

- мутанты с конститутивным синтезом анаболических ферментов;

- мутанты по вирулентности;

- мутанты с измененными антигенными свойствами.

В отношении изменений генетической структуры (изменений в первичной структуре ДНК) различают следующие типы мутаций: делеции, точковые мутации, мутации со сдвигом рамки.

Делеция – выпадение участка ДНК, т.е. эта мутация захватывает группу смежных генов. Такие мутации необратимы и получить ревертанты невозможно.

Точковая мутация – мутация, затрагивающая только одну пару оснований, т.е. одна пара оснований заменяется на другую. Например, вместо А - Т может быть Г - Ц или наоборот. Для точковых мутаций характерна высокая частота реверсии. Точковые мутации могут быть двух типов:

- транзиции – замена пурина на другой пурин или пиримидина на другой пиримидин (простая замена). Например, пара Г - Ц может быть заменена на А - Т или наоборот. Это наиболее часто встречающийся класс точковых мутаций.

- трансверсии – замена пурина пиримидином и наоборот (сложная замена), т.е. пара А - Т превращается в Г - А или Г - Ц.

Мутации с заменой оснований часто оказываются миссенс-мутациями (мутациями с изменением смысла), в которых последовательности кодирующего триплета оснований после замены кодирует уже другую аминокислоту. Значительная часть мутаций с заменой оснований представляет собой нонсенс-мутации (бессмысленные мутации), характеризующиеся тем, что кодирующий какую-либо аминокислоту триплет превращается в триплет, не кодирующий никакой аминокислоты.

Под влиянием некоторых мутагенов могут происходить вставки или выпадения оснований. Такие мутации называются **мутациями со сдвигом рамки считывания**. Если в молекулу ДНК при репликации включается или утрачивается из нее основание, то это приводит к сдвигу рамки при считывании закодированной информации и как следствие – изменение последовательности аминокислот в белке мутантного штамма. Ревертанты в данном случае получить трудно.

Рассмотрим механизмы действия некоторых мутагенов:

Азотистая кислота (HNO_2) дезаминирует (отщепляет NH_2 и замещает другой группой) аденин, гуанин или цитозин, что приводит к ошибкам при репликации ДНК. В частности в результате замещения аминогруппы гидроксильной группой аденин превращается в гипоксантин, который похож на гуанин. При репликации ДНК гипоксантин спаривается с цитозином вместо тимина, что приводит к мутации АТ – ЦГ. Таким образом, происходит простая замена оснований или транзиция. Если HNO_2 взаимодействует с цитозином, то он дезаминирует-

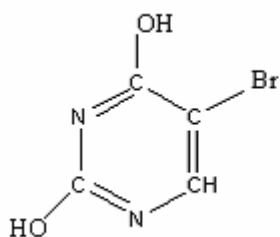
ся в урацил и при репликации образует пару с аденином вместо гуанина, и это ведет к мутации ГЦ – АТ (транзиция).

Гидроксиламин вступает в реакцию главным образом с цитозинном и изменяет его так, что тот при репликации спаривается с аденином вместо гуанина. Происходит мутация ЦГ – АТ (транзиция).

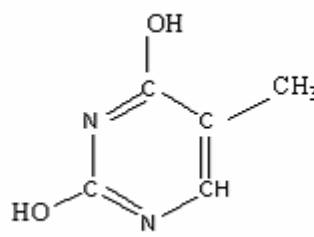
Аналоги азотистых оснований или антиметаболиты очень сходны по строению с нормальными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями и поглощаясь клетками включаются в ДНК. В молекуле ДНК они могут находится в двух таутомерных формах (за счет перераспределения в их структуре электронов и протонов) – обычной кето-, или аминокетформе, и реже встречающейся енольной, или иминоформе. Переход в другую таутомерную форму может привести к неправильному образованию пар во время репликации ДНК, возникает ошибка репликации.

Чаще всего для выделения мутантов используют 5-бром урацил и 2-аминопурин.

5-бром урацил представляет собой соединение, сходное по строению с тиминном:



5-бром урацил



тимин (5-метилурацил)

Поэтому он может включаться вместо тимина в цепь ДНК как партнер аденина.

| | | | |
|---|---|----|---|
| 1 | А | БУ | 2 |
| | А | Т | |
| | Г | Ц | |
| | Г | Ц | |
| | Т | А | |
| | А | БУ | |

1 – родительская цепь,

2 – дочерняя цепь (после репликации).

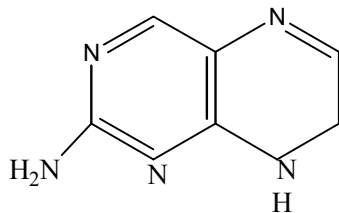
При переходе 5-бром урацила в енольную форму (БУ*) он спаривается при репликации ДНК как цитозин, т.е. вызывает включение гуанина вместо аденина.

| | |
|-----|---|
| БУ | А |
| Т | А |
| Ц | Г |
| Ц | Г |
| А | Т |
| БУ* | Г |

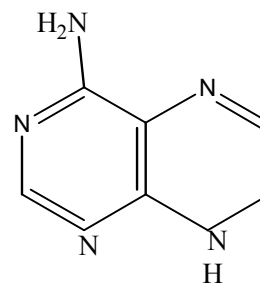
После третьей репликации получается вместо пары АТ пара ГЦ (транзигция АТ – ГЦ)

| | |
|---|---|
| А | Т |
| А | Т |
| Г | Ц |
| Г | Ц |
| Т | А |
| Г | Ц |

2-аминопурин по структуре напоминает аденин. Поэтому он может замещать аденин в молекуле ДНК. Как и аденин, 2-аминопурин обычно спаривается с тиминном, но при переходе в енольную форму может соединяться с цитозинном, что приводит к изменению пар оснований в потомстве.



2-аминопурин



аденин (6-аминопурин)

Алкилирующие агенты – нитрозогуанидин, диэтилсульфат, метилметансульфат, этилметансульфонат, сернистый иприт и др. – принадлежат к наиболее эффективным мутагенам. Они модифицируют (алкилируют) в репликативной вилке преимущественно пуриновые основания, в первую очередь гуанин, вызывая его спаривание с тиминном, вместо цитозина. Возникают главным образом транзигции типа ГЦ – ТА.

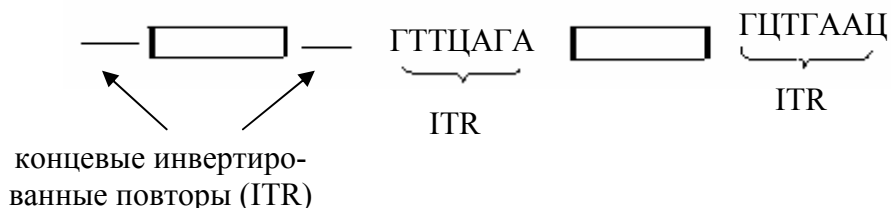
Акридиновые красители (акридиновый оранжевый, акрифлавин, трипофлавин). Молекулы акридиновых красителей внедряются между соседними азотистыми основаниями в цепи ДНК и увеличивают расстояние между ними. Такое пространственное изменение при репликации ДНК может вызывать ошибки двух типов – утрату нуклеотида или включение дополнительной пары нуклеотидов. Мутации этого

типа приводят к очень серьезным последствиям так как при этом нарушается порядок считывания белка: начиная с места утраты или включения нуклеотида, информация считывается в «неправильных» триплетах (мутация «со сдвигом рамки»).

УФ-лучи поражают тиминовые основания, образуются димеры тимина в ДНК. Наличие таких димеров тимина служит источником ошибок при репликации ДНК. УФ-лучи вызывают транзиции, трансверсии и делеции.

Перемещающиеся (мобильные, мигрирующие) генетические элементы бактерий – это дискретные сегменты ДНК, способные к самостоятельному перемещению из одного участка в другой в пределах репликона, а также к перемещению из одного репликона (хромосомного, плазмидного или фагового) в другой. К таким элементам относятся простые вставочные последовательности (IS-элементы), транспозоны (Tn-элементы) и фаги-транспозоны (μ, ДЗ112 и др.). Интеграция их в репликоны осуществляется независимо от системы общей рекомбинации клеток, которая требует гомологии у рекомбинирующих структур.

IS-элементы – представляют собой линейные фрагменты двухцепочечной ДНК длиной от 200 до 2000 п.о. Они содержат в своем составе только гены, кодирующие синтез фермента транспозазы, необходимого для их перемещения или транспозиции. По концам IS-элементов расположены инвертированные повторы (ITR) (инвертированный – перевернутый. Расположение нуклеотидов на разных концах перевернутое или противоположно ориентированное). У разных IS-элементов длина концевых повторов варьирует от 8 до 40 п.о. Инвертированные повторы также принимают участие в транспозиции. Схематично строение IS-элемента можно изобразить следующим образом:



Различают несколько типов IS-элементов: IS1, IS2, IS3, IS4 и др. Они отличаются друг от друга своей длиной (количеством пар оснований) и различиями в концевых повторах ITR.

IS-элементы являются нормальными компонентами бактериальных хромосом и плазмид. В разных репликонах может содержаться раз-

личное число копий IS-элементов. Например, в F-факторе, который отвечает за донорные свойства бактерий, имеется одна копия IS2- и 2 копии IS3- элементов.

IS-элементы могут перемещаться из одного участка генома в другой, в частности из бактериальной хромосомы в плазмиду и обратно, от плазмиды к плазмиде; таким образом они могут включаться в различные участки генома. При перемещениях они могут встраиваться в пределах одного гена и инактивируют его или изменяют его регуляцию.

Транспозоны – сложные перемещающиеся элементы. От IS-элементов они отличаются тем, что кроме генов, ответственных за транспозицию, содержат структурные гены, определяющие функции, не имеющие отношение к процессу транспозиции, т.е. отвечающие за какой-то фенотип. Транспозоны могут контролировать резистентность к антибиотикам и ионам тяжелых металлов, способность к катаболизму лактозы, раффинозы или толуола, синтез энтеротоксина (табл. 8). В связи с этим их легче обнаружить, чем IS-элементы. Длина транспозонов свыше 2000 п.н. Транспозоны как и IS-элементы имеют концевые повторы (ITR). Часто ими служат IS-элементы. Поскольку IS-элементы сами заканчиваются ITR, то любой транспозон всегда имеет на концах инвертированные повторы.

Таблица 8

Фенотипические признаки, детерминируемые некоторыми транспозонами

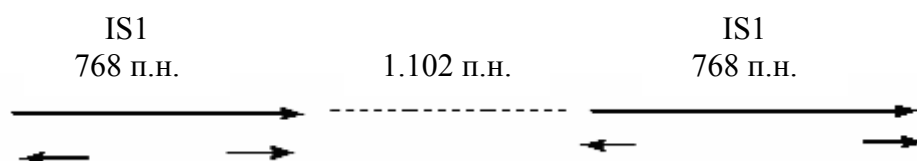
| Транспозон | Контролируемое свойство |
|------------------|-------------------------|
| Tn 1, Tn 2, Tn 3 | Ap |
| Tn 4 | Ap, Sm, Su, Hg |
| Tn 5 | Km |
| Tn 6 | Km, Nm |
| Tn 7 | Tr, Sm |
| Tn 9 | Sm |
| Tn 10 | Tc |
| Tn 501 | Hg |
| Tn 903 | Km |
| Tn 951 | Lac |
| Tn 1681 | Ent |
| Tn 1699 | Gm, Km, Cb, Ap |

Примечание: Ap – устойчивость к ампициллину, Sm – устойчивость к стрептомицину, Su – устойчивость к сульфаниламидам, Hg – устойчивость к ионам ртути, Km – устойчивость к канамицину, Nm – устойчивость к неомицину, Tr – устойчивость к триметоприму, Sm – устойчивость к хлорамфениколу, Tc – устой-

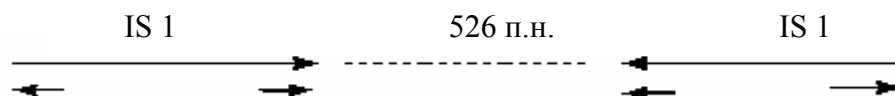
чивость к тетрациклину, Lac – сбраживание лактозы, Ent – синтез энтеротоксина, Gm – устойчивость к гентамицину, Cb – устойчивость к карбенициллину.

В зависимости от того, чем ограничен на концах транспозон можно выделить несколько групп транспозонов:

1. Транспозоны, фланкированные (ограниченные) двумя IS1-элементами. Такие транспозоны подразделяют на 2 подгруппы: а) IS1-элементы на концах транспозона находятся в прямой ориентации. Поскольку каждый IS1-элемент в свою очередь ограничен короткими инвертированными последовательностями (ITR), то на концах целого транспозона оказываются противоположно ориентированные ITR-повторы. Так построен транспозон Tn 9:



б) IS1-элементы находятся на концах транспозона в противоположной ориентации. Представителем этой группы является Tn 1681:



2. Транспозоны, фланкированные другими IS-элементами в прямой ориентации. Примером таких транспозонов является Tn 2680.

3. Транспозоны, фланкированные длинными инвертированными повторами не идентичными известным IS-элементам. К этой группе относится Tn 5.

Транспозоны различают по степени специфичности при выборе мест интегрирования в репликоны. Различают высокую, региональную, среднюю, низкую специфичность. При высокой специфичности транспозон интегрируется только в один или несколько сайтов. Таким является транспозон Tn7. При региональной специфичности транспозон интегрируется преимущественно в некоторые районы, внутри которых интеграция происходит в многочисленные сайты. Это характерно для транспозона Tn1. Когда вставки транспозона осуществляются во многие участки, но имеются предпочтительные сайты, говорят о средней специфичности (Tn 9 и Tn 10). При низкой специфичности почти каждый акт транспозиции осуществляется в новый сайт (Tn5). Однако, следует отметить, что специфичность транспозиции

одного и того же транспозона для разных репликонов может быть различной.

Транспозоны и IS-элементы перемещаются с частотой $10^{-4} - 10^{-7}$ на одно деление бактериальной клетки. Частота транспозиций для одного и того же транспозона может зависеть от характера донорного (того где есть транспозон) и реципиентного репликонов, а также от генома клетки-хозяина. Кроме того, на перемещение транспозонов могут влиять факторы внешней среды (температура, УФ-лучи, химические соединения и др.).

Механизмы перемещения транспозонов окончательно не выявлены. Показано, что перемещение транспозона Tn3 осуществляется в две стадии. Во время первой стадии происходит слияние молекул донорной и реципиентной ДНК, сопровождающееся репликацией транспозона. Образуется коинтеграт, содержащий копии транспозона в местах слияния двух репликонов. Во время второй стадии репликоны разделяются (происходит разрешение коинтеграта) благодаря сайт-специфической рекомбинации между идентичными участками двух транспозонов Tn3, расположенных в коинтеграте (рис. 57). Участки, в которых происходит рекомбинация Tn3 названы от «*internal resolution site*» – *IRS*, *res* или *tnp S*.

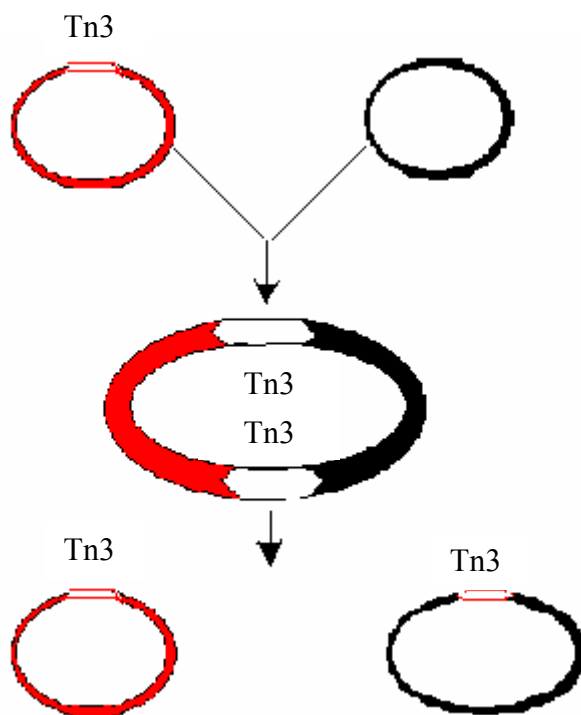
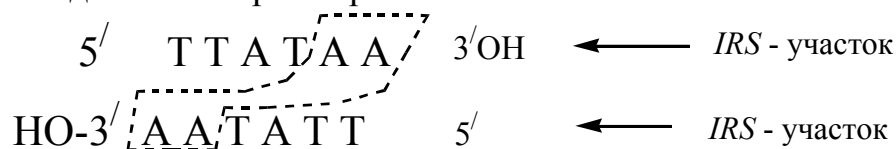


Рис. 57. Схема репликативной транспозиции.

Для осуществления первой стадии перемещения необходим фермент транспозаза (продукт гена *tnpA*) и два концевых инвертированных повтора (ITR). Мутации, которые делетируют ITR, нарушают транспозицию. По-видимому, транспозаза распознает ITR-участки и специфически взаимодействует с ними в процессе транспозиции, а именно делает разрывы на концах транспозона. Кроме того, она катализирует ступенчатые двунитевые разрывы с «липкими» концами в реципиентной молекуле ДНК – молекуле, в которую встраивается транспозон. А затем фермент транспозона осуществляет соединение концов транспозона с «липкими» концами разрыва реципиентной ДНК.

Белок, осуществляющий разделение коинтеграта (*resolution*), т.е. сайт-специфическую рекомбинацию в *IRS* или *res* сайтах, был назван резолвазой или TnpR-белком. Синтез этого белка кодируется геном *tnpR*. В опытах *in vitro* показано, что Tnp R-белок, «ступенчато» разрезая ДНК в *IRS*-участках, ковалентно связывается с 5'-концами разрыва, оставляя свободными 3'-ОН-группы. После этого происходит обмен концами одного и второго транспозона.



Имеются данные о том, что некоторые IS-элементы (например IS1) также кодируют ферменты, имеющие нуклеазную активность и участвующие в разрешении коинтегратов. Вместе с тем, коинтеграты, образующиеся при транспозиции других перемещающихся элементов, могут диссоциировать только в клетках *Rec A⁺* и стабильны в клетках *Rec A⁻*, т.е. разрешение их осуществляется при участии системы гомологичной рекомбинации.

Описанный механизм перемещения транспозонов называется репликативной транспозицией. Наряду с ним существует способ транспозиции, предполагающий выщепление (эксцизию) перемещаемого элемента из молекулы донора и внедрение его (инсерцию) в молекулу реципиента. Этот механизм получил наименование консервативной транспозиции. Она осуществляется также при участии сайт-специфической рекомбинации, однако здесь репликация транспозона необязательна.

Значение транспозонов и IS-элементов определяется тем, что они:

1). Способны индуцировать мутации. Включаясь в разные участки генома они могут нарушать нуклеотидную последовательность гена,

могут вызывать делеции, инверсии (противоположное направление нуклеотидов в триплете. Например, АТТ – ТТА). В результате может синтезироваться функционально неполноценный белок или же он вообще не синтезируется. Возникает, так называемый, инсерционный мутант. Мутации, вызываемые интеграцией транспозонов или IS-элементов, сильно полярны (противоположны дикому типу) и ревертируют чрезвычайно редко.

Интеграция IS-элементов и транспозонов может привести и к противоположному эффекту – к экспрессии соседнего «молчащего» гена. Это свойство впервые было обнаружено у IS2-элемента, интегрированного в начало *gal*-оперона. В прямом положении IS2-элемент инактивирует данный оперон, а в инвертированном может заменить отсутствующий промотор и способствовать экспрессии структурных генов *gal*-оперона. Следовательно, многие транспозоны и IS-элементы являются носителями «блуждающих» промоторов.

2). Участвуют в слиянии и диссоциации репликонов (например, в объединении трансмиссивных и нетрансмиссивных плазмид, в интеграции плазмид в хромосому и т.д.).

3). Вместе с плазмидами и фагами переносят гены между различными видами бактерий, иногда весьма отдаленными, и, следовательно, играют важную роль в эволюции микроорганизмов.

4). Используются в генетической инженерии *in vivo*.

5). На их основе существенно ускоряется разработка частной генетики бактерий, имеющих важное промышленное значение.

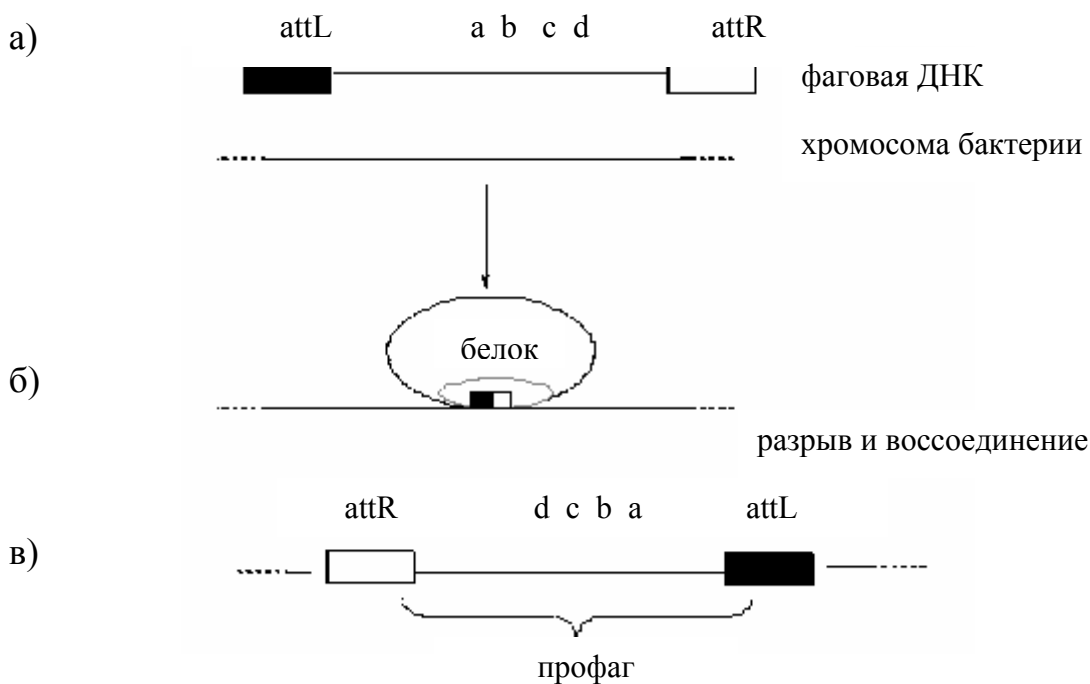
Бактериофаг μ относится к умеренным бактериофагам. Характерной особенностью бактериофага μ является его мутагенность, отсюда и название его μ (*mutator*). Этот бактериофаг был впервые обнаружен у бактерий *E.coli*, но он размножается также на *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Salmonella* и др. Он причисляется к перемещающимся генетическим элементам, так как во многих отношениях сходен с IS-элементами и транспозонами и отличается по существу только тем, что может формировать вирусные частицы. Сходство с IS-элементами и транспозонами в первую очередь выражается тем, что геном фага μ (линейная двуспиральная ДНК – 38 т.п.о.) также имеет на концах инвертированные повторы, но только всего из двух нуклеотидных пар:



Особенностью ДНК фага μ , включенной в вирионы, является то, что на ее концах находятся участки бактериальной ДНК, которые захватываются при индукции профага и упаковываются вместе с фаговой ДНК в головку фага.

Как и другие умеренные фаги, фаг μ при заражении бактерий может развиваться литически с образованием 50–100 частиц на клетку, которая при этом погибает, или же может интегрироваться в хромосому с образованием лизогенной клетки, содержащей профаг. Интегрироваться фаг μ может в разные места бактериальной хромосомы, вызывая мутации всевозможных генов. «Горячих» участков включения фага μ в ДНК бактерий не обнаружено. К интеграции фага μ не применим Кемпбелловский механизм, которым объясняется интеграция фага λ в хромосому *E.coli*. В данном случае не обнаружено образования ковалентнозамкнутых колец из линейной ДНК фага μ , как предварительной стадии интеграции. Электронномикроскопические наблюдения показали, что геном μ образует кольцо лишь в момент прикрепления обоих своих концов к одной точке бактериальной ДНК. Эти концы названы μ -attL и μ -attR. Концы μ -attL и μ -attR соединяются не ковалентно, а удерживаются рядом на одной точке бактериальной ДНК белками.

Схему интеграции генома фага μ в бактериальную хромосому можно представить следующим образом:



Следует отметить, что фрагменты бактериальной хромосомы, которыми фланкирована вирионная ДНК, в реципиентную хромосому не встраиваются при интеграции ДНК фага μ . Они элиминируются нуклеазами бактериальной клетки.

Под воздействием различных факторов происходит индукция. При индукции ДНК фага μ не вырезается, как у фага λ , из бактериальной хромосомы. ДНК фага μ реплицируется в интегрированном состоянии, не покидая хозяйскую ДНК, а образующиеся при репликации копии ДНК фага μ , передаются в другие участки генома клетки бактерий.

Таким образом, μ - ДНК непрерывно связана с геномом хозяина в течение всех раундов репликации и транспозиции как во время литического цикла после индукции профага, так и заражения клеток извне. В этом отношении фаг μ не отличается от других перемещающихся генетических элементов бактерий, но принципиально отличается от остальных умеренных фагов, вырезающихся при индукции и размножающихся вне связи с хозяйской хромосомой. После заражения вирионами геном фага μ , прежде всего, интегрируется, а затем уже в таком виде реплицируется, тогда, как другие умеренные фаги могут размножаться без предварительной интеграции.

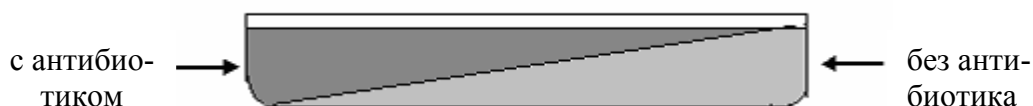
7.3. Методы выделения мутантов бактерий

Мы уже отмечали, что частота спонтанных мутаций для многих признаков бактерий очень мала. Для того, чтобы выявить мутантные клетки необходимо обследовать или проверить от 10000 до 10 млрд. клеток. Повысить частоту мутаций можно с помощью мутагенных факторов или мутагенов. Однако возникновение мутаций, даже в том случае, когда их вызывают сильными мутагенами, – относительно редкое событие и выделить или отобрать мутант, присутствующий на обильном фоне немутировавших клеток, нелегко. Все методы отбора мутантов подразделяются на 2 группы: **методы прямого отбора** и **методы непрямого отбора**. Методы прямого отбора преследуют высеив популяции бактерий на соответствующую среду, содержащую тот или иной агент. Прямым отбором можно выявить мутанты, устойчивые к различным антибиотикам, бактериофагам или химическим ингибиторам, т. е. к агентам, обладающим в норме бактерицидным или бактериостатическим действием по отношению к немутировавшим родительским формам. Прямым отбором могут быть выделены также мутанты, способные к утилизации нетрадиционных источников угле-

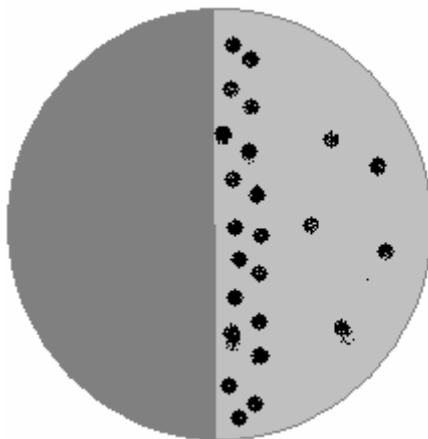
рода или азота. Благодаря высокой разрешающей способности прямого отбора (т.е. способности выявлять немногочисленные мутантные клетки на обильном фоне немутировавших клеток) при его использовании обычно не возникает необходимости в каких-либо приемах по обогащению культуры мутантами. Одна из основных трудностей при прямом отборе состоит в выборе оптимальной концентрации селективного агента. Например, при отборе мутантов, устойчивых к различным антибиотикам, важно подобрать такую концентрацию антибиотика, которая полностью блокировала бы рост бактерий дикого типа, но в то же время позволяла бы развиваться устойчивым мутантам. Определение оптимальной концентрации методом проб и ошибок может потребовать много времени и сил. Поэтому существуют более эффективные методы селекции таких мутантов. Одним из них является селекция мутантов на твердой питательной среде с градиентом концентрации антибиотика (или другого какого-то ингибитора). Среды с градиентом антибиотика готовят следующим образом: питательную агаризованную среду заливают в наклоненную чашку Петри;



как только она затвердеет, чашку устанавливают горизонтально и по верх первого слоя наносят слой среды с антибиотиком в какой-то определенной концентрации

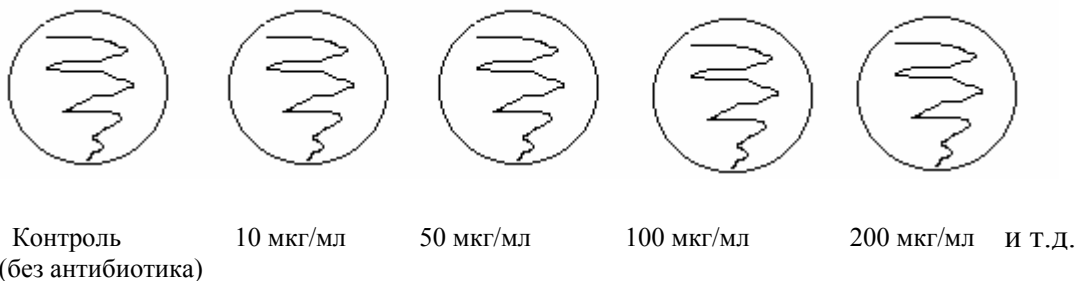


В результате диффузии антибиотика в нижний слой среды его концентрация становится пропорциональной толщине слоя среды, и таким образом устанавливается линейный градиент концентрации. Для того, чтобы выделить устойчивые мутанты, бактериальную суспензию (в концентрации приблизительно $1 \cdot 10^{10}$ клеток/мл) высевают на верхний слой среды. Чашки ставят в термостат при оптимальной температуре. Образующаяся на чашке после инкубации зона сплошного роста распространяется вплоть до линии градиента с допустимой, но неизвестной концентрацией антибиотика. Вне этой зоны в местах, содержащих более высокие концентрации ингибитора, можно обнаружить отдельные немногочисленные колонии.



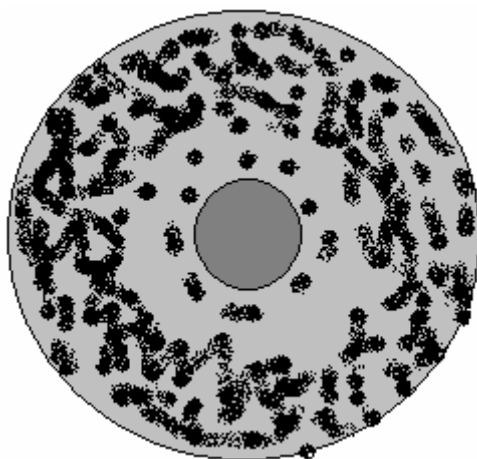
Это клоны устойчивых мутантов; их можно либо повторно высеять штрихом по направлению к областям с более высокой концентрацией антибиотика, либо использовать как исходный материал для посева на других чашках с линейным градиентом концентрации антибиотика, причем в данном случае ингибитор берется в таком количестве, чтобы его концентрация была в два-пять раз выше, чем в первой чашке.

После отбора устойчивых к антибиотику мутантов нужно проверить уровень устойчивости, т.е. определить ту максимальную концентрацию антибиотика, к которой устойчив мутант. Это делают следующим образом: заливают ряд чашек с различными концентрациями антибиотика и засевают отобранный или выделенный мутант:



После инкубации при оптимальной для роста исследуемых бактерий температуре определяют концентрацию антибиотика, при которой еще растут мутантные бактерии.

Кроме селекции устойчивых мутантов на средах с градиентом концентрации ингибитора используют и другие методы. Например, на поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри, засеваемой исследуемыми бактериями, помещают диск фильтровальной бумаги, пропитанной раствором антибиотика или другим каким-то бактерицидным агентом.



Антибиотик диффундирует в среду, концентрация его около диска больше, чем на некотором расстоянии от него. Рост бактерий будет наблюдаться там, где концентрация антибиотика допустима для роста бактерий. Вокруг диска будет зона отсутствия роста бактерий, в которой могут обнаруживаться отдельные колонии устойчивых клонов.

Большинство мутантных типов нельзя выявить методами прямого отбора. В эту группу входят ауксотрофные мутанты, мутанты с изменениями в системе сбраживания углеводов, морфологические мутанты различных типов и другие условно-летальные мутанты. Самым распространенным методом непрямого выявления таких мутантов является: случайный поиск соответствующих колоний и метод перепечатывания колоний с одной чашки на другую (метод отпечатков или реплик). Оба метода требуют проверки большого числа бактериальных колоний. Это утомительная и требующая больших затрат времени процедура. Одним из способов повышения вероятности выявления нужного мутанта является посев бактерий на среды, содержащие индикаторы. Существуют методы, повышающие вероятность выявления нужных мутантов. Например, для выявления мутантов с измененной способностью к сбраживанию углеводов используют среду ЕМВ, в состав которой входит соответствующий углевод и индикатор, состоящий из эозина и метиленового синего. На этой среде колонии бактерий, сбраживающих углеводов, окрашиваются в фиолетовый цвет с металлическим блеском, а колонии бактерий, не сбраживающих углеводов, – в светло-розовый цвет.

Часто для повышения вероятности выделения нужных мутантов используют **пенициллиновый метод обогащения бактерий мутантами**. Этот метод был предложен в 1948 году независимо друг от друга Дж.Ледербергом и Б.Дэвисом для обогащения популяции бактерий

ауксотрофными мутантами. Его можно применять по отношению ко всем видам бактерий, чувствительных к пенициллину. Принцип метода основывается на том, что пенициллин убивает растущие бактерии, но не повреждает бактерии, неспособные к делению, например, те бактерии, которые неспособны к делению в результате отсутствия в среде определенного фактора роста. Если смесь ауксотрофных и прототрофных бактерий инкубировать в минимальной среде, содержащей летальную дозу пенициллина, то прототрофные клетки погибнут как только они начнут делиться, тогда как ауксотрофные мутанты, неспособные расти в этих условиях, выживут, несмотря на присутствие в среде пенициллина. В результате такой обработки доля ауксотрофных клеток в популяции резко увеличивается.

После обогащения популяции бактерий мутантными клетками их необходимо выявить. Для этого суспензию бактерий освобождают от пенициллина путем центрифугирования и отмывания свежей средой или добавлением пенициллиназы, а затем высевают на полноценную питательную среду. Сформировавшиеся колонии методом отпечатков проверяют на способность расти на минимальной среде. Те клоны, которые растут на полноценной среде, но не растут на минимальной, и есть ауксотрофные мутанты.

Если бактерии устойчивы к пенициллину, то с целью обогащения можно применить другие антибиотики (новобиоцин, циклосерин, канамицин, налидиковую кислоту и др.).

С помощью подобных приемов можно обогащать популяцию бактерий не только ауксотрофными мутантами, но и другими типами мутантов. Например, температуроустойчивые мутанты (при этом антибиотик убивает клетки дикого типа, растущие при более высокой температуре), мутанты, неспособные использовать определенный субстрат и др.

7.4. Плазмиды бактерий

Основным и обязательным генетическим элементом бактериальной клетки, как мы установили, является хромосома (или несколько хромосом) – структура способная к самостоятельной репликации. Наряду с хромосомой в бактериальной клетке могут присутствовать плазмиды – стабильно наследуемые внехромосомные генетические элементы.

В большинстве случаев плазмиды бактерий представляют собой двухцепочечные суперскрученные ковалентнозамкнутые кольцевые молекулы ДНК. Благодаря такой структуре они не подвергаются дей-

ствию клеточных нуклеаз. Существуют также линейные плазмиды, на которые нуклеазы не действуют, потому что нити на концах их ДНК защищены специфическими белками. У некоторых плазмид имеется тиломероподобные концы, которые соединяются ковалентно. Ферменты, участвующие в замыкании таких концов плазмид называются тиломеразами.

Размеры плазмид весьма вариабельны. В качестве примера можно отметить, что молекулярная масса одной из самых мелких плазмид, обнаруженных в штаммах бактерий *E.coli*, составляет 1,5 МД. С другой стороны, клетки псевдомонад могут содержать плазмиды, молекулярная масса которых близка к 500 МД, что составляет около 20% от молекулярной массы хромосомы этих бактерий.

Следует отметить, что плазмиды не являются жизненно важными (или абсолютно необходимыми) наследственными структурами бактериальной клетки. Показано, что бактерии можно «излечить» от плазмид с помощью УФ-облучения, митомицина С, акридиновых красителей и других агентов. Жизнеспособность бактерий при этом сохраняется, но у них исчезают признаки, которые детерминируются плазмидными генами.

Рассмотрим общие свойства бактериальных плазмид.

Основным свойством плазмид является **способность к автономной репликации**. Молекулы ДНК приобретают ее в том случае, если в них имеется сайт начала репликации – *ori* и набор генов, необходимых для ее осуществления. Различают плазмиды со строгим и ослабленным контролем репликации. Плазмиды со строгим контролем репликации реплицируются синхронно с удвоением бактериальной хромосомы и, по-видимому, одними и теми же репликативными комплексами, в которых главную роль играет ДНК-полимераза III. Таких плазмид в бактериальной клетке насчитывается от 1 до 3 копий. Строгий контроль репликации характерен для крупных плазмид, молекулярная масса которых превышает 20 МД.

Плазмиды с ослабленным контролем репликации вместо ДНК-полимеразы III используют ДНК-полимеразу I. В каждой бактериальной клетке содержится в среднем 40–50 копий таких плазмид. В связи с этим плазмиды с ослабленным контролем репликации еще называют мультикопийными. Молекулярная масса таких плазмид, как правило, не более 15 – 20 МД.

Вторым важнейшим свойством плазмид является их способность переноситься из клетки в клетку при конъюгации или **трансмиссив-**

ность. По этому свойству плазмиды подразделяют на конъюгативные (или трансмиссивные) и на неконъюгативные (или нетрансмиссивные). Конъюгативные плазмиды способны передаваться из одной клетки в другую, их молекулярная масса обычно превышает 25 МД. Такие плазмиды имеют гены, ответственные за перенос (*tra*-гены), которые объединены в *tra*-опероны. Гены *tra*-оперонов детерминируют: синтез половых пилей, которые необходимы для образования конъюгативных пар; сам перенос ДНК и постконъюгативный синтез ДНК. Следовательно, *tra*-гены придают клетке донорные свойства.

подавляющее большинство конъюгативных плазмид имеет ограниченный круг клеток-хозяев, в которые они могут переносить свою ДНК. Но есть плазмиды с широким кругом клеток-хозяев это **космополитные** или **промискуитетные** плазмиды. Примером таких плазмид является RP4, относящаяся к классу R-плазмид, которая была выделена из псевдомонад. Эта плазида легко переносится в клетки грамотрицательных бактерий, принадлежащих к различным родам: *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Shigella* и др.

Неконъюгативные плазмиды не содержат *tra*-генов, придающих бактериальным клеткам свойства генетических доноров, и поэтому они неспособны самостоятельно передаваться от одних клеток к другим. Неконъюгативные плазмиды – это мелкие плазмиды с молекулярной массой менее 25 МД. Однако неконъюгативные плазмиды могут быть перенесены в реципиентные клетки с помощью конъюгативных плазмид. Перенос неконъюгативных плазмид конъюгативными называется **мобилизацией**. При этом неконъюгативная плазида является мобилизуемой, а конъюгативная – мобилизующей. Мобилизация может осуществляться благодаря наличию в плазмидах IS-элементов и транспозонов, которые способствуют объединению двух плазмид друг с другом, т.е. образованию коинтегратов. Коинтеграты передаются в реципиентную клетку за счёт функционирования *tra*-генов конъюгативной плазмиды. В реципиентных клетках коинтеграты распадаются на два репликона, которые существуют автономно друг от друга.

Многие плазмиды **способны к интеграции в бактериальную хромосому**. Интеграция осуществляется с помощью IS-элементов и транспозонов, которые имеются как в хромосоме, так и в плазмиде. Плазмиды, которые могут находиться как в автономном, так и в интегрированном состоянии по отношению к хромосоме клетки-хозяина,

т.е. иметь двойной «образ жизни», получили название эписом. При интеграции конъюгативной плазмиды в хромосому образуются доноры типа Hfr, способные с высокой частотой передавать хромосомные гены в клетки реципиента.

Еще одним важным свойством плазмид является их **несовместимость**. Родственные плазмиды не могут сосуществовать в одной клетке – они несовместимы. Несовместимость плазмид обуславливается или блокированием репликации ДНК родственной плазмиды или блокированием распределения дочерних молекул ДНК по клеткам. Все плазмиды подразделяются на группы несовместимости. Их число достигает нескольких десятков. Плазмиды, входящие в одну группу несовместимы друг с другом. Несовместимыми могут быть плазмиды как с одним и тем же фенотипическим проявлением (например, F-плазмиды), так и с разным фенотипическим проявлением. Например, в группу несовместимости F1 входят плазмиды типа F, типа Col и типа R.

Конъюгативным плаздам присуще ещё одно свойство – **поверхностное исключение**. Дело в том, что если в клетке уже имеется плазида, контролирующая соответствующий признак, то при конъюгации плазмидная ДНК другой клетки проходит через клеточную стенку с трудом. Частота переноса плазмид при этом падает в 10 – 100 раз по сравнению с таковой в бесплазмидные клетки. Плазмиды, преодолевшие поверхностное исключение, стабильно сосуществуют с плазмидой реципиентной клетки, если они, конечно, совместимы.

Плазмиды придают клеткам различные **фенотипические признаки**:

- 1) устойчивость к антибиотикам, ионам тяжелых металлов, мутгенам (R-плазмиды);
- 2) способность вызывать биodeградацию камфоры, ксилола, нафталина, салицилата, толуола, n-алканов и других не природных соединений (ксенобиотиков). Такие плазмиды получили название плазмид биodeградации или D-плазмид;
- 3) способность синтезировать антибиотики, бактериоцины, пигменты, инсектициды, гемолизины, токсины, фибринолизины, сероводород, поверхностные антигены;
- 4) способность использовать в качестве источника углерода различные углеводы и необычные аминокислоты;
- 5) способность вызывать образование опухолей у растений (Ti-плазмиды);

б) способность конъюгировать с реципиентными штаммами бактерий (придают донорные свойства);

7) способность осуществлять рестрикцию и модификацию ДНК и др.

Однако существует большое количество плазмид, фенотипическое проявление которых неизвестно, такие плазмиды получили название **криптических**.

Рассмотрим на примерах основные фенотипы плазмид.

7.4.1. F-плазида

Плазида F представляет собой конъюгативную эписому клеток *E.coli* K-12 со строгим контролем репликации (рис.58). Размер ее кольцевой ДНК составляет 94,5 т.п.н. Молекулярная масса F-фактора равна $45 \cdot 10^6$ Д. Попадая в F⁻-клетки, эта плазида изменяет их фенотипические свойства. Клетки приобретают половые пили, а также чувствительность к фагам MS2, f₁, f₂, Qβ, становятся донорами ДНК, перестают поддерживать развитие фагов T3 и T7. При конъюгации таких клеток блокируется проникновение в них донорной ДНК (проявляется свойство поверхностного исключения).

За конъюгативные свойства F-плазмиды отвечает *tra*-область, в которую входит 24 гена, сгруппированных в три оперона. За автономную репликацию F-плазмиды отвечают *rep*-гены. За распределение молекул плазмидной ДНК по дочерним клеткам отвечают гены области *par*. Рядом с областью *par* находится ген *pif*, продукт которого исключает развитие в клетке фагов T3 и T7. Структурными компонентами, обеспечивающими интеграцию F-плазмиды в бактериальную хромосому, являются элементы IS2, IS3 и Tn1000, входящие в состав плазмидной ДНК. Они взаимодействуют с аналогичными элементами бактериальной ДНК через сайтспецифическую рекомбинацию и встраиваются в нее в разных местах и направлениях в зависимости от локализации и направления бактериальных элементов. Клетка после интеграции в ее ДНК F-плазмиды приобретает свойства Hfr-клетки, т.е. способна с высокой частотой ориентированно передавать свои гены в реципиенты.

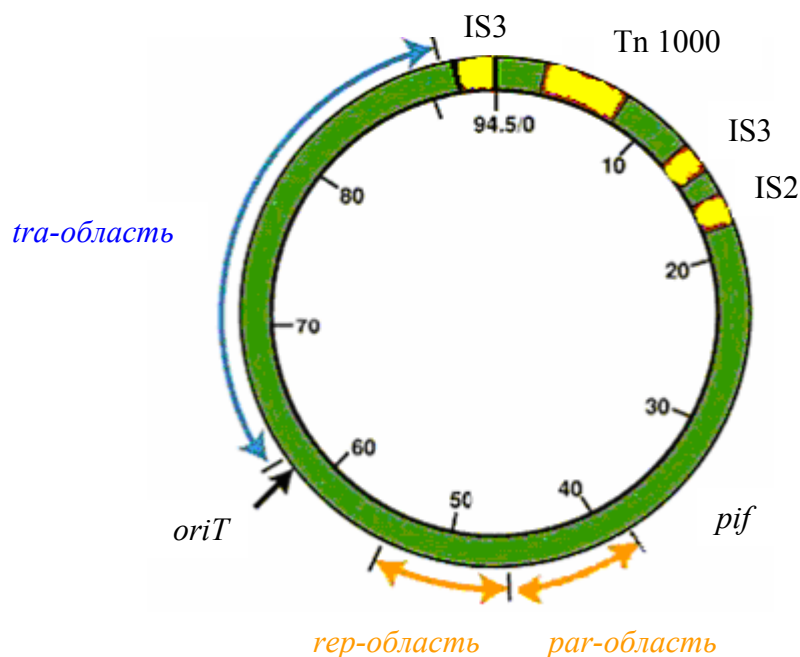


Рис. 58. F-плазмида бактерий *E.coli*

F-плазмида, интегрированная в хромосому, может из нее исключаться. При неправильном исключении F-плазмиды образуется F'-плазмида, т.е. F-плазмида, содержащая в своем составе гены бактериальной хромосомы. Если при вычленении F'-плазмиды из бактериальной хромосомы *tra*-оперон хотя бы частично делегируется, то образовавшаяся F'-плазмида будет неконъюгативной. Для сохранения репликационных свойств F'-плазмида обязательно должна содержать область *rep*.

7.4.2. Плазмиды бактериоциногенности

В 1925 году А.Грация обнаружил колицины – вещества белковой природы, синтезируемые бактериями *E.coli* и обладающие антибактериальным действием в отношении других штаммов *E.coli*. Они характеризовались узким спектром действия, т.е. они действовали только на близкородственные бактерии. Подобные вещества были затем обнаружены и у других бактерий и в 1953 году они все получили название «бактериоцины». В настоящее время способность к синтезу бактериоцинов обнаружена у различных видов, как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Бактериоцины называют в большинстве случаев в соответствии с видовой принадлежностью бактерий-продуцентов: колицины – *Escherichia coli*; марцесцины – *Serratia*

marcescens; флюоцины – *Pseudomonas fluorescens* и т.д. Некоторые авторы используют родовое название бактерии-продуцента: стафилококцины – *Staphylococcus epidermidis*, вибриоцины – *Vibrio comma* и т.д.

Бактериоцины – это вещества белковой природы или белок в комплексе с липополисахаридами. Но в любом случае за антибактериальную активность бактериоцина отвечает белок. Бактериоцины различаются не только по спектру действия, но и по физико-химическим, морфологическим и некоторым другим свойствам. Согласно классификации Д.Бредли (1967) бактериоцины делят на три группы :

1) бактериоцины с низкой молекулярной массой, которые не осаждаются при ультрацентрифугировании, чувствительны к протеолитическому ферменту трипсину, термостабильны и неразличимы в электронном микроскопе;

2) бактериоцины с высокой молекулярной массой, которые легко осаждаются при ультрацентрифугировании, резистентны к трипсину, термолабильны, выявляются в электронном микроскопе как фагоподобные структуры или их компоненты;

3) бактериоцины, для которых четко показана ферментативная природа.

По механизмам действия на бактериальную клетку бактериоцины подразделяют на четыре основные группы:

1) бактериоцины, ингибирующие окислительное фосфорилирование в цитоплазматической мембране;

2) бактериоцины, разрушающие ДНК;

3) бактериоцины, блокирующие синтез белков;

4) бактериоцины, нарушающие полупроницаемость цитоплазматической мембраны.

Показано, что большинство бактериоцинов оказывают свое действие, не проникая внутрь клетки. Они передают сигнал на мишень действия посредством цитоплазматической мембраны.

Синтез большинства бактериоцинов детерминируется особыми плазмидами, названными бактериоциногенными факторами. Некоторые плазмиды бактериоциногенности передаются при конъюгации, т.е. являются конъюгативными плазмидами, но большинство данных плазмид – это неконъюгативные плазмиды. В качестве примера рассмотрим плазмиду ColE1 (рис. 59).

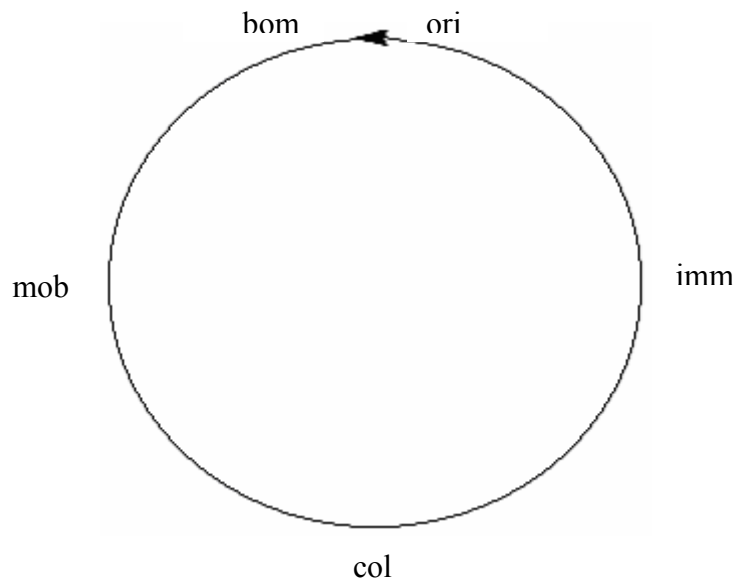


Рис. 59. Генетическая карта плазмиды Col E1

Эта плазмида детерминирует синтез колицина E1 у бактерий *E.coli*. Плазмида Col E1 относится к классу неконъюгативных плазмид с ослабленным контролем репликации, т.е. она многокопийна. Размер плазмиды Col E1 равен 6,3 т.п.н. Плазмида содержит сайт *ori*, с которого начинается однонаправленная репликация, гены *col*, отвечающие за синтез колицина E1, а также гены *imm*, обеспечивающие клетке иммунитет к действию этого колицина (если в клетке есть Col-плазмида, то клетка нечувствительна к действию бактериоцина, синтез которого детерминируется этой плазмидой). Синтез колицина в норме репрессирован, но индуцируется агентами, влияющими на ДНК.

Плазмида Col E1 в присутствии в клетке конъюгативной плазмиды может передаваться в реципиентные клетки т.е. происходит ее мобилизация. У плазмиды Col E1 за процесс мобилизации отвечают четыре белка, кодируемые областью *mob* (*mobilization*). Роль каждого из белков пока не установлена. Предполагается, что один из этих белков делает разрыв одной из нити ДНК плазмиды Col E1 в сайте *hom*, необходимый для начала переноса. После чего разорванная нить переходит в реципиентную клетку, начиная с 5'-конца. Перенос осуществляется за счет *tra*-генов конъюгативной плазмиды. Образование коинтеграта между плазмидой Col E1 и конъюгативной плазмидой не происходит, так как плазмида Col E1 не имеет в своем составе ни IS-элементов, ни транспозонов. Следует отметить, что при такой мобили-

лизации перенос конъюгативной плазмиды в реципиентную клетку может и не происходить.

Следует отметить, что синтез некоторых бактериоцинов детерминируется генами, локализованными в хромосоме. Это показано для грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia chrysanthemi* и др.

7.4.3. R-плазмиды или факторы резистентности

Бактерии, устойчивые к антибиотикам, были впервые выделены в 50-ые годы прошлого столетия в Японии от больных дизентерией, которых лечили антибиотиками. Были выделены возбудители дизентерии бактерии *Shigella*, устойчивые сразу к нескольким антибиотикам, т.е. обладающие множественной резистентностью. Поскольку от одного и того же больного выделялись штаммы бактерий, как чувствительные к антибиотикам, так и полирезистентные, объяснить возникновение множественной резистентности штаммов путём мутационной изменчивости было трудно. К тому же оказалось, что множественная резистентность трансмиссибельна, т.е. может передаваться от одних клеток *Shigella* к другим, а также бактериям *E.coli*. Было показано, что передача лекарственной устойчивости происходит при контакте клеток, т.е. при конъюгации; перенос не зависит от F-фактора (его в клетках не обнаружили); лекарственная устойчивость утрачивалась, если проводить элиминацию акридиновыми красителями.

Только в 1963 году был опубликован первый обзор на английском языке японского учёного Т.Ватанабе, в котором были суммированы результаты японских исследователей по лекарственной устойчивости у бактерий. Эти результаты свидетельствовали в пользу того, что лекарственная устойчивость контролируется внехромосомными генетическими детерминантами. Эти детерминанты были названы R-плазмидами или R-факторами.

R-плазмиды, как и другие плазмиды, представляют собой двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК. Молекулярная масса R-плазмид различна – от 3 до 300 МД. В клетке может присутствовать до нескольких десятков копий мелких плазмид (плазмид с ослабленным контролем репликации), тогда как число копий крупных R-плазмид с молекулярной массой ≥ 20 МД, как правило, составляет 1–2 на хромосому.

Большая часть известных R-плазмид грамотрицательных бактерий конъюгативна. У грамположительных клинических штаммов выделяют как конъюгативные, так и неконъюгативные R-плазмиды.

Любая конъюгативная R-плазида несет две группы генов. Первая группа – гены, ответственные за передачу плазмиды путём конъюгации (гены *tra*), – они образуют так называемый «фактор переноса устойчивости» (RTF, *resistense transfer factor*). Область RTF по своей молекулярной структуре гомологична *tra*-оперону F-фактора *E.coli*. Вторая группа – гены, обуславливающие собственно резистентность (*r-det*).

В качестве примера рассмотрим строение конъюгативной плазмиды R100 со строгим контролем репликации (рис. 60).

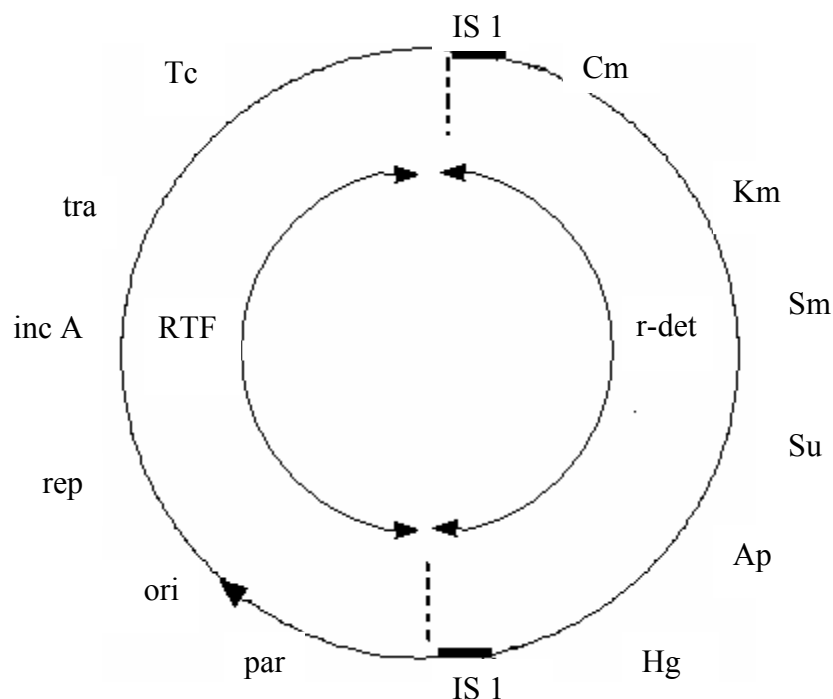


Рис. 60. Генетическая карта плазмиды R 100

Размер плазмиды R100 составляет 90 т.п.н. Эта плазида относится к классу плазмид с множественной лекарственной резистентностью и содержит гены, определяющие устойчивость клеток к тетрациклину (Tc^r), хлорамфениколу (Cm^r), канамицину (Km^r), стрептомицину (Sm^r), сульфаниламидам (Su^r), ампициллину (Ap^r) и к ионам ртути (Hg^r). Почти все эти гены (кроме Tc^r) располагаются в одной области (*r-det*), ограниченной прямыми повторами IS1-элементов. Благодаря этому область *r-det* превращается в подвижный генетический элемент и мо-

жет переноситься в другие плазмиды. Вторая часть плазмиды R100, называемая RTF, может быть самостоятельной конъюгативной плазмидой, содержащей ген Tc^r . В этой части располагаются также гены, отвечающие за репликацию (*repA*) и несовместимость (*incA*) плазмид, а также за распределение плазмидной ДНК по дочерним клеткам (*par*).

Плазмиды резистентности могут контролировать устойчивость к одному или нескольким антибиотикам, причём комбинации антибиотиков могут быть самыми различными.

Для некоторых R-плазмид характерен широкий круг хозяев (возможен их перенос в клетки бактерий разных родов). К таким R-плазмидам относится уже упоминаемая нами плазида RP4.

Некоторые R-плазмиды могут встраиваться в бактериальную хромосому и мобилизовать передачу хромосомных генов. Это происходит за счёт транспозонов и IS-элементов.

Механизмы устойчивости к антибиотикам, определяемой R-плазмидами, как правило, отличаются от механизмов резистентности, детерминированной мутациями в хромосомных генах. Наглядным примером этого служит резистентность к стрептомицину. Если устойчивость зависит от хромосомного гена, то она связана с изменением 30S-субъединицы рибосомы, так что бактерия не имеет мишени для воздействия стрептомицина. В отличие от этого устойчивость, обусловленная R-плазмидой, основана на инактивации антибиотика в результате его аденилирования или фосфорилирования под влиянием фермента.

Такая ферментативная химическая модификация антибиотиков часто бывает причиной устойчивости к ним, обусловленной R-плазмидами. Например, хлорамфеникол подвергается ацетилированию, канамицин и неомицин подвергаются фосфорилированию и ацетилированию, а пенициллин инактивируется пенициллиназой. Механизм резистентности к тетрациклину, обусловленный R-плазмидой, состоит в том, что синтезируются белки, влияющие на транспорт антибиотика и как следствие этого – снижение внутриклеточной концентрации антибиотика.

7.4.4. Ti-плазмиды

Ti-плазмиды – это плазмиды, ответственные за образование опухолей у некоторых представителей голосеменных и большинства двудольных покрытосеменных растений. Эти плазмиды обнаружены в клетках вирулентных штаммов бактерий *Agrobacterium tumefaciens*,

которые вызывают раковое заболевание растений, получившее название «корончатый галл».

Ti-плазмиды – это кольцевые молекулы ДНК длиной до 200 т.п.н. и с молекулярной массой в среднем $1,3 \cdot 10^8$ Д. Ti-плазмиды относятся к классу конъюгативных плазмид.

После заражения растения бактериями *Agrobacterium tumefaciens* Ti-плазмиды проникают из бактерий в клетки растения. Далее часть ДНК Ti-плазмиды, так называемая T-ДНК, ковалентно встраивается в хромосому инфицируемого растения. В таком состоянии T-ДНК вызывает образование опухоли, гиперпродукцию фитогормонов, а также синтез ряда производных аминокислот, которые называются опинами. Опины, выделяемые клетками опухоли, бактерии используют в качестве источников углерода и азота.

7.4.5. Значение плазмид:

1). Плазмиды нашли широкое применение в генетической инженерии. С их помощью можно получить рекомбинантные молекулы ДНК, вероятность возникновения которых в природе крайне низка, или возникновение их вообще не возможно.

2). Плазмиды играют большую роль в эволюции бактерий.

3). Плазмиды представляют большую ценность как материал для исследования структуры и функционирования генетического аппарата бактериальной клетки.

4). Плазмиды имеют большое значение в зависимости от фенотипов, которые они детерминируют:

- **плазмиды биодеградации.** Наличие таких плазмид в бактериях позволяет им развиваться в средах, содержащих необычные или не природные источники углерода. Такие бактерии используют для биологической очистки сточных вод.

- **плазмиды бактериоциногенности.** Бактериоциногенность имеет большое значение для развития популяции бактерий. Бактериоциногенные бактерии подавляют развитие других бактерий, преимущественно обладающих сходными пищевыми потребностями (т.е. родственные виды микроорганизмов). Это подавление обеспечивается бактериоцином, который в норме продуцируют отдельные клетки бактериоциногенной популяции. В результате синтеза бактериоцина эти клетки погибают, в то время как большинство клеток сохраняет иммунитет к его действию и вытесняет другие микроорганизмы, чувствительные к данному бактериоцину. Таким образом, бактерии, имею-

щие бактериоциногенные факторы, обладают важным селективным преимуществом в условиях микробных ассоциаций, естественно слагающихся в процессе эволюции. Эти селективные преимущества реализуются только на уровне популяции и обеспечиваются ценой гибели отдельных ее особей.

Бактериоциногенные микроорганизмы используют в медицинской практике для лечения расстройств кишечника. Выпускаются бактериоциногенные препараты: колибактерин (высушенная суспензия живых бактерий антагонистически активного штамма *E.coli* М-17), бифидумбактерин (высушенная суспензия живых антагонистически активных бифидобактерий), бификол (высушенная суспензия живых антагонистически активных штаммов бифидобактерий и бактерий *E.coli* М-17) и другие. Такие препараты используют в тех случаях, когда антибиотики при чрезмерном их употреблении приводят к нарушениям витаминного баланса, дисбактериозу (нарушается естественная микрофлора кишечника).

Бактериоциногенные микроорганизмы используются для типирования штаммов бактерий.

- **R-плазмиды** обеспечивают бактериям, их содержащим, селективные преимущества по сравнению с бактериями без R-плазмид.

- **плазмиды, детерминирующие токсинообразование.** Бактерии, обладающие такими плазмидами, способны вызывать заболевания у человека, животных и растений.

- **Ti-плазмиды** обеспечивают трансформацию нормальных клеток растений в раковые. Этим они приносят вред сельскому хозяйству, особенно виноградарству.

7.5. Способы генетического обмена у бактерий

Бактерии для воспроизведения себе подобных особей не нуждаются в партнерах. Их удвоившийся после репликации геном каждый раз передается клетке «по вертикали» в бесконечном ряду поколений. Но наряду с таким, бесполом, способом передачи генов от предков к потомкам у них существует и парасексуальный процесс передачи генетического материала (или иначе горизонтальный перенос генов), который отличается от полового размножения тем, что здесь не происходит слияние двух половых клеток (гамет) и образования зиготы. При парасексуальном процессе из клетки-донора в клетку-реципиента передается часть генетического материала (хромосомы), в результате образуется неполная зигота или мерозигота. Затем переданный фраг-

мент хромосомы донора спаривается с хромосомой реципиента и происходит рекомбинация. За рекомбинацией следует процесс репликации ДНК и деления клетки, в результате возникают клетки, содержащие только рекомбинантную хромосому, которые называют рекомбинантами.

Существуют три основных способа обмена генетической информацией или горизонтального переноса генов: трансформация, трансдукция и конъюгация. Эти процессы отличаются друг от друга способом транспортировки ДНК.

Трансформация – это процесс переноса генетической информации, при котором ДНК, выделенная из клетки-донора, поступает в клетку-реципиент. Начальным этапом генетической трансформации является необратимая адсорбция ДНК на поверхности клетки и поглощение этой ДНК. К необратимой адсорбции и поглощению ДНК способны лишь клетки бактерий, находящиеся в состоянии компетентности. Последующие этапы, как и при других парасексуальных процессах, связаны с рекомбинацией трансформирующей хромосомной ДНК донора с хромосомой реципиента и пострекомбинационными событиями. Получаемые при этом способе генетического обмена рекомбинанты, называются трансформантами. Количество переносимой при трансформации ДНК равно в среднем около 10 тысяч пар оснований. Генетическая трансформация у бактерий может осуществляться не только хромосомной, но и плазмидной ДНК.

Трансформация – это не чисто лабораторный прием, так как она может происходить и за счет ДНК, спонтанно вышедшей из клетки без участия экспериментатора. Это спонтанная или естественная трансформация. Выход ДНК из клетки обусловлен главным образом аутолизом. Таким образом, при естественной трансформации бактерия-донор ДНК обязательно погибает. Естественная трансформация является одним из механизмов горизонтального переноса генов в природных условиях.

Трансдукция – это перенос генетической информации (хромосомных генов или плазмид) от клетки-донора к клетке-реципиента, который осуществляется бактериофагами. При трансдукции хромосомные гены или плазмиды должны упаковаться в головку бактериофага; выйти, в составе этой фаговой частицы, из лизированной клетки-донора; попасть в другую клетку (клетку-реципиент) при новом акте заражения. Белковый капсид фаговой головки предохраняет находящуюся в ней ДНК от разрушения внеклеточными нуклеазами. В этом

отношении трансдуцирующая ДНК более «сохранна», чем «голая» ДНК при трансформации. Поскольку адсорбция хвостового отростка фага к рецепторам поверхности клетки видоспецифична, то перенос генетического материала при трансдукции может происходить главным образом у близкородственных бактерий.

При трансдукции размеры переносимого фрагмента ДНК определяются размерами головки бактериофага. Различные фаги могут переносить от 20 до 40 т.п.о. ДНК. Таким образом, при трансдукции передаются как единичные признаки, как и сцепленные маркеры. Рекомбинанты, получаемые при данном способе обмена генетической информацией, называются трансдуктантами.

Конъюгацией называется процесс генетического обмена, сопровождающийся переносом генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при непосредственном контакте клеток между собой.

При конъюгации перенос генетического материала обеспечивается конъюгативными плазмидами, такими как плазмида F у бактерий *E.coli*. Конъюгативные плазмиды содержат *tra*-гены, ответственные за перенос (*transfer*) генетического материала. Ряд *tra*-генов определяет синтез половых пилей; другие отвечают за перенос самой плазмиды или мобилизацию переноса хромосомной ДНК из клетки в клетку. Передача плазмиды или хромосомы начинается с одностороннего разрыва в области *oriT* плазмиды, которая называется точкой начала передачи. Для того, чтобы произошла передача хромосомных генов плазмида F (или другая конъюгативная плазмида) должна интегрироваться в хромосому. Разорванная в области *oriT* нить ДНК разматывается, и односторонняя ДНК, начиная с 5'-конца, переносится в реципиентную клетку. Одновременно на обеих нитях плазмидной и хромосомной ДНК – и той, которая остается в донорной клетке, и той, которая поступила в клетку-реципиент, – синтезируется комплементарная нить. Благодаря этому в клетке-доноре восстанавливается целостность хромосомы и F-плазмиды. Заключительной стадией передачи F-плазмиды является рециркуляризация ее ДНК в клетке-реципиенте, а передачи хромосомной ДНК – рекомбинация ее с хромосомой реципиента.

Процесс переноса хромосомных генов при конъюгации может осуществляться также при участии содержащихся в хромосоме конъюгативных транспозонов. Такие транспозоны кроме генов, отвечающих за транспозицию и генов, детерминирующих фенотипические

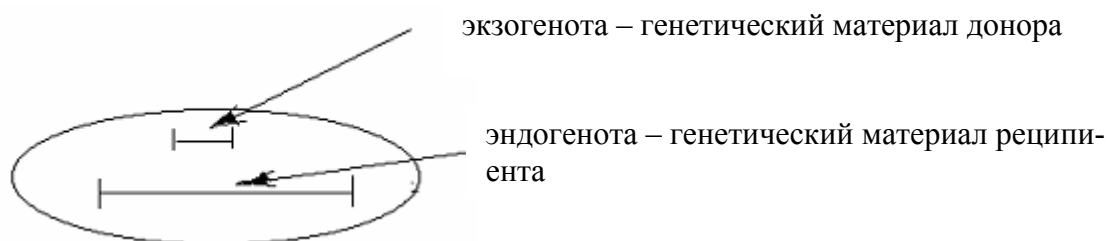
признаки, несут *tra*-гены, похожие на соответствующие гены конъюгативных плазмид. Конъюгативные транспозоны могут выщепляться из хромосомы, образовывать плазмидоподобные структуры и, как и конъюгативные плазмиды, индуцировать (мобилизовать) перенос мелких плазмид в клетку партнера, а также самим переходить в нее.

Процессы конъюгации, в особенности ведущие к передаче плазмид, очень широко распространены среди бактерий. Конъюгация – наилучший механизм для горизонтального переноса генов в любой среде обитания бактерий. Конъюгировать могут бактерии, весьма далекие в систематическом отношении. Плазмиды, осуществляющие конъюгацию между неродственными бактериями и успешно поддерживающиеся в них, как мы уже отмечали, называют плазмидами широкого круга хозяев или космополитными, или промискуитетными плазмидами. Конечно, интеграция переданной хромосомной ДНК в геном реципиента за счет гомологичной рекомбинации при межродовых скрещиваниях почти всегда исключена; однако у бактерий имеются «обходные пути», при участии незаконной (или негомологичной) рекомбинации.

Количество переносимой ДНК при конъюгации больше, чем при трансформации и трансдукции. В «мягких» условиях скрещивания может переноситься вся хромосома. Получаемые при этом способе обмена генетической информацией рекомбинанты называются транс-конъюгантами.

Общим для всех способов обмена генетической информацией у бактерий является следующее:

1. Процесс переноса ДНК всегда односторонний или однопольный, от донорных бактерий к реципиентным.
2. Не наблюдается полного обмена генетической информацией. Образуется мерозигота:



Состояние мерозиготы не длительное. Экзогенота должна встроиться в эндогеноту. Если этого не происходит, то экзогенота элиминируется эндонуклеазами клетки-реципиента.

3. Процесс переноса должен закончиться рекомбинацией.

Кроме трех основных способов обмена генетической информацией имеются и другие способы, которые еще недостаточно изучены и не так успешно применяются в лабораторной практике. Одним из таких способов обмена является слияние бактериальных протопластов или сферопластов. Это так называемый **искусственный обмен генетической информацией**, так как здесь участвуют не интактные клетки, а протопласты или сферопласты. Исследователь должен сначала получить протопласты или сферопласты из клеток обоих родителей, а затем смешать и индуцировать их слияние путем обработки полиэтиленгликолем. Первичный продукт такого слияния – клетка, объединяющая в себе геномы обоих родительских клеток. Слившиеся протопласты или сферопласты высеивают на специальные среды, на которых создаются условия для регенерации их в морфологически полноценные клетки. В процессе последующей рекомбинации возникают стабильные рекомбинанты, обладающие некоторыми признаками обоих родительских штаммов.

Метод слияния протопластов или сферопластов пока успешно применяется только в отношении грамположительных бактерий. В последнее время разработаны условия для слияния сферопластов таких грамотрицательных бактерий, как *Pseudomonas*, *Erwinia* и др.

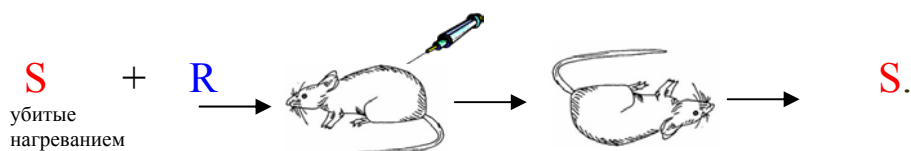
В отличие от конъюгации, трансформации и трансдукции, при которых ДНК передается от донора реципиенту, перенос генетической информации при слиянии протопластов или сферопластов не носит однонаправленного характера, родительские клетки равноценны.

7.5.1. Трансформация

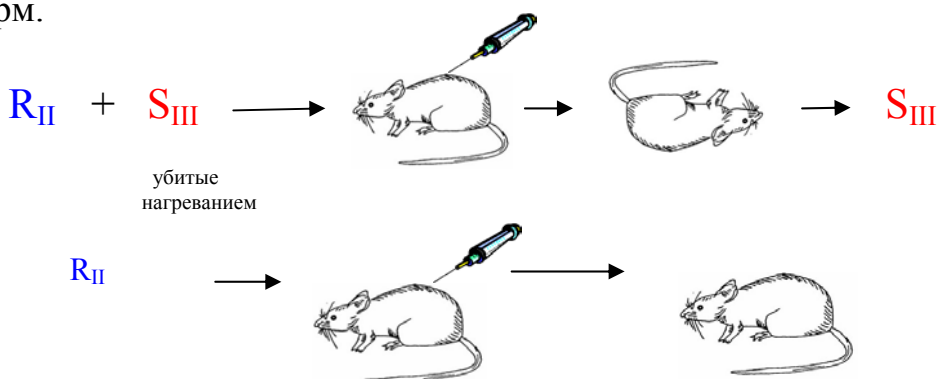
Явление трансформации было открыто Ф.Гриффитом в 1928 году в опытах на пневмококках (*Streptococcus pneumoniae*) – грамположительных бактериях, относящихся к группе молочнокислых бактерий. Ко времени открытия явления трансформации свойства пневмококков были изучены достаточно хорошо. В частности, было известно, что среди пневмококков одного и того же вида, кроме штаммов, имеющих полисахаридную капсулу, обычно есть и бескапсульные штаммы (получающиеся в результате мутаций). Было также установлено, что наличие и отсутствие капсулы определяет некоторые важные свойства

клеток. Клетки с капсулой растут в виде так называемых S-колоний: слизистых, довольно крупных и с гладкой поверхностью. Бескапсульные клетки дают начало маленьким, с неровной поверхностью R-колониям. За счет капсулы бактерии из S-колоний обладают вирулентностью (вызывают септицемию): капсула защищает их от фагоцитоза. Бескапсульные клетки вирулентностью не обладают. Было установлено, что существует большое число различных типов пневмококков, которые отличаются друг от друга по химическому составу полисахаридной капсулы и которые можно различить серологически. Сейчас известно около 70 серотипов пневмококков.

Трансформация была открыта в одном из вариантов опытов по иммунизации мышей вакциной, состоящей из пневмококков, убитых нагреванием при 60 – 80°C. Гриффит Ф. обнаружил, что если мышам подкожно ввести смесь живых бескапсульных клеток и убитых нагреванием вирулентных пневмококков, имеющих капсулу, то мыши погибают. Из органов мышей при этом можно выделить живые капсульные клетки пневмококков:



Если мышам вводили живые авирулентные (R) пневмококки и убитые вирулентные (S) клетки пневмококков разных серотипов (клетки имели разные антигены), то выделенные из органов мыши капсульные клетки имели измененный серотип – тот, к которому принадлежали убитые S-пневмококки. В контрольных опытах введение по отдельности такого же количества живых авирулентных пневмококков или убитых вирулентных не приводило к появлению живых капсульных форм.





Чтобы доказать отсутствие случайного загрязнения бескапсульной культуры отдельными капсульными клетками был поставлен эксперимент с использованием клеток пневмококков, меченых специфическим соматическим белковым антигеном или признаками лекарственной устойчивости. Известно, что эти свойства клеток изменяются независимо от капсульного полисахарида.



Так было доказано отсутствие случайного загрязнения бескапсульной культуры отдельными капсульными клетками.

На основании полученных результатов Ф.Гриффит сделал вывод, что существует трансформирующее начало, которое превращает бескапсульные клетки одного серотипа в капсульные клетки другого серотипа.

В 1930 году М.Даусон установил, что выдерживание суспензии клеток в течение двух суток при 37 °С уничтожает трансформирующую активность такого препарата. В 1931 году М.Даусон и Р.Сиа осуществили трансформацию не в организме мыши, а *in vitro*, смешав убитые нагреванием капсульные клетки и живых бескапсульных пневмококков в жидкой питательной среде с добавлением крови. Позднее в 1932 году Дж.Аллоуэй осуществил специфическую трансформацию *in vitro* в присутствии бесклеточных экстрактов, полученных из клеток S-типа. Пневмококки были разрушены замораживанием-оттаиванием или дезоксихолатом натрия, и лизат несколько раз переосаждали спиртом. Полученный осадок растворяли и смешивали с бескапсульными живыми клетками. Получали с высокой частотой капсульные клетки.

Таким образом, работы 1928 – 1933 годов доказали существование трансформации у пневмококков. Было установлено, что это явление может происходить как в организме животного так и *in vitro*. Показано, что для трансформации необходим какой-то фактор, который не инактивируется при обработке лизата клеток спиртом.

Интерес к опытам по трансформации возродился в 1944 году, когда была опубликована классическая работа О.Эвери, К.Мак-Леода и

М.Мак-Карти. В этой работе было установлено, что трансформацию можно воспроизвести, используя в качестве трансформирующего агента препарат очищенной ДНК, полученный из капсульных клеток. Методика работы заключалась в следующем. Капсульные клетки пневмококков типа III (SIII), убитые нагреванием при 65 °С, лизировали с помощью дезоксихолата натрия. Лизат осаждали спиртом. Полученный осадок растворяли и из него удаляли белок и полисахариды. После нескольких дополнительных переосаждений спиртом получали препарат ДНК, содержащий только 3% белка. Этим препаратом ДНК обрабатывали бескапсульные клетки типа II (RII). Частота выявления трансформантов (S III-типа) была высокой. В этой же работе и в работах ближайших двух лет были изучены некоторые воздействия, инактивирующие полученный препарат из капсульных клеток, убитых нагреванием. Оказалось, что протеолитические ферменты (трипсин, химоотрипсин, проназа) и РНКаза на трансформирующую активность препарата не действовали. Зато ДНКаза снимала ее полностью. Был сделан вывод, что **трансформирующим началом является ДНК**. Позднее было показано, что при использовании трансформирующих препаратов, в которых ДНК помечена радиоактивным фосфором ³²P, метка необратимо встраивается в ДНК бактерии-реципиента. Более того, между степенью включения метки и числом трансформантов существует прямая зависимость.

В настоящее время трансформация, кроме пневмококков, воспроизведена и на других видах микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, гемофильных бактериях (*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*) и др.

Трансформацию удалось осуществить не только между бактериями одного и того же вида, но также и между бактериями, принадлежащими к разным видам. Однако межвидовая трансформация наблюдается, как правило, лишь у близкородственных бактерий и с меньшей частотой, чем внутривидовая.

В начале 70-х годов прошлого столетия было показано, что трансформировать можно не только хромосомную, но и плазмидную ДНК. Плазмиды после этого нормально функционируют и реплицируются в реципиентных клетках.

Процесс трансформации, начиная с момента добавления ДНК из клеток донорного штамма к культуре реципиента, в общих чертах включает следующие этапы или стадии:

- 1). Адсорбция донорной ДНК реципиентной клеткой. На этом этапе трансформирующий фактор чувствителен к ДНКазе.
- 2). Проникновение донорной ДНК в реципиентную клетку. На этой стадии ДНК уже нечувствительна к ДНКазе. ДНК может поглощаться только теми клетками, которые находятся в состоянии компетентности.
- 3). Образование в реципиентной клетке однонитевых участков донорной ДНК.
- 4). Синапс донорной ДНК с хромосомой реципиента.
- 5). Интеграция части донорной молекулы ДНК в реципиентную ДНК в результате рекомбинации.
- 6). Репликация рекомбинантной молекулы ДНК.
- 7). Экспрессия генов, переданных от донора, т.е. получение трансформантов.

7.5.1.1. Состояние компетентности у бактерий

Компетентностью при генетической трансформации обычно называется способность бактериальных клеток адсорбировать и поглощать ДНК. Однако в последние годы включают в это понятие и все последующие стадии, вплоть до рекомбинации трансформирующей ДНК с хромосомой реципиентной бактерии.

У многих видов бактерий компетентность возникает лишь на определенном этапе роста культуры. Например, культуры стафилококков находятся в стадии компетентности в ранней логарифмической фазе роста. Культуры бактерий *B. subtilis* находятся в стадии компетентности на более поздних этапах роста, у гемофильных бактерий – в стационарной фазе роста. У некоторых бактерий клетки компетентны в любой фазе роста (например, у гонококков и менингококков).

Установлено, что в компетентных культурах стрептококков, гемофильных бактерий способна к трансформации почти каждая клетка. В то же время у *B. subtilis* в этих же условиях может поглощать ДНК только 10–15 % клеток популяции, у *Aspergillus niger* – 0,1 – 0,2 %, у *Rhizobium japonicum* – до 0,1 % клеток всей популяции.

Состояние компетентности регулируется множеством генов (у бацилл их не менее 40). Их принято подразделять на ранние и поздние. К ранним относятся гены «настраивающие» (подготавливающие) клетку на приобретение компетентности; к поздним – гены, детерминирующие механизмы связывания и поглощения ДНК, преобразования (или процессинга) ДНК по ходу поглощения; и, наконец, гены, управ-

ляющие рекомбинацией трансформирующей ДНК с хромосомой реципиентной клетки.

В ряде научных лабораторий (Р.Пакула, Р.Хочкисс, Р.Томас и др.) было показано, что состояние компетентности у стрептококков можно передать от компетентных клеток некомпетентным. Передача состояния компетентности не требует физического контакта бактерий, потому что оно передается через мембранный фильтр, задерживающий бактериальные клетки. Было сделано заключение, что существует какой-то фактор, обеспечивающий состояние компетентности.

В тех же лабораториях были изучены некоторые свойства фактора компетентности бактерий *S. pneumoniae*. Он был выделен после осаждения сульфатом аммония или этиловым спиртом. Было установлено, что это пептид, чувствительный к протеазам, относительно устойчив к высокой температуре (при нагревании до 100 °С инактивировался за 30 минут).

В работах последнего десятилетия вместо термина «фактор компетентности» употребляется слово «феромон». Показано, что феромоны стрептококков являются катионными пептидами небольшой величины. Например, у *S. pneumoniae* – последовательность в 17 аминокислотных остатков, у других стрептококков – от 14 до 23 остатков. У *B. subtilis* феромоны – это пептиды из 9 – 10 аминокислотных остатков. Это объясняет их сравнительно высокую термоустойчивость.

В особенностях поведения феромонов компетентности бацилл и стрептококков есть общие моменты. Эти небольшие пептиды выходят из компетентных клеток в среду и индуцируют развитие компетентности, активируя все гены компетентности у почти всех клеток популяции стрептококков или части клеток бацилл.

Восприятие клеткой феромонного сигнала осуществляется за счет двухкомпонентной передающей системы, состоящей из сенсорного белка и белка-регулятора ответа (рис. 61).

Сенсорный белок состоит из трансмембранного рецепторного домена, пронизывающего поверхностные слои клетки и соприкасающегося с внешней средой, и передающего модуля, находящегося в цитоплазме. Сенсорными белками часто служит семейство ферментов гистидинкиназ, обладающих способностью к фосфорилированию. Феромон контактирует с рецептором, имеющим к нему сродство; сигнал идет к передающему модулю и от него – к второму компоненту этой системы, белку-регулятору ответа. Передача сигнала происходит посредством фосфорилирования белка-регулятора, с использованием ос-

татков аминокислот гистидина и аспартата. Фосфорилированный регулятор взаимодействует с промотором того или иного оперона и активирует экспрессию ряда «молчащих» до сих пор генов, отвечающих за компетентность. В результате метаболизм клетки меняется, иногда коренным образом. К этому и сводится ответ на феромонный сигнал, полученный рецептором.

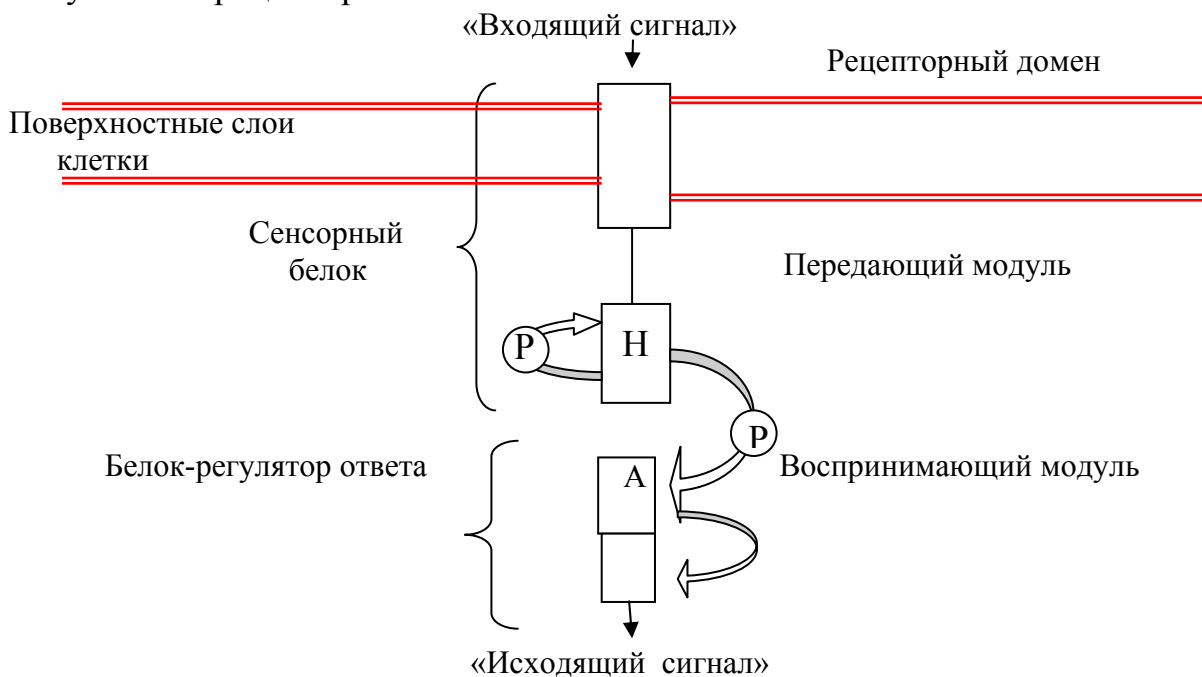


Рис. 61. Двухкомпонентная передающая система (по Прозорову А.А., 2001):
 — (P) → — реакция фосфорилирования, Н и А — остатки гистидина и аспартата

Хотя естественная трансформация к настоящему времени описана более чем у 50 видов бактерий, феромоны компетентности известны лишь у стрептококков и бацилл. Возможно, что у некоторых видов они еще просто не обнаружены; однако можно считать установленным, что трансформация у таких хорошо изученных микроорганизмов, как гонококки и менингококки осуществляется без феромонов. Это вполне объяснимо, так как клетки этих бактерий способны к трансформации в любой стадии роста культуры: компетентность является их постоянным свойством.

Компетентные клетки у различных видов бактерий отличаются от некомпетентных не только способностью к поглощению ДНК, но и другими свойствами:

- компетентные клетки обладают сниженным уровнем метаболизма;

- более устойчивые к пенициллину, чем остальные клетки в популяции;
- в компетентных клетках снижен темп репликации ДНК или вообще отсутствует репликация;
- компетентные клетки имеют меньшие размеры, чем некомпетентные;
- у компетентных клеток изменены наружные слои, обнаруживаются обнаженные участки цитоплазматической мембраны;
- компетентные клетки обладают повышенной чувствительностью к осмотическому шоку, тепловой обработке;
- у компетентных клеток снижен поверхностный заряд.

Однако существует много видов бактерий, у которых отсутствует естественная компетентность. Примером таких бактерий являются *E. coli*, бактерии рода *Erwinia* и др. Но несмотря на это, они также могут быть трансформированы. Для этого их клетки обрабатывают тем или иным способом, индуцируя у них способность к поглощению ДНК. Наибольшую известность приобрел метод индукции компетентности с помощью ионов кальция – **кальциевый метод**. Клетки бактерий выдерживают в присутствии ионов Ca^{2+} (50 мМ) при 0 °С. Далее на них производят кратковременное тепловое воздействие при 37 °С или 42 °С. В этих условиях возникает общее состояние компетентности и появляется возможность осуществления хромосомной и плазмидной трансформации.

Эффективность трансформации повышается при совместном действии: ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} , ионов Ca^{2+} и Mn^{2+} , ионов Ca^{2+} и Rb^+ .

Кроме того, эффективность трансформации повышается при увеличении времени инкубирования с ионами кальция (Ca^{2+}), а также при добавлении диметилсульфоксида.

Широко используется еще один способ индукции компетентности – это глубокое замораживание с последующим оттаиванием клеток. При этом осуществляется трансформация как хромосомной, так и плазмидной ДНК. Такой способ трансформации получил название **криотрансформации**. Чтобы получить трансформанты с помощью этого метода, смесь реципиентных клеток и ДНК донора в присутствии криопротектора (0,5% раствора твина-80) замораживают до (-196 °С), а затем отогревают при + 42 °С и высевают на селективные среды, позволяющие отобрать трансформанты.

Механизмы индукции компетентности изучены недостаточно. Показано, что высокие концентрации ионов кальция и других щелочно-

земельных металлов вызывают структурную реорганизацию клеточных мембран, а также плазмолиз. В мембранах обнаруживаются полиморфные структурные изменения, образуются участки соединения и слияния мембран. При этом усиливается мембранная проницаемость, увеличиваются размеры периплазматического пространства. В связи с этим предполагается, что ДНК поступает в цитоплазму сквозь дефекты мембран, а также участки слияния мембран.

Возможно, что аналогичные изменения возникают в клетках и под влиянием других воздействий, индуцирующих компетентность. Высказывается предположение, что в процессе замораживания-оттаивания молекулы ДНК поступают в цитоплазму путем диффузии через временные быстро репарируемые дефекты мембран.

В последнее время трансформацию успешно осуществляют с помощью электропорации. Существуют приборы электропораторы, которые увеличивают проницаемость бактериальной мембраны для трансформирующей ДНК.

Рассмотрим каждый из этапов трансформации.

Взаимодействие трансформирующей ДНК с компетентной клеткой бактерий начинается с адсорбции ДНК на поверхности клетки. Адсорбировать ДНК могут и некомпетентные клетки. Однако ДНК с поверхности таких клеток может быть легко удалена при отмывании и даже при разведении культуры. Такая адсорбция называется обратимой или неспецифической. У компетентных клеток образуется более прочная связь ДНК с клеточной поверхностью: для удаления или инактивации ДНК недостаточно простого отмывания, нужна обработка ДНКазой или антителами к ДНК. Адсорбция ДНК на поверхности компетентных клеток называется необратимой или специфической.

Адсорбция ДНК на компетентной клетке – это быстротечный процесс. Например, трансформирующая ДНК на компетентных клетках культуры *B. subtilis* адсорбируется за 2 минуты (рис. 62).

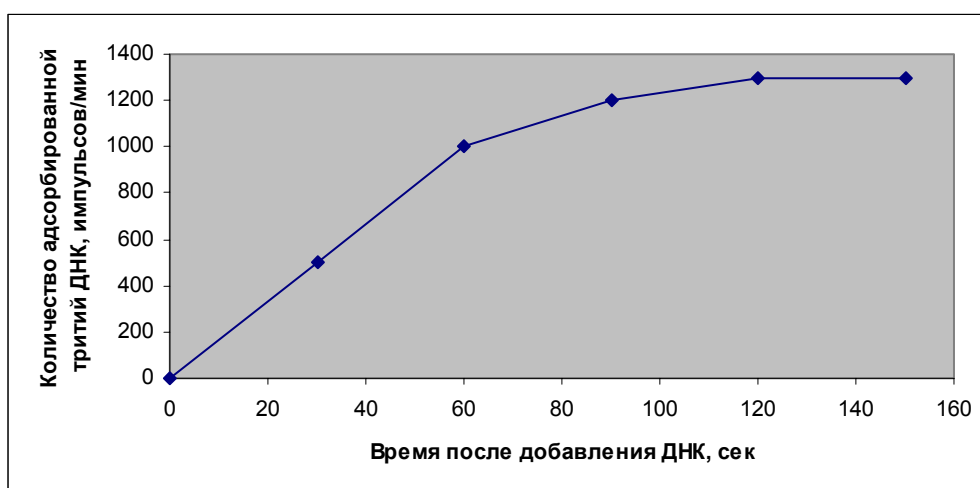


Рис. 62. Динамика адсорбции меченой ДНК на клетках компетентной культуры *B. subtilis* (по Д.Дубнау, 1976)

Как же происходит адсорбция ДНК ?

Показано, что у *B. subtilis*, пневмококков и других стрептококков молекулы трансформирующей ДНК прикрепляются к рецепторным участкам – белкам. Причем прикрепляется ДНК одним своим концом (немногими точками). Второй конец ДНК остается свободным. Такой способ определяет порядок вхождения молекулы ДНК в компетентные клетки, т.е. имеется определенная полярность вхождения ДНК.

В процессе адсорбции ДНК претерпевает определенные изменения. Примерно через 30 сек после начала адсорбции высокомолекулярная трансформирующая ДНК весом в несколько мегадальтон распадается на крупные двунитевые фрагменты весом около 1 МД каждый. ДНК на этой стадии еще чувствительна к ДНКазе, т.е. ее фрагменты находятся на клеточной поверхности.

За адсорбцией следует процесс проникновения ДНК в клетку бактерий. В настоящее время наиболее популярна модель С.Лекса, объясняющая этот процесс. Согласно этой модели проникновение ДНК у бактерий *B. subtilis* осуществляется путем активного транспорта с участием нуклеазы (или нуклеаз). Транспорт облегчается предварительным разрезанием молекулы адсорбированной ДНК на фрагменты меньшей длины. Кроме того, нуклеазы в процессе транспорта разрушают одну из цепей трансформирующей ДНК.

Модель С.Лекса основана на многочисленных данных, прямо и косвенно свидетельствующих об участии нуклеаз в процессах трансформации. Это:

- отсутствие компетентности у мутантов с нарушением нуклеазной активности;

- выделение нуклеаз, специфических лишь для клеток, находящихся в состоянии компетентности. У некомпетентных клеток таких нуклеаз не выделяют.

У гемофильных бактерий *Haemophilus influenzae* адсорбция и поглощение трансформирующей ДНК осуществляется по-другому. В компетентной фазе роста культуры на поверхности клеток появляются пузырьковидные выпячивания цитоплазматической мембраны диаметром 80–100 мкм, в количестве 5 – 13 на клетку. Эти пузырьки называются трансформасомами. Трансформасомы содержат на своей поверхности белок с молекулярной массой 25 КД. На них при участии этого белка и происходит адсорбция ДНК. Транспорт ДНК из трансформасомы внутрь клетки неясен, его также пытаются объяснить свойствами нуклеаз, «объедающих» одну нить ДНК и одновременно способствующих транспорту второй нити.

Гемофильные бактерии другого вида *Haemophilus parainfluenzae* в стадии компетентности также имеют поверхностные трансформасомы. Однако они в отличие от трансформасом бактерий *Haemophilus influenzae* мигрируют в периплазматическое пространство, как только захватывают ДНК. ДНК может длительное время находиться внутри этих образований. Постепенно в трансформасомах образуются однонитевые фрагменты ДНК, которые переходят в цитоплазму.

Таким образом, у всех изученных к настоящему времени бактерий, способных трансформироваться, показано наличие однонитевых фрагментов донорной ДНК в цитоплазме клетки-реципиента.

Период между поглощением ДНК и включением ее в хромосому реципиента называется **эклипс-фазой** или **фазой затмения**. В эту фазу биологическая активность поглощенной ДНК резко падает, т.е. из реципиентных клеток нельзя выделить ДНК, обладающую трансформирующей активностью. Считают, что наличие эклипс-фазы связано с образованием однонитевых ДНК.

Однонитевая ДНК вступает в стадию синапса с гомологичным участком хромосомы реципиента. Донорную и реципиентную ДНК в этом комплексе удерживают водородные связи. Ковалентные связи здесь не образуются. При тепловой денатурации этот комплекс распадается.

Синапс сменяется интеграцией однонитевой молекулы ДНК в хромосому. При этом происходит вытеснение соответствующей нити

ДНК реципиента. Между флангами включенного фрагмента и ДНК реципиента образуются ковалентные связи; их уже невозможно разрушить денатурацией. Этим завершается процесс рекомбинации, в результате чего образуется гетеродуплексная структура (гибридная ДНК), в которой одна нить ДНК принадлежит донору, а другая – реципиенту (рис. 63).

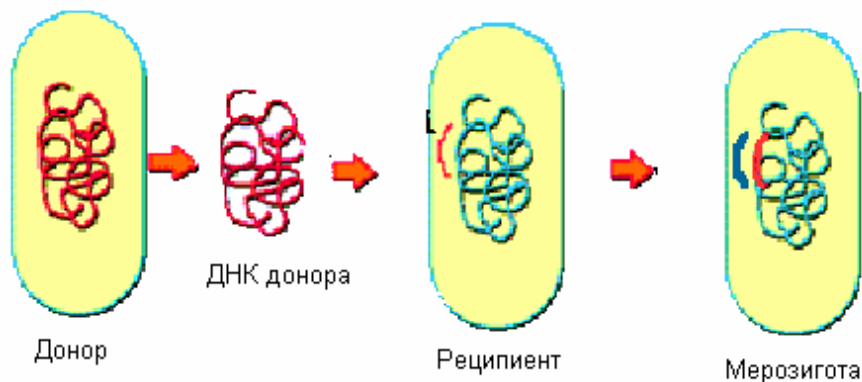


Рис. 63. Схема процесса трансформации

После включения однонитевого фрагмента ДНК донора в хромосому реципиента может происходить явление коррекции. Оно сводится к выщеплению одной из нитей, принадлежащих донору или реципиенту, из двунитевого гибридного участка ДНК, и репаративному синтезу на месте образовавшейся брешки новой нити, полностью комплементарной нити-матрице (т.е. огомозигочиванию). Одной из причин выщепления является, по-видимому, неполное соответствие оснований в определенных участках нитей ДНК донора и реципиента. Коррекция, как и различные аномалии рекомбинации, может сильно влиять на частоту трансформации по некоторым маркерам.

Применение трансформации:

- для картирования бактериальной хромосомы по частоте трансформации;
- для конструирования полезных штаммов микроорганизмов;
- с помощью трансформации можно вводить в геном бактерий определенные маркеры или элиминировать нежелательные мутации;
- трансформация может служить моделью для различных генетических и молекулярно-биологических экспериментов на изолированной ДНК, так как уровень трансформирующей активности ДНК является очень чувствительным показателем ее структурной целостности. Таким образом можно исследовать механизмы инактивирующей

щего или мутагенного действия различных агентов и природу вызываемых ими повреждений в ДНК.

7.5.2. Конъюгация

Конъюгация – процесс генетического обмена, сопровождаемый переносом генетической информации от клетки донора к клетке-реципиенту, который осуществляется при непосредственном контакте клеток между собой.

Явление конъюгации было открыто Дж.Ледербергом и Э.Татумом в 1946 году в экспериментах с полиауксотрофными штаммами бактерий *E. coli*. Ледерберг Дж. и Татум Э. пытались доказать существование генетической рекомбинации у бактерий *E. coli*. Классический эксперимент Дж.Ледерберга и Э.Татума заключался в следующем: два ауксотрофных мутантных штамма *E. coli*:

штамм А – $met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+$,

штамм В – $met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-$

выращивали в течение ночи в жидкой полноценной среде. Культуры обоих штаммов смешивали и инкубировали при оптимальных условиях в течение некоторого времени. Затем смешанную культуру центрифугировали, для того, чтобы отмыть клетки от полноценной среды, и высевали на агаризованную минимальную глюкозо-солевую среду. После инкубирования при 37 °С на этой среде сформировались прототрофные колонии $Met^+ Bio^+ Thr^+ Leu^+ Thi^+$ с частотой $10^{-6} - 10^{-7}$ (рис. 64).

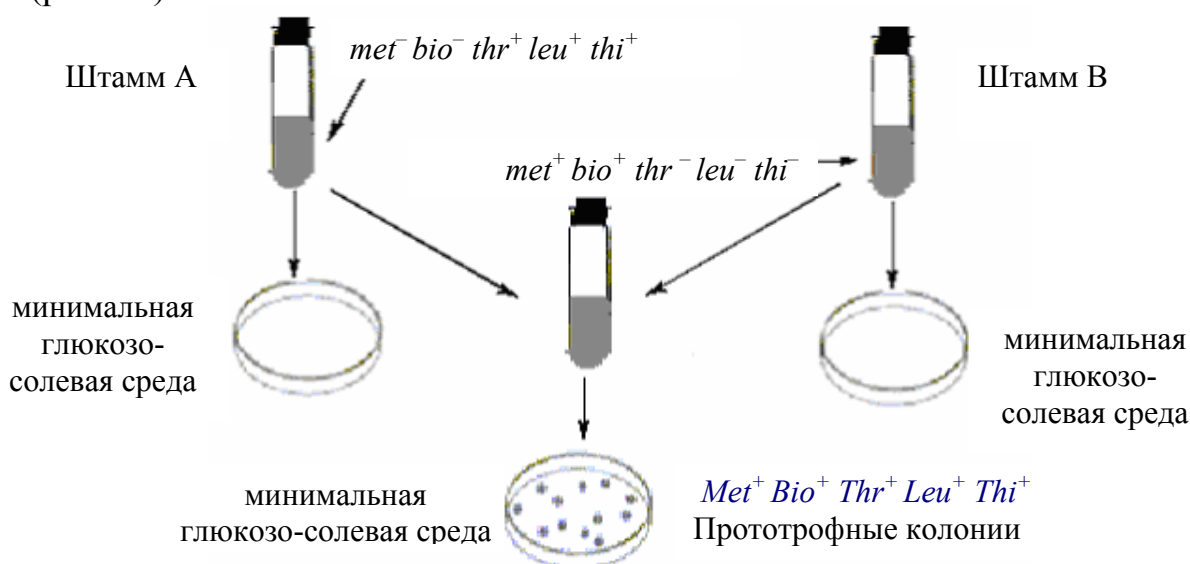


Рис. 64. Схематическое изображение классического опыта по скрещиванию ауксотрофных мутантов, проведенного Дж.Ледербергом и Э.Татумом

Для того, чтобы доказать, что спонтанной реверсии исходных ауксотрофных штаммов к прототрофности не наблюдалось, клетки штаммов А и В также отмывали от полноценной среды и высевали на минимальную глюкозо-солевую среду. Такие спонтанные обратные мутации практически не могут осуществляться, поскольку для их возникновения необходимо, чтобы мутации произошли одновременно в двух генах штамма А и одновременно в трех генах штамма В. Следует помнить, что спонтанные мутации от ауксотрофности к прототрофности обычно происходят с частотой $1 \cdot 10^{-7}$, а одновременная реверсия двух ауксотрофных признаков к прототрофности должна происходить с частотой порядка $1 \cdot 10^{-14}$, трех – $1 \cdot 10^{-21}$. Но у Дж.Ледерберга и Э.Татума, как мы уже отметили, при совместном посеве родительских штаммов на минимальную среду прототрофные клоны появлялись с частотой приблизительно $10^{-6} - 10^{-7}$.

На основании полученных результатов Дж.Ледерберг и Э.Татум сделали вывод, что прототрофы, выделяемые из смешанной культуры, представляют собой генетические рекомбинанты. Иными словами, у таких прототрофов, по-видимому, произошло включение в геном генов *met bio* штамма В и генов *thr leu thi* штамма А:

| | | |
|---|--|--|
| В | <i>met⁺ bio⁺</i> | <i>thr⁻ leu⁻ thi⁻</i> |
| А | <i>met⁻ bio⁻</i> | <i>thr⁺ leu⁺ thi⁺</i> |

К моменту проведения этого эксперимента уже была известна генетическая трансформация у пневмококков и было установлено, что она осуществляется бактериальной ДНК. Поэтому на первый взгляд казалось вероятным, что Дж.Ледерберг и Э.Татум столкнулись всего лишь с другим случаем такой трансформации. Однако весьма скоро выяснилось, что происхождение таких рекомбинантов нельзя объяснить трансформацией, так как Дж.Ледерберг и Э.Татум показали, что для их появления необходим непосредственный контакт между бактериями штаммов А и В. Это было установлено следующим образом. Клетки одного из ауксотрофных штаммов (штамма А) обрабатывали стерильным фильтратом среды, в которой был выращен другой штамм (штамм В). Смесь высевали на минимальную глюкозо-солевую среду, инкубировали при 37 °С – прототрофные колонии не формировались. Прототрофы не образовывались даже в том случае, если клетки штамма В были разрушены непосредственно перед фильтрацией среды.

В 1949 году Б.Дэвис получил дополнительные данные, подтверждающие результаты Дж.Ледерберга и Э.Татума о том, что для обра-

зования прототрофов необходим контакт родительских клеток. Дэвис Б. провел эксперимент в U-образной пробирке (рис. 65).

Бактерии двух ауксотрофных штаммов А и В засеивали в разные ветви U-образной пробирки, которые были разделены в нижней части пористым стеклянным фильтром, непроницаемым для клеток бактерий *E.coli*, но пропускающим частицы размером менее 0,1 мкм, а следовательно, и свободные молекулы ДНК. Повышая и понижая поочередно на одном из концов U-образной пробирки давление, Б.Дэвис медленно перегонял культуральную жидкость из одной ветви в другую. В результате два ауксотрофных штамма использовали одну и ту же питательную среду, но между клетками непосредственного контакта не было. При высеве бактерий на минимальную глюкозо-солевую среду, ни в одной из ветвей U-образной пробирки прототрофы не были обнаружены. На основании полученных результатов был сделан вывод, что для образования рекомбинантов необходимо, чтобы клетки двух родительских штаммов пришли в физический контакт. Во время контакта происходит перенос генетической информации и в результате последующей рекомбинации формируются прототрофные трансконъюганты.

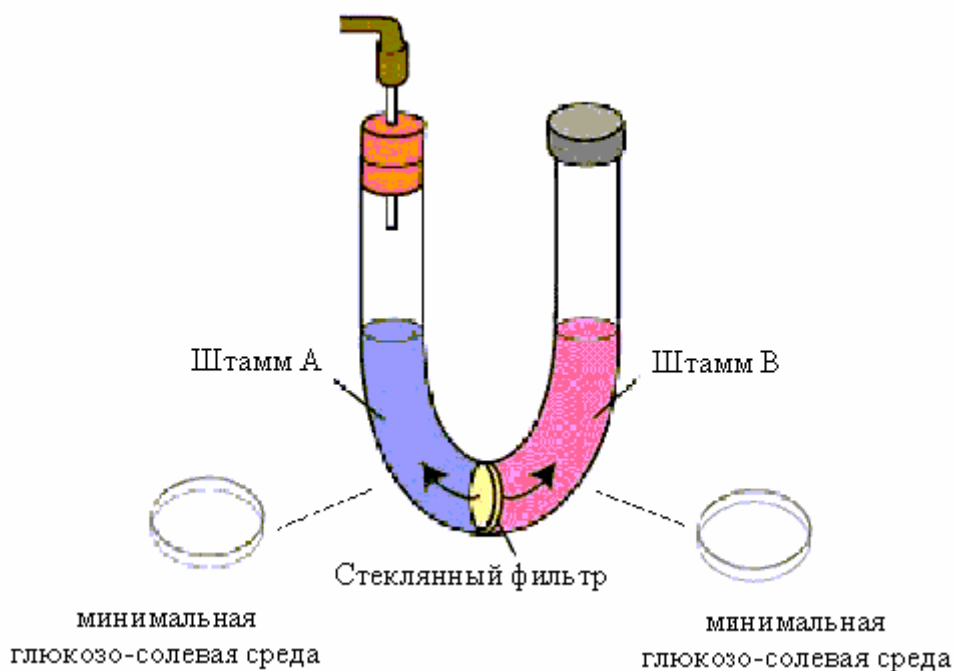


Рис. 65. Схема эксперимента Б.Дэвиса

Ледерберг Дж. и Татум Э. полагали, что доля участия обоих родительских штаммов в образовании прототрофных клеток одинакова, т.е. что нет половой дифференциации у бактерий.

Однако позже У.Хейс показал, что существуют бактерии мужского типа (доноры) и женского типа (реципиенты) и вклад их в конъюгации не равнозначен. Хейс У. работал со штаммами Дж.Ледерберга и Э.Татума, но в опытах использовал признак стрептомицинустойчивости, т.е. один из скрещиваемых штаммов был устойчивым к антибиотику стрептомицину. Если он брал штамм А стрептомицинустойчивым, а штамм В стрептомицинчувствительным, смешивал их и выращивал определенное время вместе, а затем высевал на минимальную глюкозо-солевую среду со стрептомицином, то прототрофные колонии не формировались:



Если стрептомицинустойчивым был штамм В, а штамм А – стрептомицинчувствительным, то на минимальной глюкозо-солевой среде со стрептомицином прототрофные клоны формировались:

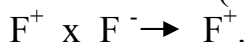


На основании полученных результатов У.Хейс сделал вывод, что для образования рекомбинантов необходимо сохранение жизнеспособности

способности одного из родительских штаммов, другой может погибнуть. Это позволило различить два половых типа клеток: донорные (клетки мужского типа) и реципиентные (клетки женского типа). Перенос генетического материала происходит в одном направлении – от донора к реципиенту и процесс рекомбинации протекает в клетках штамма-реципиента. Рекомбинанты наследуют большинство своих признаков от реципиента, а от донора получают только отдельные фрагменты генома. В эксперименте У.Хейса штамм А был донором, штамм В – реципиентом.

Хейс У. ввел понятие о наличии в донорных клетках F-фактора (*fertility* – плодовитость) и обозначил доноры – F^+ - клетками, а реципиенты – F^- - клетками.

Если взять F^- - клетки и добавить к ним небольшое количество F^+ -клеток, смесь поместить в оптимальные условия, то через несколько часов F^- - клетки превратятся в F^+ - клетки. Это значит, что при контакте клеток F - фактор быстро передается из F^+ - клеток в F^- - клетки, частота передачи F - фактора близка к 100%. Таким образом, клетки реципиенты в результате конъюгации превращаются в потенциальных доноров, но при этом хромосомные признаки не передаются или передаются с крайне низкой частотой ($1 \cdot 10^{-5}$ и ниже).



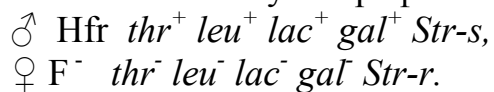
Механизм передачи хромосомных генов при конъюгации был объяснен Ф.Жакобом и Е.Вольманом в середине 50-х годов прошлого столетия. Этому способствовали 2 момента:

- были получены донорные штаммы, которые с высокой частотой передавали хромосомные гены в реципиентные штаммы ($1 \cdot 10^{-2}$ и выше). В результате их рекомбинации с хромосомой реципиента образовывались рекомбинанты по разным признакам. Эти штаммы получили название Hfr, соответственно первым буквам от английского *high frequency of recombination* (высокая частота рекомбинации). Эти штаммы получены в лабораториях Л.Кавалли и У.Хейса;

- разработан в лаборатории А.Львова метод скрещивания с прерыванием конъюгации. Если после скрещивания произвести встряхивание, то конъюгационные пары разрушаются и перенос генов прерывается.

Используя этот прием Ф.Жакоб и Е.Вольман проследили путь генов при скрещивании, т.е. в такой последовательности они передаются от донора к реципиенту. Они скрещивали штаммы донорных бак-

терий, которые были Hfr и имели дикий генотип (т.е. были прототрофными), с реципиентными полиауксотрофными бактериями:



Из инкубационной смеси через определенные промежутки времени отбирали пробы и встряхивали их для прерывания конъюгации. Пробу разводили и высевали на селективные среды, позволяющие отобрать рекомбинанты только одного какого-то класса. Например, для отбора *Thr*⁺-рекомбинантов в минимальную глюкозо-солевую среду добавляли все необходимые для реципиентных бактерий факторы роста, кроме треонина, так как маркер, ответственный за его синтез, передается от донора. В среду также добавляли антибиотик стрептомицин, для того, чтобы убрать клетки донорных бактерий (они прототрофны и способны формировать колонии на минимальной глюкозо-солевой среде). Следовательно, состав селективной среды для отбора *Thr*⁺-рекомбинантов следующий:

минимальная глюкозо-солевая среда + лейцин + стрептомицин.

Для отбора *Leu*⁺-рекомбинантов:

минимальная глюкозо-солевая среда + треонин + стрептомицин.

Для отбора *Lac*⁺-рекомбинантов:

минимальная солевая среда + лактоза + лейцин + треонин + стрептомицин.

Для отбора *Gal*⁺-рекомбинантов:

минимальная солевая среда + галактоза + треонин + лейцин + стрептомицин.

Жакоб Ф. и Вольман Е. получили следующие результаты. Через 5 минут скрещивания рекомбинантов ни по каким маркерам не было отобрано, значит, передача их от донора в реципиентные клетки за это время не произошла. Через 10 минут скрещивания появились рекомбинанты по лейцину и треонину. Рекомбинанты *Lac*⁺ появились спустя 15 минут, а рекомбинанты *Gal*⁺ появились только через 25 минут, т.е. в более поздние сроки. В итоге через 25 минут реципиентная клетка по всем генам становится прототрофной или клеткой дикого типа.

На основании полученных данных Ф.Жакоб и Е.Вольман сделали вывод, что перенос генетического материала от Hfr-донора в реципиентные F⁻-клетки происходит ориентированно, т.е. в том же порядке, в каком гены расположены в хромосоме – в данном примере сначала передается участок *thr-leu*, затем гены *lac*-оперона, а потом гены *gal*-

оперона. Гены расположены линейно в хромосоме. Точка, с которой начинается передача хромосомы, называется точкой начала переноса или ориджин (обозначается буквой «*o*»). Чем ближе (проксимальнее) гены расположены к точке начала передачи, тем больше вероятность их переноса и тем большая частота их рекомбинаций с генами реципиентной хромосомы. Чем дальше (дистальнее) расположены гены от точки ориджин, тем меньше вероятность их переноса в реципиентные клетки.

Когда Ф.Жакоб и Е.Вольман взяли другой донорный Hfr-штамм, то обнаружили, что он передает хромосомные гены в другом порядке.

Для объяснения полученных результатов по скрещиванию F^+ - и Hfr-клеток с F^- -клетками Ф.Жакоб и Е.Вольман предположили, что хромосома у бактерий *E.coli* кольцевая, гены на ней располагаются в определенном порядке, но F-фактор в Hfr-клетках находится в ином состоянии, чем в F^+ -клетках.

Позже было показано, что акридиновый оранжевый способен элиминировать F-фактор, т.е. исцелять F^+ -клетки от F-фактора и превращать их в F^- -клетки. Но при обработке Hfr-клеток F-фактор не элиминируется. Значит в таких клетках половой фактор каким-то образом ассоциирован с хромосомой. Присоединяясь к хромосоме половой фактор способствует переносу всей или некоторой части хромосомы. Порядок переноса хромосомных генов определяется тем, в каком месте присоединяется к хромосоме F-фактор.

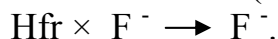
В настоящее время образование штаммов Hfr-штаммов объясняют моделью Кэмпбелла, которая преследует интеграцию F-фактора в хромосому. Согласно этой модели F-фактор, имеющий как и хромосома кольцевую структуру, в своем составе несет нуклеотидные последовательности, аналогичные последовательностям бактериальной хромосомы. Ими являются IS2- и IS3-элементы и транспозон Tn1000. В геноме F-фактора есть два IS3-элемента, один IS2-элемент и один транспозон Tn1000. В хромосоме *E.coli* тоже есть 6 или более IS2-элементов, до пяти IS3-элементов и несколько Tn1000. IS-элементы и транспозоны могут находиться в различных участках хромосомы. За счёт IS-элементов и транспозонов F-фактора и хромосомы происходит гомологичная рекомбинация и интеграция F-фактора в хромосому.

В связи с тем, что в хромосоме бактерий *E.coli* имеется несколько IS-элементов и транспозонов и они располагаются в разных ее участках, то встраивание F-фактора может происходить в различных уча-

стках генома (\approx в 20 генных локусах) и, как следствие этого, могут образовываться разные Hfr-штаммы, отличающиеся друг от друга точкой начала переноса хромосомы при скрещивании с F^- - клетками.

Это происходит так, потому что ген *o* (ориджин), определяющий точку начала переноса хромосомы штаммом Hfr находится в составе F-фактора. Кроме того, перенос хромосомы у различных штаммов Hfr может происходить в разном направлении или ориентации, у одних – по часовой стрелке, у других – против часовой стрелки. Это зависит от того, между какими из цепей ДНК фактора F и хромосомы произошел синапс.

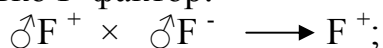
Было также замечено, что при скрещивании Hfr-клеток с F^- - клетками передача Hfr-признака происходит очень редко и клетки рекомбинантов почти всегда остаются женскими (F^- - типа):



Передача Hfr-признака наблюдается только в тех случаях, когда в скрещивании формируются рекомбинанты, как по проксимальным, так и по дистальным маркерам, т.е. когда передается вся хромосома донора. Но передача всей хромосомы – событие весьма редкое, так как многочисленные исследования показали, что возможны случайные разрывы хромосомы в процессе ее перехода из мужской клетки в женскую и хвостовой конец бактериальной хромосомы при этом не входит в реципиентную клетку. На основании выше изложенных результатов было предложено, что при конъюгационном переносе разрыв хромосомы происходит в пределах генома F-фактора и часть его генома с геном *o* находится в начальном конце передающейся хромосомы штамма Hfr, другая часть – в ее дистальном конце. Поэтому при скрещивании Hfr-штаммов с F^- - штаммами образуются рекомбинанты по хромосомным маркерам (с различными частотами в зависимости от расположения от точки начала переноса), в основном не содержащие в своем геноме F-фактора (F^- - клетки).

Таким образом, мы установили, что в зависимости от состояния F-фактора в клетке различают 2 типа доноров:

F^+ - доноры, когда F-фактор находится в автономном от хромосомы состоянии. При скрещивании F^+ -доноров с F^- -реципиентами передается в основном только F-фактор:



Hfr - доноры, когда F - фактор интегрирован в хромосому. При скрещивании Hfr-доноров с F^- -реципиентами передаются хромосомные гены и образуются по ним рекомбинанты:

$\text{♂Hfr} \times \text{♀F}^- \rightarrow \text{F}^-$ рекомбинанты по хромосомным маркерам.

Интеграция F - фактора в бактериальную хромосому обратима. F-фактор может быть высвобожден из хромосомы и тогда клетка Hfr становится F⁺-клеткой. Этот процесс вырезания или эксцизии F-фактора происходит примерно с той же частотой, что и интеграция. При правильной эксцизии разрыв и воссоединение молекул ДНК происходит в том же самом месте, что и интеграция. Однако, в редких случаях может происходить неправильная эксцизия F-фактора из бактериальной хромосомы. Это обязано незаконной или запрещенной рекомбинации, возникающей между негомологичными генетическими маркерами полового фактора и хромосомы. В результате такой незаконной рекомбинации в состав полового фактора включается участок бактериальной хромосомы. Такие F-факторы, содержащие фрагменты хромосомной ДНК, получили название F[']-факторов. Штаммы содержащие такие F[']-факторы называются **F[']-донорами** или **донорами промежуточного типа**.

Первый F[']-донор был получен Ф.Жакобом и Е.Адельбергом у бактерий *E. coli*. Клетки этого штамма содержат автономный половой фактор, в состав которого включены гены *lac*-оперона хромосомы. В бактериальной хромосоме *lac*-оперон отсутствует (рис. 66).

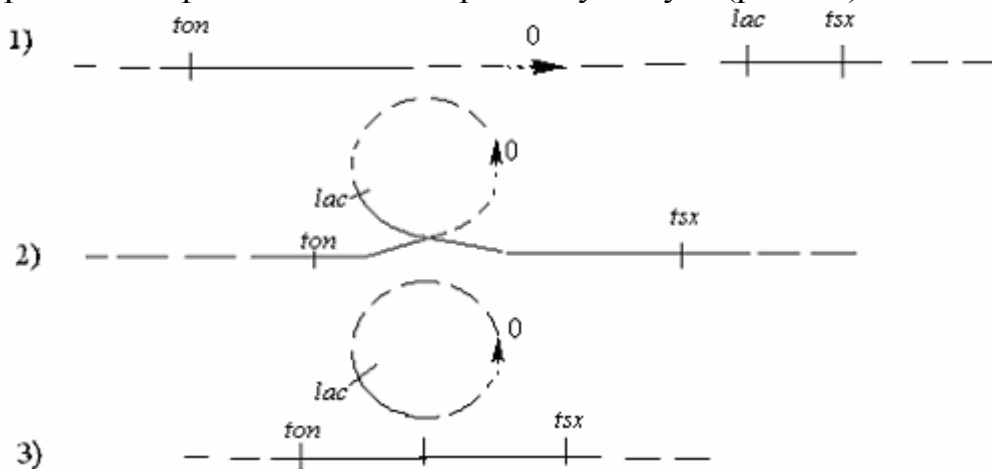
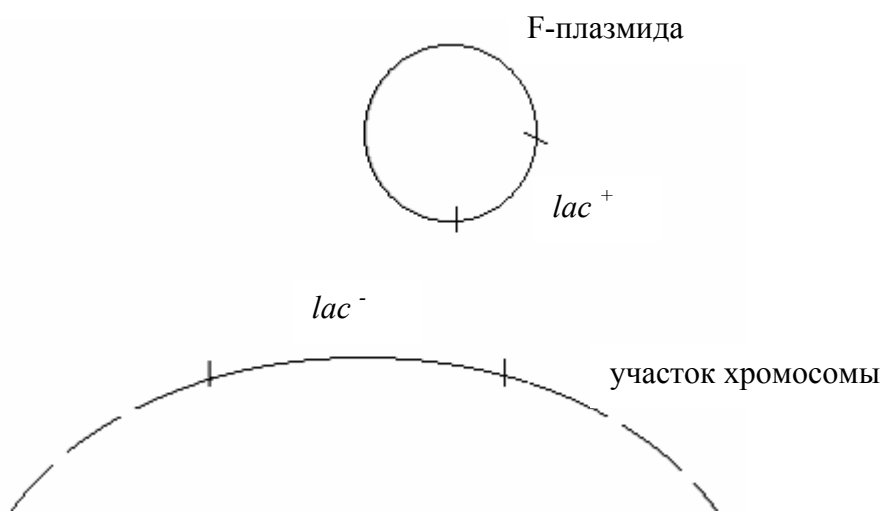
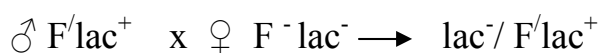


Рис. 66. Схематическое образование F[']lac⁺-фактора:

- 1) F-фактор, включенный в хромосому Hfr-бактерий между геном *ton* и *lac*-опероном;
- 2) при «вырезке» F-фактора образуется неправильная петля, вовлекающая участок бактериальной хромосомы с *lac*-опероном;
- 3) образовавшаяся кольцевая ДНК F[']-фактора содержит в своем составе бактериальный *lac*-оперон. В бактериальной хромосоме этот оперон отсутствует.

В соответствии с величиной фрагмента хромосомы, перешедшего в состав генома F'-фактора, различают малые и большие F'-факторы. Малые F'-факторы несут в своем составе один ген, большие – до 1/2 бактериальной хромосомы.

F'-факторы, как и обычные F-факторы с высокой эффективностью передаются при конъюгации F⁻-клеткам. При этом они с высокой частотой переносят в реципиентные клетки и бактериальные маркеры, которые включены в их состав. Это явление получило название **сексдукции** или **F-дукции**:



Реципиентная клетка из F⁻ Lac⁻ превращается в Lac⁻/FLac⁺, т.е. она способна сбраживать лактозу. Эта клетка несет аллель как lac⁺ (находится в составе F'-фактора), так и аллель lac⁻ (в хромосоме). Такие клетки, в которых определенные нуклеотидные последовательности представлены в двойном наборе – в хромосоме и в F'-факторе, называются **гетерогенотами**. У таких клеток обнаружена повышенная способность к формированию Hfr-клеток. При этом интеграция F'-фактора осуществляется в области хромосомы гомологичной фрагменту, включенному в состав F'-фактора. Осуществляется гомологичная рекомбинация и F'-фактор включается в хромосому. Таким образом, наличие небольшой части хромосомного материала в F'-факторе сообщает ему, так называемый «инстинкт дома» в отношении специфического участка хромосомы, т.е. интеграция происходит всегда в данном месте. В противоположность этому, как мы установили ранее, F-фактор F⁺-клетки не имеет предпочтительного места соединения с хромосомой.

F'-факторы как и F-факторы могут спонтанно утрачиваться бактериальными клетками и тогда клетки мужского типа превращаются в клетки женского типа. Частоту элиминации можно увеличить, действуя на бактерии рядом агентов, таких как акридиновые красители, антибиотик рифампицин, тиминовое голодание и т.п.

7.5.2.1. Механизм передачи генетического материала при конъюгации

На первых этапах после смешивания донорных и реципиентных клеток в результате случайных контактов формируются конъюгационные пары. Контакты клеток беспорядочны, так как, по-видимому, не существует специфических факторов, обуславливающих притяжение между бактериями противоположных полов. Однако установлено, что скорость конъюгации в определенных пределах пропорциональна концентрации бактерий. Поэтому для скрещивания берут культуры бактерий с концентрацией $5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^8$ клеток/мл. Обычно донорные бактерии берут на порядок меньше, чем реципиентные.

Перенос генетического материала от донора к реципиенту происходит только в том случае, когда образуются эффективные конъюгационные пары. С помощью электронного микроскопа показано, что между клетками в таких парах образуется конъюгационный мостик. Структуры, с помощью которых обеспечивается образование эффективных конъюгационных пар, были открыты после выделения F-донорспецифических бактериофагов (фагов, репродуцирующихся только в клетках, содержащих F-фактор). Первый такой бактериофаг был выделен в 1960 году из сточных вод. Это РНК-содержащий икосаэдрический бактериофаг f_2 кишечной палочки. Кроме бактериофага f_2 к донорспецифическим фагам *E.coli* относятся: f_1 , MS2, Q β , R17 и другие. Из них фаг f_1 является нитевидным ДНК-содержащим, а все остальные относятся к РНК-содержащим икосаэдрическим бактериофагам. В отличие от всех известных бактериофагов, которые адсорбируются на клеточной стенке, эти вирусы адсорбируются на половых ворсинках или F-пилях.

Половые пили служат для взаимного узнавания при контакте между донорной и реципиентной клетками. Они прикрепляются к специфическим рецепторам, находящимся на поверхности реципиентных клеток. Благодаря способности половых пилей сокращаться клетки донора и реципиента вступают в контакт «клеточная стенка к клеточной стенке», а затем между клетками возникает более сложное обра-

зование конъюгационный мостик, по которому ДНК переходит из клетки-донора внутрь клетки-реципиента.

Во время конъюгации в донорных клетках осуществляется репликация ДНК по типу «котящегося кольца» или «разматывающегося рулона». Для этого фермент эндонуклеаза в точке начала передачи F-фактора разрезает одну из нитей ДНК с образованием 5'- и 3'-ОН-концов. На 3'-ОН-конце с помощью ДНК-полимеразы III происходит наращивание нуклеотидов комплементарных нуклеотидам неповрежденной нити ДНК. Второй конец (5'-конец) разрезанной нити начинает отходить в виде «хвоста» и переходит по конъюгационному мостику в реципиентную клетку, где служит матрицей для синтеза второй нити (рис. 67).

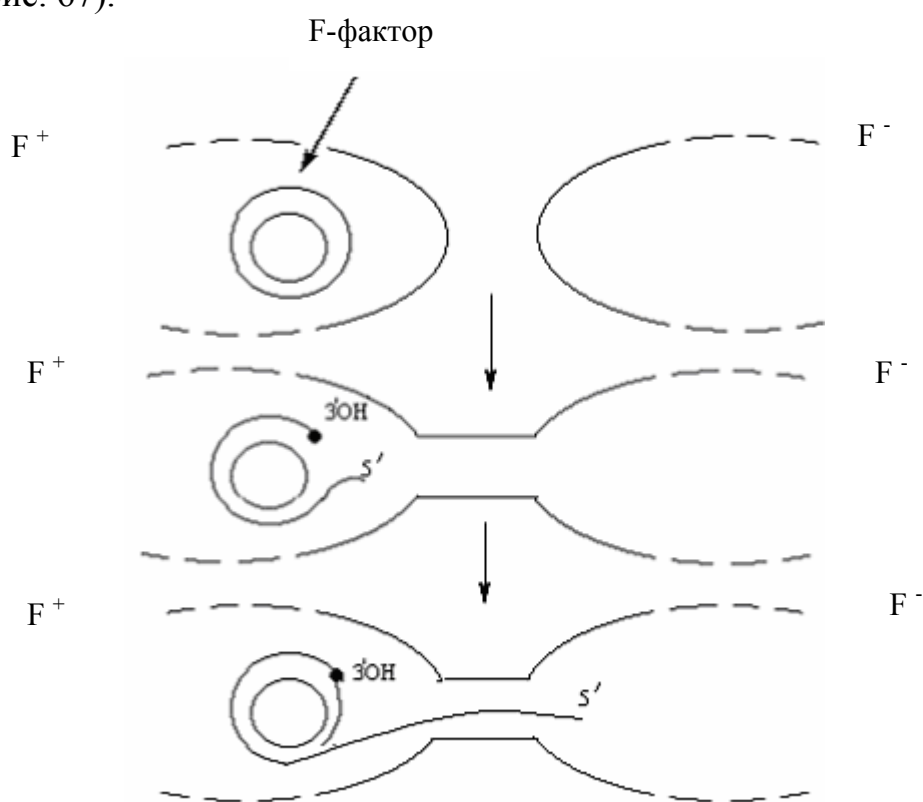


Рис. 67. Передача генетического материала по механизму котящегося кольца

Отреплицированная в реципиентной клетке двухнитевая ДНК вступает в гомологичную рекомбинацию с ДНК реципиентной клетки.

Образуются рекомбинанты, которые при данном способе обмена генетической информацией называются трансконъюгантами.

Таким образом, в процессе конъюгации можно различить следующие стадии:

- образование неэффективных пар;

- образование эффективных конъюгационных пар;
- перенос генетического материала из донорных клеток в реципиентные клетки;
- постконъюгационный синтез донорной ДНК в реципиентной клетке;
- гомологичная рекомбинация перенесенного фрагмента донорной ДНК с ДНК реципиентной клетки.

Применение конъюгации:

1. В процессе конъюгации можно передавать из одних клеток в другие клетки многие генетические маркеры. Показано, что при конъюгации вся хромосома бактерий *E.coli* передается за 100 минут. В «мягких» условиях можно добиться переноса всей хромосомы и даже повторной передачи хромосомы по механизму «котящегося кольца» или «разматывающегося рулона», если в хромосоме нет профага.

2. Метод конъюгационного скрещивания удобен для картирования хромосомы. Карта хромосомы у бактерий строится в минутах. У бактерий *E.coli* началом карты (0 мин) являются точки локализации генов, ответственных за синтез треонина и лейцина.

3. Конъюгация используется для изучения генетического аппарата у бактерий.

4. Конъюгация имеет место в природе и поэтому она является важным фактором изменчивости бактерий.

7.5.3. Трансдукция

Трансдукция была открыта в 1952 году, после того как была уже описана трансформация у пневмококков и конъюгация у бактерий *E.coli*.

Циндер Н., будучи ещё студентом, работал в лаборатории Е.Ледерберга. Он пытался обнаружить конъюгацию у бактерий *Salmonella typhimurium*. В его распоряжении было 20 моноауксотрофных штаммов *S. typhimurium*. Циндер Н. смешивал эти штаммы попарно в различных комбинациях и пытался выявить прототрофное потомство. В результате в 9 случаях из 79 исследованных комбинаций с частотой 10^{-5} – 10^{-6} он выявил прототрофные клоны. Поскольку исходные штаммы на минимальной среде не давали ревертантов, то Н.Циндер сделал вывод, сто между штаммами *S.typhimurium* осуществляется конъюгация, при которой происходит передача наследственной информации. Для подтверждения этого Н.Циндер и Е.Ледерберг повторили опыт Б.Дэвиса с U-образной пробиркой, разделенной стеклян-

ным фильтром, не пропускающим бактериальные клетки. В опыте использовались 2 штамма бактерий *S. typhimurium*:

S. typhimurium 2A *his*⁻ и *S. typhimurium* 22 A *trp*⁻.

В одну ветвь U-образной пробирки вносили культуру штамма 22A в концентрации $1 \cdot 10^8$ клеток/мл, в другую ветвь такое же количество клеток штамма 2A. После определенного периода инкубации в ветви пробирки, в которую были внесены клетки штамма 22A, Н.Циндер и Е.Ледерберг обнаружили прототрофные клетки с частотой $1 \cdot 10^{-5}$. В той ветви пробирки, в которую были внесены клетки штамма 2A, прототрофы отсутствовали (рис. 68).

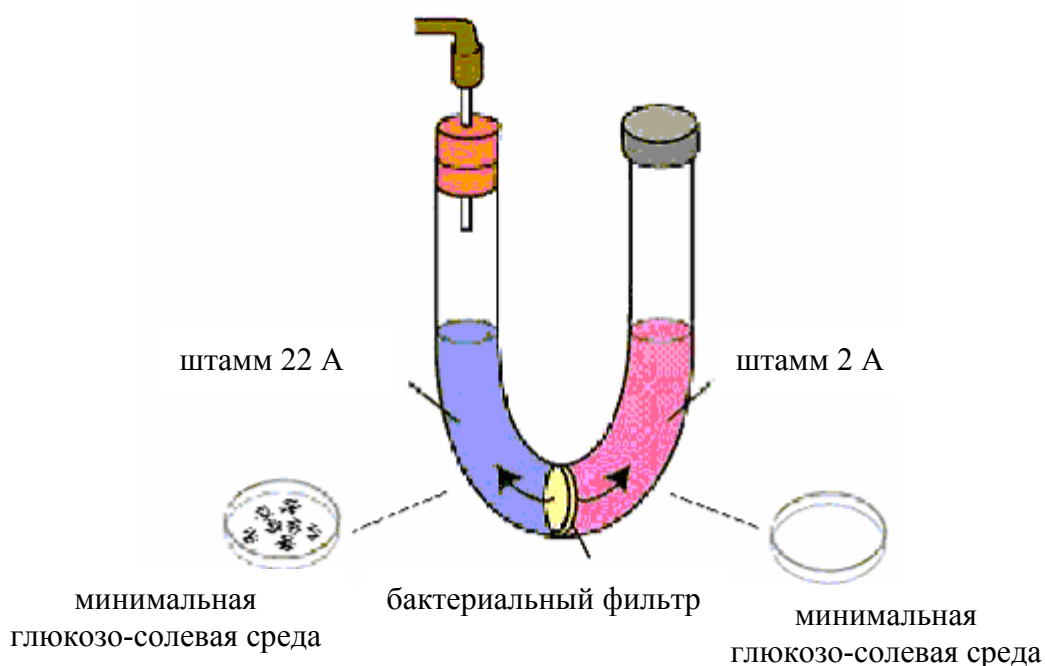


Рис. 68. Схематическое изображение классического опыта Н.Циндера и Е.Ледерберга

Полученные результаты не подтвердили предположение Н.Циндера и Е.Ледерберга о конъюгационном переносе наследственной информации у штаммов 2A и 22A *S. typhimurium*. Последующая проверка этих штаммов показала, что штамм 22A загрязнен фагом P22. Этот фаг способен инфицировать и лизировать клетки штамма 2A. После проникновения через стеклянный фильтр этот фаг инфицировал клетки штамма 2A, репродуцировался и лизировал их. При этом освобождался фильтрующийся агент (ФА) (так его называли Н.Циндер и Е.Ледерберг). Он в свою очередь проникал через стеклянный фильтр. Под влиянием ФА некоторые клетки штамма 22A приобретают спе-

цифические наследственные свойства, характерные для того штамма (штамма 2А), из которого выделялся ФА – способность синтезировать триптофан. Было установлено, что активность агента, способного к фильтрации (ФА), не утрачивается при обработке его ДНКазой. Значит это не трансформация. Вместе с тем показано, что свойства фильтрующегося агента идентичны свойствам фага Р22. Был сделан вывод, что фаг Р22 переносит наследственную информацию от клеток штамма 2А в клетки штамма 22А.

Явление переноса генетической информации от клетки-донора к клетке-реципиенту с помощью фага было названо **трансдукцией**.

Трансдукция основана на том, что в процессе размножения фагов в бактериях могут образовываться фаговые частицы, которые наряду с фаговой ДНК или вместо нее содержат фрагменты бактериальной ДНК. Такие фаговые частицы называются **трансдуцирующими**. По морфологии и адсорбционным свойствам они ничем не отличаются от обычных фаговых вирионов, но при заражении ими новых клеток, передают генетические детерминанты предыдущего хозяина. Таким образом, чтобы осуществить трансдукцию необходимо размножить фаг на клетках штамма-донора, а затем заразить полученным фаголизатом клетки-реципиента. Отбор трансдуктантов проводят на селективных средах, где не могут расти исходные реципиентные клетки (рис. 69).

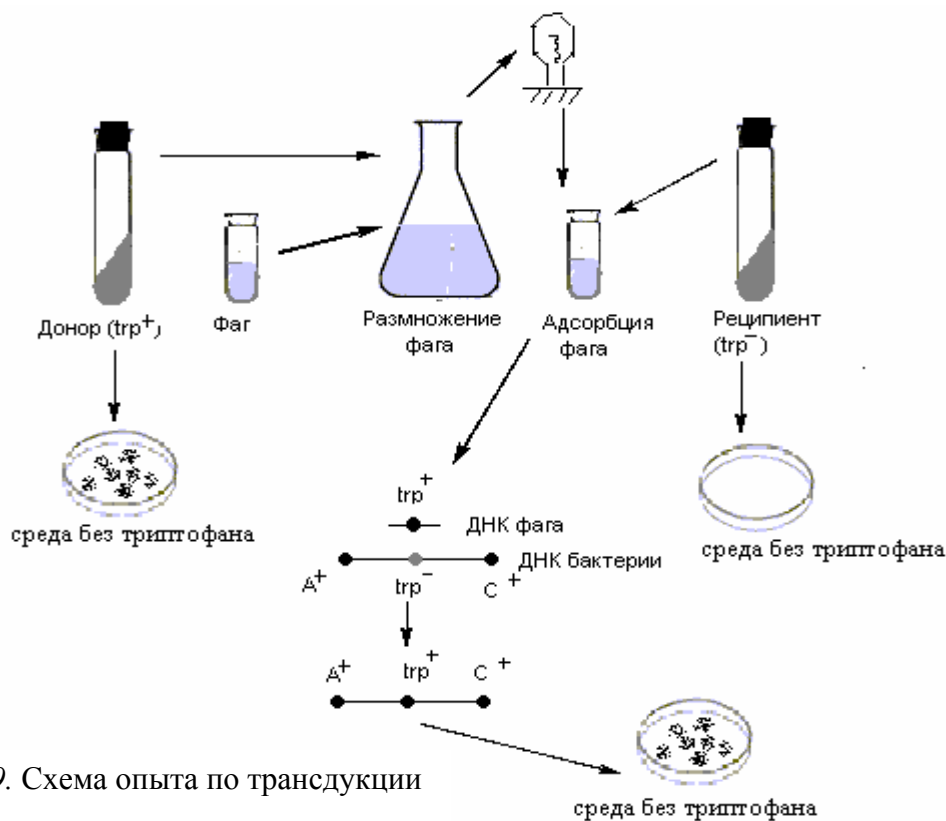


Рис. 69. Схема опыта по трансдукции

Изучение трансдукции показало, что одни фаги могут переносить разные бактериальные гены, а другие – только определенные гены. В соответствии с этим трансдукцию принято делить на:

- генерализованную (неспецифическую или общую);
- ограниченную или специфическую.

При генерализованной трансдукции может трансдуцироваться любой бактериальный ген примерно с одинаково высокой частотой. При специфической трансдукции могут переноситься строго определенные фрагменты ДНК.

В осуществлении генерализованной трансдукции бактериальный вирус является только переносчиком генетического материала бактерий. При специфической трансдукции вирус включает ДНК бактерий в свой геном и передает ее, лизогенизируя бактерии-реципиенты.

Разберем как осуществляется генерализованная и специфическая трансдукция.

7.5.3.1. Генерализованная трансдукция

Одним из умеренных бактериофагов, осуществляющих общую или неспецифическую трансдукцию, является уже упоминаемый нами фаг P22 *S. typhimurium*, с которым работали Н.Циндер и Е.Ледерберг. Следовательно, эти ученые открыли неспецифическую трансдукцию. К фагам, осуществляющим общую трансдукцию относятся также фаги: P1 *E.coli*, PBS1 *B.subtilis* и другие.

Генерализованная трансдукция обеспечивается дефектными частицами фагов. Образование таких частиц происходит в ходе репродукции фагов, сопровождающейся распадом бактериальной хромосомной ДНК. Следует отметить, что образование их может происходить как при литическом развитии фага (фаги P22 *S. typhimurium* и P1 *E.coli*), так и после индукции профага (фаг P1 *E.coli*). При этом часть фаговых оболочек начинает упаковываться не фаговой, а бактериальной ДНК. Размеры фрагментов бактериальной ДНК, включающейся в такие частицы, не превышают объем головки, т.е. упаковаться может столько сколько вмещает головка фага. Упаковываться в фаговые головки могут самые разнообразные фрагменты бактериальной хромосомы.

Если полученным фаголизатом, содержащим как нормальные, так и дефектные частицы, обработать клетки штамма-реципиента, то заражение их нормальным фагом ведет, как правило, к лизису клеток. Однако некоторые клетки инфицируют дефектные трансдуцирующие фаги. В клетки поступают короткие фрагменты двунитевой ДНК до-

нора. Циркуляризации бактериальной ДНК при этом не происходит, т.е. в рекомбинацию с ДНК реципиента вступают линейные фрагменты ДНК донора. Рекомбинация, происходящая при общей трансдукции, находится под контролем *recA*-гена, т.е. это общая гомологичная рекомбинация, осуществляемая путем реципрокного обмена соответствующими гомологичными участками. Возникают рекомбинанты, называемые трансдуктантами. Трансдуктанты нелизогенны и не обладают иммунитетом к фагам, так как трансдуцирующие частицы, вызвавшие образование их, не содержат фаговой ДНК (рис. 70).

При генерализованной трансдукции переносится может любой бактериальный признак с частотой 10^{-5} – 10^{-6} . Количество бактериальной ДНК, которое может переноситься фагом обычно составляет 1–2 % от всего количества ДНК, содержащегося в клетке. Исключение составляет бактериофаг PBS1 *B.subtilis*, который может трансдуцировать до 8% генома хозяина.

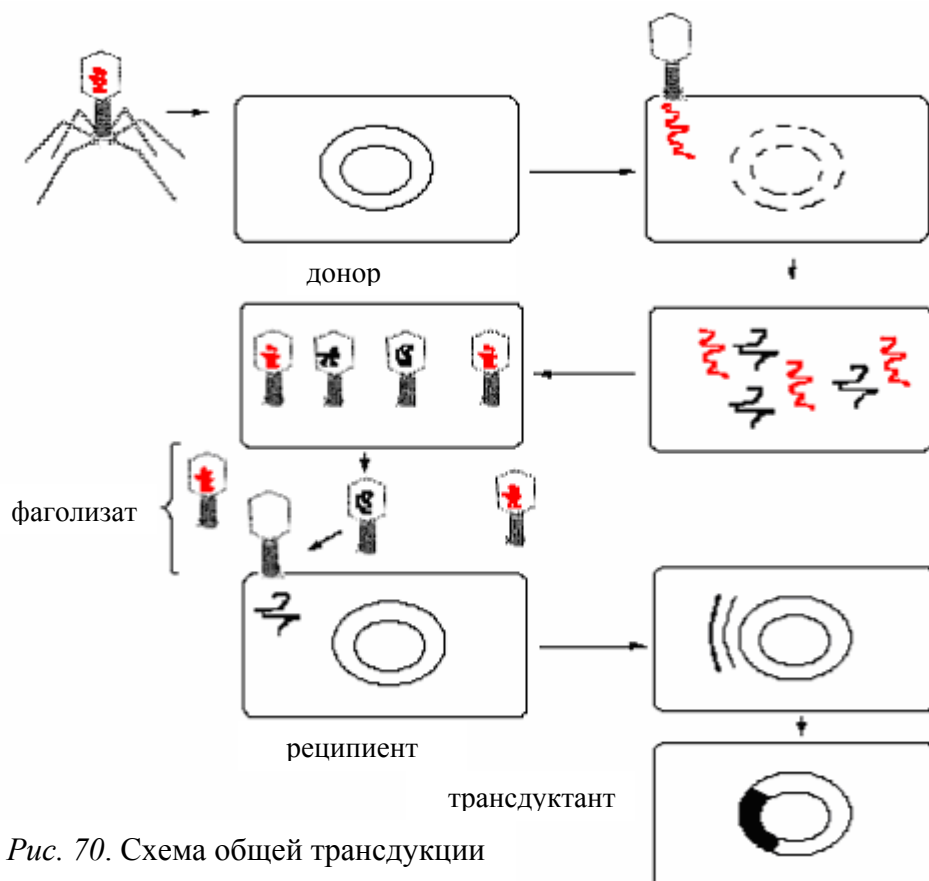


Рис. 70. Схема общей трансдукции

Однако при общей или генерализованной трансдукции могут возникать не только истинные рекомбинанты-трансдуктанты, в которых привнесенный ген наследуется стабильно из поколения в поколение

(полная или завершенная трансдукция), но и abortивные трансдуктанты. При abortивной или незавершенной трансдукции внесенный дефектным фагом фрагмент бактериальной хромосомной ДНК донора не рекомбинирует с хромосомной ДНК реципиентной клетки. Находясь в реципиентной клетке привнесенный ген экспрессируется, что придает клетке новый фенотип, например, приобретение клеткой-реципиентом способности синтезировать какую-то аминокислоту. Однако ген экзогеноты (привнесенный ген) не способен реплицироваться. Вследствие этого при делении клетки он передается только одной из дочерних особей, но во второй клетке еще остается белок – продукт экспрессии привнесенного гена. Поэтому эта клетка в какой-то мере сохраняет привнесенный фенотип. С ростом числа делений идет разведение данного продукта, поэтому abortивные трансдуктанты на селективной среде формируют микроколонии по сравнению с колониями истинных трансдуктантов. Такие микроколонии abortивных трансдуктантов содержат только одну клетку, несущую экзогеноту или привнесенный фагом ген донорной ДНК (рис. 71).

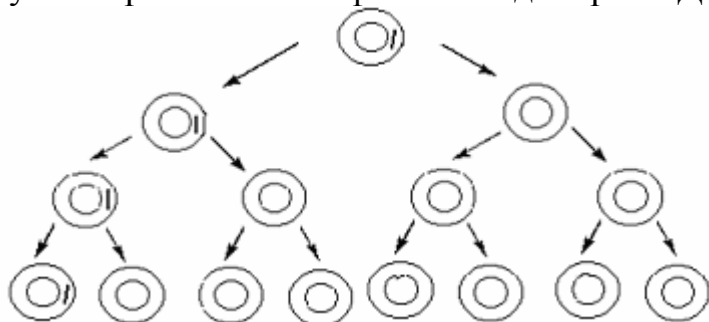


Рис. 71. Abortивная трансдукция

Впервые abortивную трансдукцию обнаружили при передаче генов, ответственных за жгутикообразование, по образованию на питательной среде «ползущих следов» или шлейфов. При исследовании под микроскопом таких клонов оказалось, что жгутик, а следовательно подвижность, сохраняет одна клетка. При посеве таких клонов в малоплотную (полужидкую) питательную среду клетки растут по уколу и появляется в среде волнистая структура («шлейф», «ползущий след»): подвижная клетки передвигается, делится и по дороге оставляет неподвижное потомство.

Установлено, что соотношение между завершенной и abortивной трансдукцией примерно равно 1:10, т.е. abortивная трансдукция происходит чаще чем полная завершенная.

7.5.3.2. Специфическая трансдукция

Специфическая трансдукция была открыта в 1956 году М.Морзе и супругами Е. и Дж.Ледерберг. Характерной особенностью специфической трансдукции является то, что каждый специфически трансдуцирующий фаг передает только определенную, весьма ограниченную область бактериальной хромосомы. Если в генерализованной трансдукции фаг выступает в качестве «пассивного» переносчика генетического материала бактерий, а генетическая рекомбинация у трансдуцируемых бактерий происходит по общим закономерностям рекомбинационного процесса, то при специфической трансдукции фаг не только переносит генетический материал, но и обеспечивает его включение в бактериальную хромосому.

Наиболее известным примером специфической трансдукции является трансдукция, осуществляемая фагом λ , который способен заражать клетки бактерий *E.coli* (рис. 72).

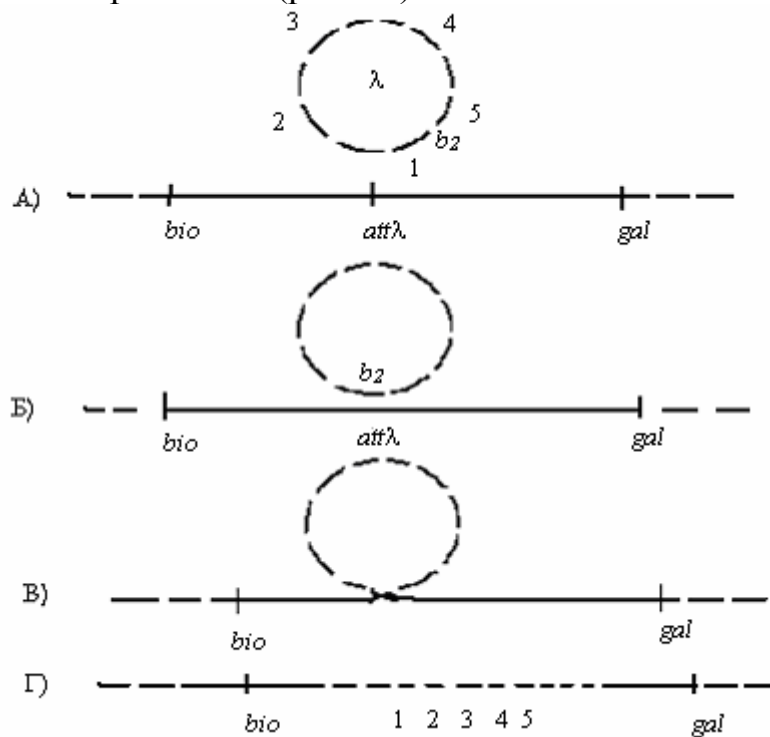


Рис. 72 . Включение профага λ в хромосому *E.coli*

Примечание: А – кольцевая хромосома (ДНК) вегетативного фага λ и бактериальная хромосома *E.coli*. 1,2,3,4,5 – условно обозначенные гены фага λ ; *bio*; *att* λ ; *gal* - бактериальные гены; Б – синапс, образуемый между фаговой и бактериальной хромосомой в области бактериального гена *att* λ ; В – разрыв хромосомы фага в точке между генами 1 и 5 (область *b*₂) и разрыв хромосомы бактерий в области

attλ. Возникновение кроссинговера между хромосомой фага и бактерии; Г – образование непрерывной генетической структуры, в которой встроена ДНК фага.

Умеренный фаг λ при лизогенизации бактерий встраивается в их хромосому только в одном месте на участке между локусами *gal* и *bio* в результате сайт-специфической рекомбинации (разрыв и перекрестное воссоединение цепей ДНК). Этот участок получил название *attλ*. Вырезание (эксцизия) профага из хромосомы при индукции профага осуществляется также по механизму сайт-специфической рекомбинации.

Сайт-специфическая рекомбинация происходит точно, но не безошибочно. Приблизительно один раз на 1 миллион при эксцизии профага рекомбинация осуществляется не в *attλ*-сайте, а захватывает участки *gal* или *bio*. Полагают, что это обусловлено «неправильным» образованием петли при дезинтеграции профага. В результате этого прилегающая к профагу область бактериального генома выщепляется из состава хромосомы и переходит в состав генома свободного фага. Соответствующая по расположению в петле область генома профага остается в бактериальной хромосоме (рис. 73). Таким образом, между профагом и бактериальной хромосомой осуществляется генетический обмен. Встраивающийся в геном фага бактериальный генетический материал может заместить до 1/3 генетического материала фага.

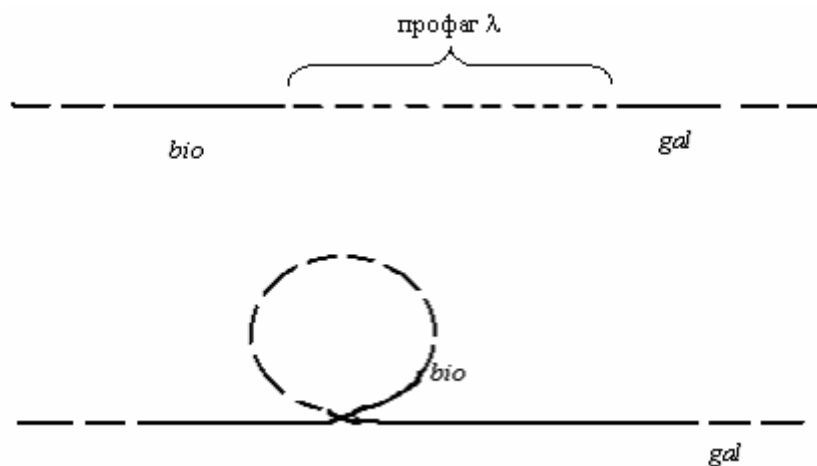


Рис. 73. Схематическое образование дефектных фаговых частиц

После упаковки такой фаговой ДНК, в которой ее часть замещена бактериальной ДНК, в фаговую головку образуются дефектные фаговые частицы. Фаг дефектен, потому что емкость головки ограничена и при включении в его геном фрагмента бактериальной ДНК, часть фагового генома остается в хромосоме бактерий. Если дефект несущест-

венен, то фаг живет, так как его белковая оболочка недефектна (адсорбция возможна). Такой дефектный фаг может заражать другие клетки, но не может вызвать репродуктивную инфекцию, так как гены, ответственные за репродукцию, отсутствуют. Если в таком дефектном фаге в ДНК сохранились липкие концы, обеспечивающие превращение ее в циркулярную форму, то ДНК дефектного фага вместе с фрагментом бактериальной ДНК может встроиться в ДНК реципиентных бактерий и вызвать их лизогенизацию.

Было установлено, что при индукции профага λ чаще образуются дефектные частицы, содержащие в своем геноме гены локуса *gal*. Такие дефектные частицы обозначают $\lambda dgal$ (от фаг λ , *defective*, *gal*). Если в геноме фага λ содержится ген, ответственный за синтез биотина, то – $\lambda dbio$.

Следовательно, если фаголизатом, полученным после заражения донорных бактерий фагом λ , в котором содержится дефектные частицы, обработать реципиентные клетки bio^- или gal^- , то с частотой 10^{-5} – 10^{-6} образуются трансдуктанты bio^+ или gal^+ .

Специфическая трансдукция у *E.coli* осуществляется не только фагом λ , но и родственными ему фагами, получившими наименование ламбдоидных фагов. К числу таких фагов относятся Phi 80, 434, 21 и некоторые другие.

В частности фаг Phi 80 включается в хромосому вблизи генов, кодирующих ферменты, ответственные за синтез триптофана. По этой причине фаг Phi 80 пригоден для переноса генов *trp*.

Было установлено, что фаг P22 *S.typhimurium* кроме общей трансдукции может осуществлять и специфическую трансдукцию. При литическом цикле развития бактериофаг P22 может осуществлять общую трансдукцию, а при лизогенизации – специфическую. ДНК фага P22 интегрируется в участок хромосомы рядом с генами, ответственными за синтез пролина. Интеграция профага резко стимулирует образование специфически трансдуцирующих частиц.

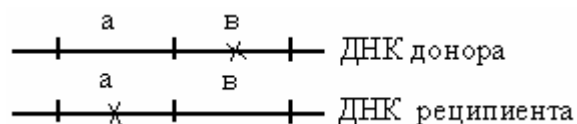
Таким образом, для осуществления специфической трансдукции необходима предварительная лизогенизация бактерий-доноров и последующая индукция профага. Образовавшиеся при этом дефектные трансдуцирующие частицы фагов заражают клетки реципиентного штамма, происходит их лизогенизация, т.е. встраивание профага с участком генома бактерий донора в хромосому реципиента.

Использование трансдукции:

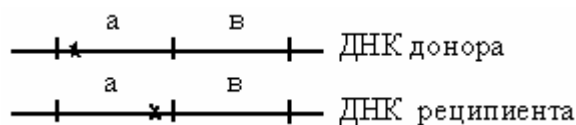
- можно трансдуцировать плазмиды и короткие фрагменты хромосомы донора;

- для конструирования штаммов заданного генотипа, в частности изогенных штаммов. Здесь малый размер передаваемых фрагментов обеспечивает преимущество трансдукции перед конъюгацией. Изогенные штаммы, сконструированные при помощи генерализованной трансдукции, различаются только по участку хромосомы, переносимому трансдуцирующим фагом;

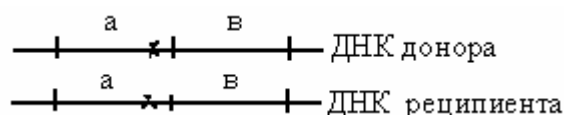
- для точного картирования бактериальных генов, установления порядка и их расположения в оперонах и тонкой структуры отдельных генетических детерминант. Это делают с помощью **комплементационного теста**. Известно, что для синтеза определенной группы продуктов необходимо функционирование нескольких генов. Допустим, что для синтеза какого-то фермента нужны гены *a* и *b*. Пусть есть 2 фенотипически одинаковые мутанты (AB)⁻ и (AB)⁻, но мы не знаем они генетически идентичны или различны. Для идентификации генотипа проводят трансдукцию, т.е. размножают фаг на клетках одной популяции, а затем фаголизатом заражают вторую популяцию. Если затем при высеве на селективную среду формируются большие колонии истинных трансдуктантов и маленькие колонии abortивных трансдуктантов, тогда делают вывод, что мутации находятся в разных генах:



Если образуются только колонии истинных трансдуктантов, тогда делают вывод, что мутации находятся в одном гене, но в разных сайтах:



Если трансдуктанты вообще не образуются, то данные мутации идентичны:



7.6. Репарация повреждений ДНК у бактерий

Явление репарации или восстановления жизнеспособности клеток, после действия на них γ - и рентгеновых лучей было открыто в 1949 году в опытах на дрожжах, а затем и на бактериях.

Если бактериальные клетки облучить УФ-лучами, то они в основном гибнут, так как УФ-лучи поглощаются ДНК и в ней образуются димеры Тимина, что приводит к частичному или полному блокированию репликации.

Выявлены три основных механизма репарации ДНК после таких повреждений:

- фотореактивация;
- эксцизионная репарация;
- пострепликационная или рекомбинационная репарация.

Эксцизионную и пострепликационную репарации называют ещё темновой репарацией.

Фотореактивация – восстановление молекул ДНК, поврежденных УФ-лучами, в результате последующего воздействия на них видимого света. Бактериальные клетки содержат фермент фотореактивации – дезоксипиримидинфототиазу, синтез которого у бактерий *E.coli* детерминируется геном *phr*. Субстратом для этого фермента служат димеры тимина. Фермент находит на ДНК образовавшийся под действием УФ-лучей пиримидиновый димер и прочно связывается с ним. Если клетки перенести на видимый свет, то комплекс фермента фотореактивации и димеров тимина распадается при этом происходит восстановление нормальной структуры ДНК (т.е. мономеризация или расщепление димеров тимина).

Следует отметить, что фотореактивация может работать как на двунитевых, так и на одонитевых ДНК.

Системы **эксцизионной репарации** удаляют неправильно спаренные или поврежденные основания из ДНК и затем синтезируют новую последовательность ДНК, замещающую их.

Основной тип эксцизионной репарации схематически изображен на рисунке 74. Такая репарация состоит из нескольких этапов. На первом этапе поврежденная структура узнается эндонуклеазой, которая разрезает цепь ДНК на расстоянии восьми фосфодиэфирных связей с 5' - стороны и четырех или пяти связей с 3' - стороны от повреждения. На стадии вырезания 5' – 3' - экзонуклеаза удаляет поврежденный участок.

Образующийся одноцепочечный участок служит в качестве матрицы для ДНК-полимеразы I при синтезе цепи, замещающей вырезанную последовательность. Наконец, ДНК-лигаза ковалентно связывает 3'-конец нового материала со старым материалом.

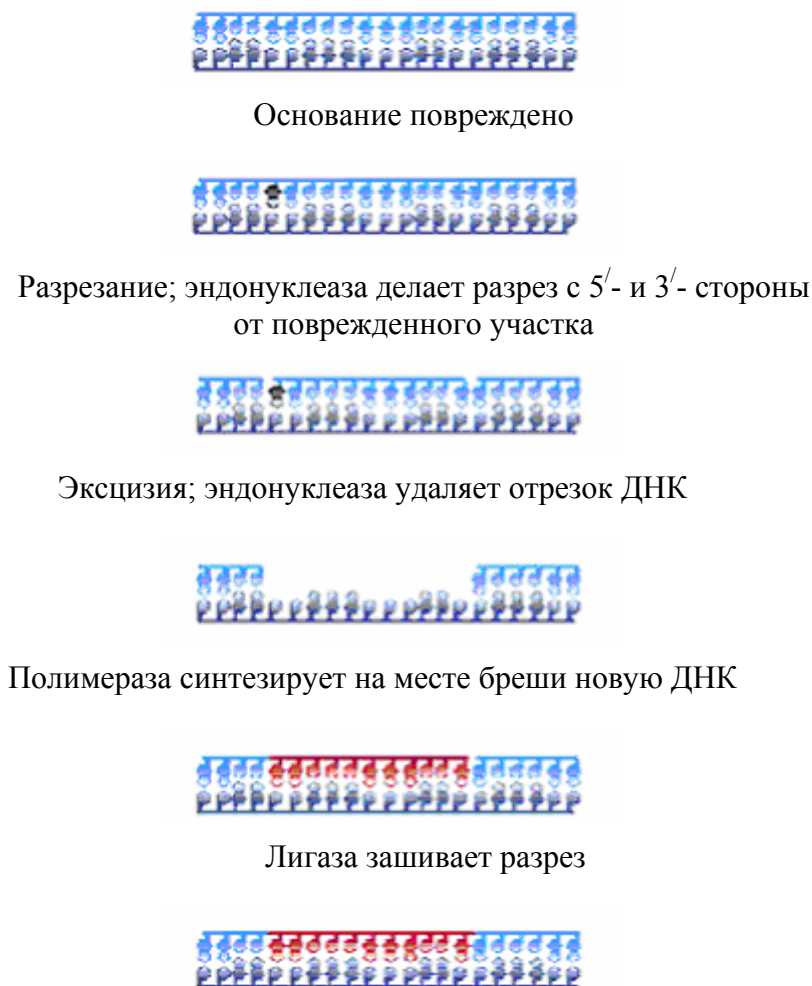


Рис. 74. Эксцизионная репарация ДНК.

Системы эксцизионной репарации включают у бактерий *E.coli* три гена: *uvr A*, *uvr B*, *uvr C*. Эти гены кодируют компоненты репарационной эндонуклеазы (*uvr ABC*- эндонуклеазы).

Если повреждение в ДНК представляет собой структурное изменение, например образование в результате УФ-облучения димера тимина, то поврежденные основания в процессе эксцизионной репарации удаляются, что ведет к восстановлению последовательности нуклеотидов, характерной для ДНК дикого типа. Однако в том случае, когда нарушение заключается в неправильном спаривании оснований, воз-

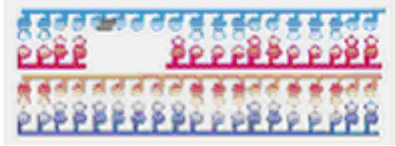
никающем в результате мутирования одного из них, репарирующая система не может определить, какое именно основание представляет дикий тип, а какое – мутантный. Все это узнается как два неправильно спаренных основания, каждое из которых может служить объектом для эксцизионной репарации. Если вырезается мутантное основание, то восстанавливается дикий тип последовательности. Но если случается, что вырезается исходное основание (дикого типа), то новая (мутантная) последовательность закрепляется.

Показано, что клетки *E.coli*, облученные ультрафиолетом, могут выжить с образованием жизнеспособного потомства даже в том случае, когда они не способны вырезать димеры тимина, т.е. когда у них не функционирует механизм эксцизионной репарации ДНК. Из этого можно заключить, что кроме механизма «иссечения и заполнения», в клетках должен существовать другой механизм, спасающий от генетических повреждений. Как показал П.Говард-Фландерс (1968), этот механизм состоит не в исправлении повреждения в облученной ДНК, а в исправлении дефектной дочерней ДНК, образующейся после репликации поврежденной родительской ДНК. В результате репликации поврежденной нити ДНК образуется ДНК-копия с односторонними пробелами или брешами напротив димера тимина в родительской матричной цепи ДНК. Это говорит о том, что наличие тиминового димера в матричной нити ДНК препятствует продвижению ДНК-полимеразы. Через 1 час после синтеза таких разорванных дочерних цепей эти бреши превращаются в непрерывные цепи ДНК нормальной длины. Бреши в дочерних нитях заполняются за счет **пострепликационной репарации**. Так как этот тип репарации не происходит в клетках дефектных по рекомбинации (*rec A*- мутантах), ее называют также **рекомбинационной репарацией**.

Пострепликационная репарация происходит следующим образом. При репликации дефектной (поврежденной) ДНК ДНК-полимераза останавливается перед димером тимина, а затем «перескакивает» через этот димер и продолжает репликацию, оставив за собой пробел в дочерней цепи. Этот пробел или брешь заполняется в результате рекомбинации со второй дочерней молекулой ДНК, образующейся при репликации. Обмен цепями между молекулами ДНК осуществляет белок *Rec A*. Возникающий пробел на второй молекуле заполняется ДНК-полимеразой, считывающей комплементарную нить с матричной неповрежденной нити. Фермент лигаза окончательно восстанавливает непрерывность цепи (рис. 75).

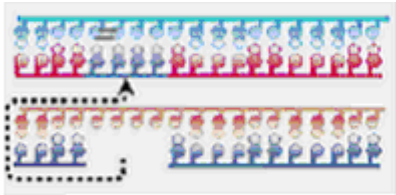


Репликация поврежденной ДНК



Реплика с повреждением одной цепи и
брешью в другой
нормальная реплика

Обмен между цепью с брешью и нор-
мальной цепью в другой молекуле



Брешь репарируется

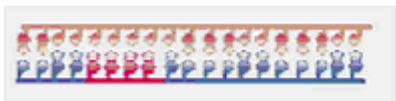


Рис. 75. Рекомбинационная репарация ДНК

Многие воздействия, которые повреждают ДНК или ингибируют ее репликацию у бактерий *E.coli*, индуцируют серию фенотипических изменений, получивших название **SOS-ответа**. Начало такого ответа определяется взаимодействием белка RecA с репрессором LexA. Ответ клетки на повреждающее воздействие начинается с активации протеазной активности белка RecA. Активирующим сигналом может быть присутствие одноцепочечной области в сайте повреждения. Активируясь, RecA-протеаза разрезает белок репрессор LexA. Белок LexA относительно стабилен в необработанных клетках, где он функционирует как репрессор многих оперонов, гены которых отвечают за многие репарационные функции. Протеолитическое разрезание репрессора координировано индуцирует все эти опероны. В настоящее время идентифицировано 11 генов, которые участвуют в SOS-ответе в результате активации их продуктов. Это пять генов *din* (от англ. *damage inducible*), гены *rec A*, *lex A*, *uvr A*, *uvr B*, *umu C* и *him A*. Некоторые из SOS-генов активны только в обработанных клетках; другие активны в необработанных, но уровень их экспрессии увеличивается при разрезании белка Lex A. Установлено, что белок Lex A репресси-

рует гены-мишени, связываясь с последовательностью ДНК длиной около 20 пар оснований, названной SOS-блоком. Эта последовательность симметрична, и ее копия представлена в каждом локусе-мишени. Подобно другим операторам, SOS-блоки перекрываются с соответствующими промоторами.

Белки RecA и LexA являются взаимными мишенями в SOS-цикле. RecA разрезает LexA, который в свою очередь репрессирует RecA. SOS-ответ вызывает амплификацию обоих белков.

При прекращении индуцирующего сигнала белок RecA теряет свою протеазную активность. В этот момент ген *lexA* имеет высокий уровень экспрессии; в отсутствие RecA-протеазы белки LexA быстро накапливаются в неразрезанной форме и выключают SOS-гены. Этим можно объяснить легкую обратимость SOS-ответа.

7.7. Система рестрикции и модификации бактериальной клетки

Явление рестрикции и модификации было подробно исследовано У.Арбером в конце 60-х годов прошлого столетия при изучении развития бактериофага λ в различных штаммах кишечной палочки.

Известно, что бактериофаги, как правило, проявляют специфичность в отношении хозяев, т.е. они инфицируют ограниченное число родственных штаммов, видов или родов бактерий. Это в первую очередь зависит от того имеются на бактериальных клетках рецепторы для адсорбции бактериофага или нет. Кроме того, у бактерий есть и другие механизмы, обуславливающие специфичность взаимоотношений с фагами. К ним относится система рестрикции и модификации.

Разберем работу этой системы на следующем примере. Бактериофаг λ на клетках штамма *E.coli* K дает эффективность посева равную единице (т.е. каждая частица бактериофага заражает бактериальную клетку, репродуцируется в ней и дает потомство, фиксируемое визуально по наличию на газоне чувствительных бактерий зон лизиса или бляшек). Если фаголизатом, полученным при выращивании фага λ на бактериях штамма *E.coli* K, инфицировать бактерии другого штамма *E. coli* B, то эффективность посева будет значительно ниже (10^{-4} – 10^{-5}). Следовательно, не каждая фаговая частица способна размножиться в клетках нового штамма. Если же немногочисленные фаговые частицы, образовавшиеся на штамме *E.coli* B, использовать для заражения другой культуры штамма *E.coli* B, то размножение бактериофага λ , вновь будет нормальным и эффективность посева составит единицу.

Однако, если перед заражением штамма *E. coli* В фаг снова пропассировать на штамме *E. coli* К, то на штамме *E. coli* В он будет развиваться плохо.

Таким образом, при смене хозяина наблюдается значительное ограничение размножения фага λ . Это ограничение получило название **рестрикции**. Рестрикция обусловлена расщеплением инфицирующей ДНК фага под действием фермента, специфичного для штамма-хозяина. Ферменты эти получили название **рестрикционных эндонуклеаз** или просто **рестриктаз**. Благодаря своему нуклеазному действию они препятствуют проникновению чужеродной ДНК в бактериальную клетку.

С другой стороны, если фаг проделал полный цикл развития в новом хозяине (в нашем примере штамм *E. coli* В), то в дальнейшем в этом же хозяине, он не подвергается ограничению или рестрикции. Почему это происходит? Дело в том, что в бактериальной клетке синтезируются кроме рестриктаз другие ферменты – метилазы, которые призваны защищать свою ДНК от воздействия собственных рестриктаз. Метилазы изменяют или модифицируют собственную ДНК путем метилирования или глюкозилирования аденина или цитозина. Этот процесс известен под названием модификации. ДНК бактериофага, прошедшего полный цикл развития в новом хозяине, под действием метилаз модифицируется таким же образом, как и ДНК клетки-хозяина. Она тоже метилируется и приобретает свойства, защищающие ее от воздействия рестрикционных ферментов данного штамма бактерий (рис. 76).

Следовательно, в клетках бактерий работает система рестрикции-модификации. Эту систему образуют два специфических для определенного штамма микроорганизма фермента – ДНК модифицирующий (аденин - или цитозинметилаза) и расщепляющий (рестриктаза). Эти ферменты узнают в ДНК одни и те же определенные короткие последовательности нуклеотидов – сайты. Метилаза, модифицируя определенные основания внутриклеточной ДНК, защищает ее от действия рестриктазы, узнающей ту же нуклеотидную последовательность.

Системы рестрикции и модификации широко распространены среди бактерий и найдены практически у всех исследованных бактерий. Недавно рестриктазы обнаружены и у некоторых видов дрожжей. Из разных штаммов микроорганизмов выделяют ферменты рестриктазы, различающиеся между собой характером действия на ДНК.

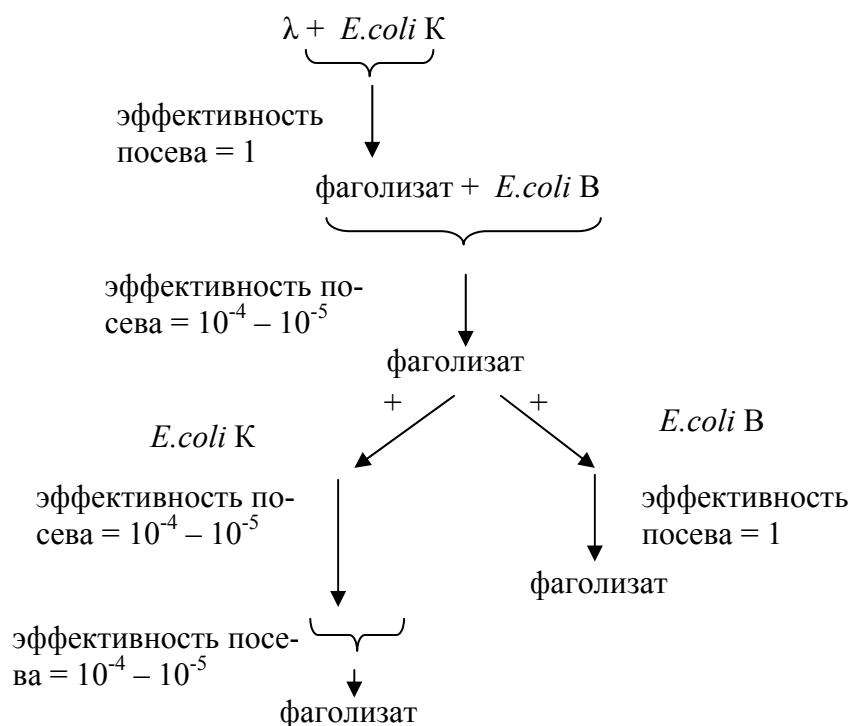


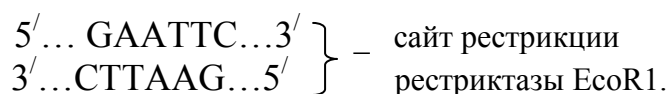
Рис. 76. Эксперимент по выявлению системы рестрикции и модификации у бактерий *E. coli*

Ферменты рестриктазы в научной литературе обозначаются буквой R. Название фермента складывается из первой буквы рода и двух первых букв вида бактерий, из которого был выделен фермент, например *Bacillus subtilis* – Bsu, *Escherichia coli* – Eco. Если же в определенном штамме имеется несколько систем рестрикции и модификации, то вводится дополнительное числовое обозначение. Ферменты системы рестрикции и модификации могут кодироваться плазмидами и фагами, и тогда к названию фермента добавляется название внехромосомного элемента. Например, название EcoR1 относится к ферменту-рестриктазе, детерминируемому плазмидой R1; название EcoP1 относится к ферменту, кодируемому фагом P1.

В настоящее время все известные рестриктазы по характеру расщепления нуклеотидной последовательности разделяют на 3 типа: I, II и III.

Рестриктазы I типа узнают сайт рестрикции, но расщепляют последовательность ДНК на произвольном расстоянии от сайта узнавания (от нескольких десятков до нескольких тысяч пар нуклеотидов). В результате образуются самые разнообразные фрагменты ДНК или рест-

рикти. Такие рестриктазы невозможно использовать для решения генно-инженерных задач. Рестриктазы III типа гидролизуют ДНК на расстоянии 20 – 35 нуклеотидных пар от сайтов узнавания и поэтому также довольно редко используются для практических целей. Для рестриктаз II типа характерно то, что у них сайты узнавания и места рестрикции совпадают. Обычно рестриктаза II типа узнает определенную последовательность на ДНК и гидролизует ее внутри последовательности сайта рестрикции. Сайты рестрикции рестриктаз II типа представлены симметричными при повороте на 180° последовательностями – **полиндрами**:



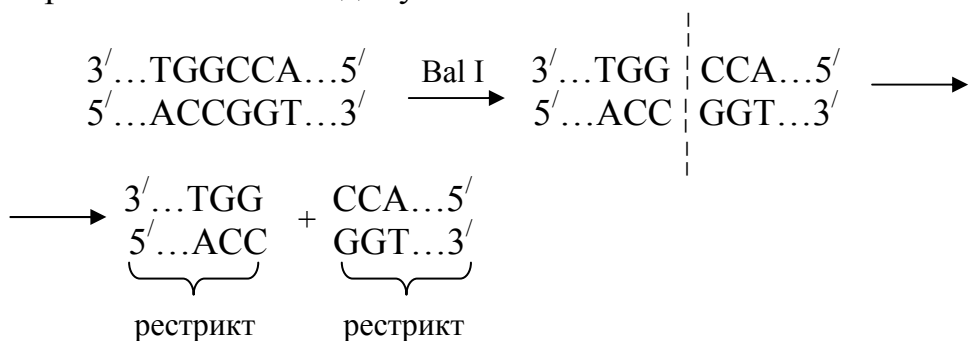
Рестриктазы II типа делятся на несколько классов в зависимости от размера сайта рестрикции и длины получаемых фрагментов ДНК:

1) мелкощеплящие – сайт рестрикции представлен четырьмя нуклеотидными парами;

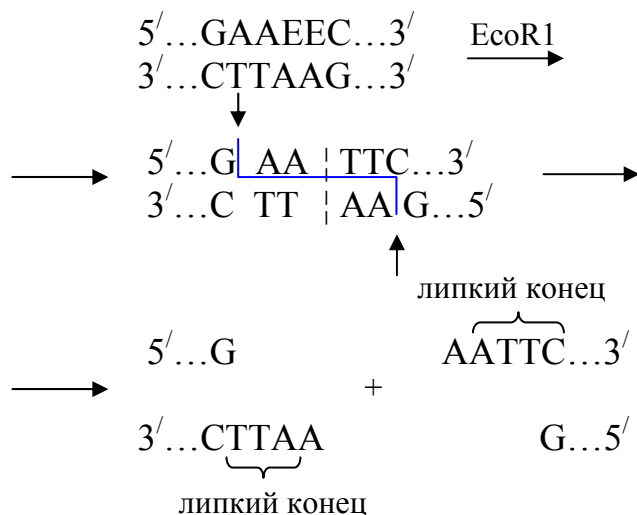
2) среднещеплящие – сайт рестрикции – 6–8 нуклеотидных пар;

3) крупнощеплящие – сайт рестрикции – 10–14 нуклеотидных пар.

Рестриктазы II типа делятся на две группы по тому, как они расщепляют последовательность ДНК. Одни из них осуществляют прямой разрез ДНК, т.е. по оси симметрии. В результате образуются фрагменты ДНК с «тупыми» или ровными концами. Примером таких рестриктаз является эндонуклеаза *Bal I* :



Рестриктазы второй группы осуществляют ступенчатый разрез, т.е. на некотором расстоянии от оси симметрии. В результате этого в месте разреза образуются неровные или «липкие» концы, т.е. рестриктики имеют на своих концах односторонние взаимно комплементарные участки. Примером таких рестриктаз является фермент *EcoRI*:



Рестриктазы, полученные после воздействия на разные молекулы ДНК определенной рестриктазы этой группы, имеют одинаковые «липкие» концы. Такие рестриктазы могут объединяться друг с другом с образованием рекомбинантных молекул ДНК. Это широко используется в генетической инженерии.

Ферментативная активность рестриктаз измеряется в единицах активности. Это такое количество фермента, которое необходимо для полного гидролиза за один час 1 мкг ДНК фага λ при оптимальных условиях. Оптимальные условия рестрикции для каждой рестриктазы являются индивидуальными и зависят от pH, ионной силы, присутствия определенных ионов, температуры проведения реакции.

7.8. Генетическая инженерия. Клонирование генов в клетках бактерий

Генетическая инженерия – совокупность методов, позволяющих создавать *in vitro* рекомбинантные молекулы ДНК, с последующим введением этих новых генетических структур в живую клетку.

Так как с химической точки зрения ДНК всех организмов однотипна, то *in vitro* возможно воссоединение фрагментов ДНК из любых организмов. В этом смысле рекомбинация *in vitro* отличается от обычной генетической рекомбинации, которая требует гомологии ДНК и, как правило, осуществляется в пределах одного или близкородственных видов. Другими словами, обычные методы обмена генетической

информацией (конъюгация, трансдукция, трансформация) позволяют провести обмен генами внутри одного вида, тогда как генетическая инженерия, в принципе, открывает возможность, для перемещения генов в пределах всех живых организмов.

Для того, чтобы осуществить генно-инженерный эксперимент, т.е. создать рекомбинантную ДНК и ввести ее в клетку другого организма необходимо соблюсти следующие условия:

- нужны инструменты для разрезания молекул ДНК на фрагменты;
- нужны инструменты для соединения фрагментов ДНК, выделенных из различных источников;
- необходим переносчик или вектор генов, предназначенных к введению в клетку другого организма. Этот вектор должен самостоятельно реплицироваться в клетке и обеспечивать репликацию введенного фрагмента ДНК;
- нужен способ введения гибридных или рекомбинантных молекул ДНК в живую клетку;
- нужно иметь метод отбора (селекции) клона реципиентной клетки, воспринявшей гибридную молекулу ДНК.

Самыми удобными векторами являются плазмиды, так как они, во-первых, способны реплицироваться независимо от хромосомной ДНК бактерий, т.е. это самореплицирующиеся структуры. Во-вторых, плазмиды содержат гены, благодаря которым по фенотипу можно отделить бактерии, содержащие плазмиды, от бактерий, лишенных плазмид. Например, R-плазмиды содержат структурные гены, ответственные за устойчивость к антибиотикам. При высеве бактерий, содержащих такие R-плазмиды, на среду с антибиотиком они будут расти и формировать колонии. Бактерии, лишенные таких плазмид, на среде с антибиотиком не вырастут.

Резать молекулы ДНК на фрагменты можно с помощью ферментов рестриктаз. Необходимо подобрать специфическую рестриктазу, которая имела бы сайты узнавания на двух молекулах ДНК (плазмиде и ДНК, из которой вырезаются переносимые гены) и резала бы их с образованием «липких» концов. С другой стороны, рестриктаза не должна резать ДНК плазмиды в области, ответственной за репликацию, и в области структурных генов, детерминирующих фенотип плазмиды.

Соединять или сшивать фрагменты ДНК можно с помощью ферментов полинуклеотидлигаз.

Вводить рекомбинантные молекулы ДНК можно с помощью трансформации. Рекомбинантной ДНК обрабатывают реципиентные клетки (клетки, в которые клонируется нужный ген) и через определенный промежуток времени выдерживания при оптимальной температуре смесь высевают на селективную среду, позволяющую отобрать по фенотипу клоны, воспринявшие плазмиду.

Схема эксперимента по созданию рекомбинантной ДНК и клонированию генов в клетках бактерий представлена на рисунке 77.

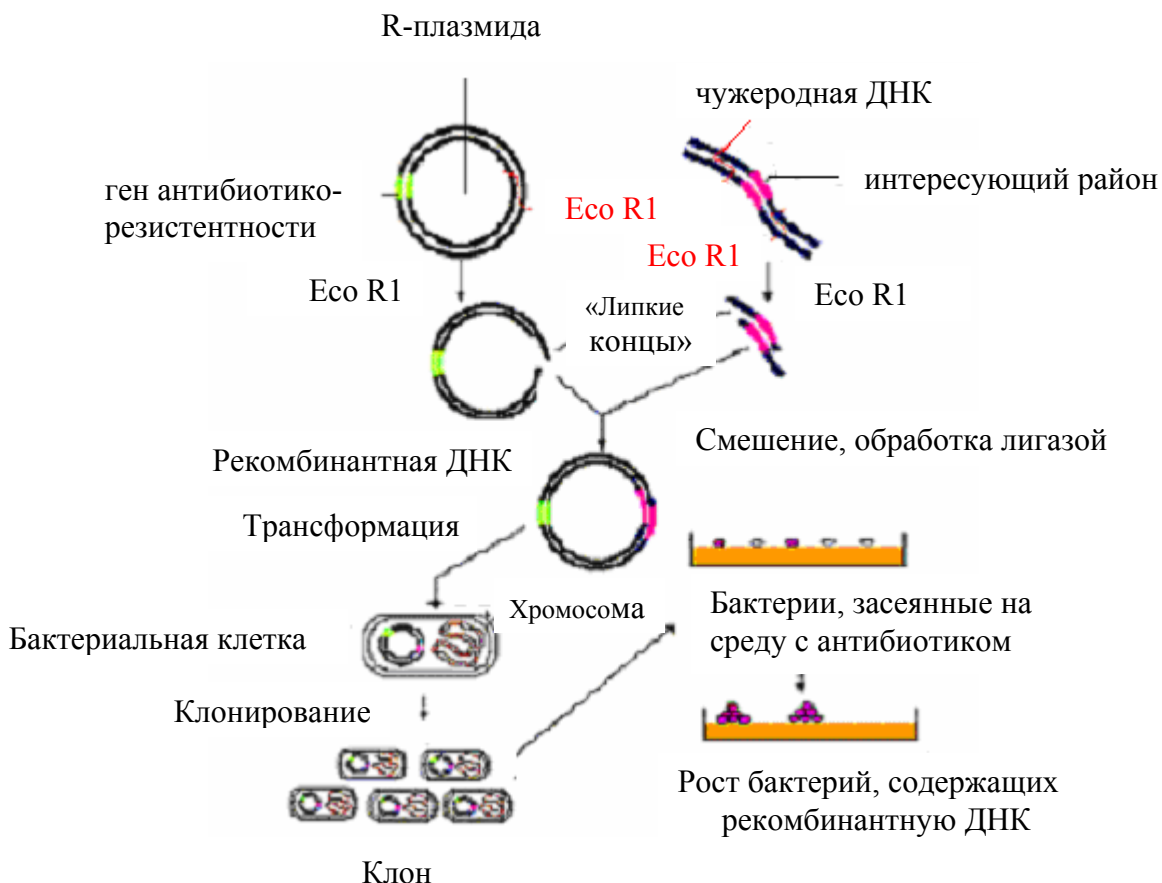


Рис. 77. Получение и клонирование рекомбинантной ДНК

Метод клонирования нашел множество применений. С его помощью можно получать микробиологическим путем продукты, идущие на пользу человека. В настоящее время разработаны методы микробиологического получения гормона инсулина, в котором нуждаются больные диабетом. Раньше его получали путем экстрагирования из поджелудочных желез коров, свиней, а это очень сложно и дорого. Разработаны методы получения интерферонов – белков, обладающих антивирусным действием; соматостатина – гормона роста и др. Гены,

детерминирующие синтез этих веществ, отклонены в основном в клетках *E.coli*.

7.9. Регуляция метаболизма у бактерий

Клетка бактерий *E. coli* содержит около 10^7 молекул белка. С другой стороны, в ДНК этих бактерий зашифрована структура примерно 3000 разных белков. Если бы все 3000 бактериальных генов работали одинаково эффективно, т.е. все типы клеточных белков синтезировались в одинаковом количестве, то каждая клетка бактерий *E.coli* содержала бы около 3000 копий каждой белковой молекулы, закодированной в ее геноме. Однако анализ относительного количества разных белков в клетке в определенных фазах роста бактерий показал, что содержание некоторых из них не превышает 10 молекул на клетку, в то время как содержание других видов белков доходит до 500 000 молекул на клетку. Это говорит о том, что в клетке *E.coli* различные белки синтезируются не в одинаковых количествах, т.е. не все гены клетки в одно и то же время работают одинаково эффективно. Следовательно, существуют механизмы, обеспечивающие регуляцию активности бактериальной клетки.

В начале прошлого века было выяснено, что ферментативные свойства микроорганизмов зависят от того, на какой среде они были выращены, т.е. микроорганизмы можно «тренировать» или «воспитывать». Если дрожжи выращивать в среде с лактозой, то они утилизируют ее, т.е. клетки дрожжей содержат ферменты лактозного метаболизма. При переносе дрожжей в среду с глюкозой эти ферменты исчезают, так как в них отпадает необходимость, и появляются ферменты глюкозного метаболизма. Клетки дрожжей начинают использовать глюкозу в качестве источника углерода и энергии. В 30-х годах прошлого столетия Х.Карстром, изучив образование ряда ферментов углеводного метаболизма у бактерий, разделил их на два класса: адаптивные ферменты, которые образуются только в присутствии своего субстрата в среде, и конститутивные ферменты, образующиеся независимо от состава среды.

Одним из ферментов бактерий *E.coli*, отнесенных к классу адаптивных, была β -галактозидаза. Этот фермент катализирует реакцию гидролиза своего естественного субстрата лактозы, а также других β -галактозидов. Было установлено, что клетки бактерий *E.coli* содержат активность β -галактозидазы только тогда, когда они растут на

среде, содержащей лактозу в качестве источника углерода и энергии; на среде, содержащей вместо лактозы какой-нибудь другой естественный углевод, например глюкозу, клетки бактерий *E.coli* не синтезируют этого фермента. Исследованиями адаптационного образования β -галактозидазы у *E.coli* занимался Ж.Моно в 50-х годах прошлого столетия. В результате он переименовал феномен адаптации в «индукцию ферментов», а вещества, в присутствии которых в клетках образовывались соответствующие ферменты (например, лактоза), были названы индукторами. Ферменты, синтезируемые в присутствии индукторов, получили название индуцибельных. Следовательно, в настоящее время различают конститутивные и индуцибельные ферменты.

Существуют 2 способа регуляции метаболизма у бактерий:

- 1) **на уровне активности ферментов**, или регуляция активности ферментов;
- 2) **на уровне генов**, или регуляция синтеза ферментов.

7.9.1. Регуляция активности ферментов

Наиболее быстрым и тонким механизмом регуляции активности ферментов является регуляция, которой подвергаются аллостерические ферменты. Аллостерические ферменты – белки с высокой молекулярной массой, состоящие из нескольких субъединиц одного или разного типа. Каждая субъединица содержит, как правило, каталитический центр, который связывается с субстратом, и регуляторный или аллостерический центр. Последний соединяется с веществами-эффекторами, которые могут повышать или понижать активность фермента. Связывание эффектора с аллостерическим центром вызывает конформационные изменения молекулы фермента, происходящие на уровне третичной структуры, в результате чего изменяется сродство фермента к субстрату (рис. 78).

Каталитический центр Аллостерический центр

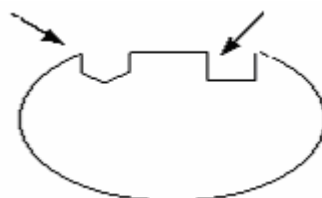
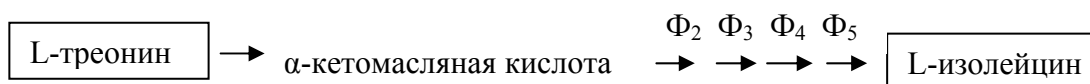


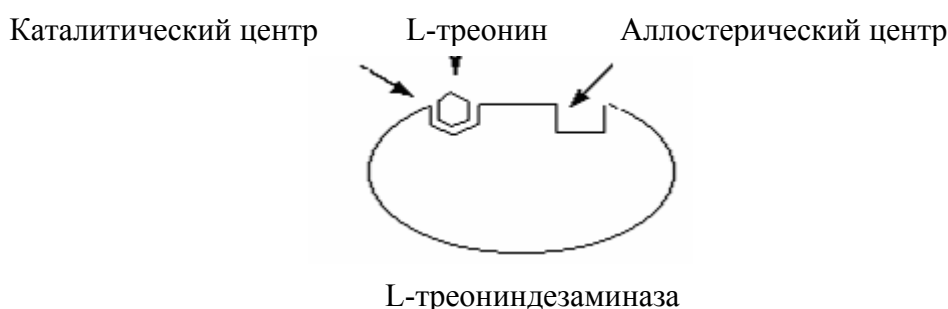
Рис. 78. Субъединица аллостерического фермента.

Эффекторами могут быть конечные продукты данного метаболического пути, субстраты ферментов, а также некоторые конечные продукты родственных метаболических путей. Если действие эффектора приводит к понижению каталитической активности фермента, такой эффектор называется отрицательным, или ингибитором. Положительным называют эффектор, действие которого повышает каталитическую активность фермента. Положительным эффектором, или активатором, чаще всего бывает субстрат данного регуляторного фермента.

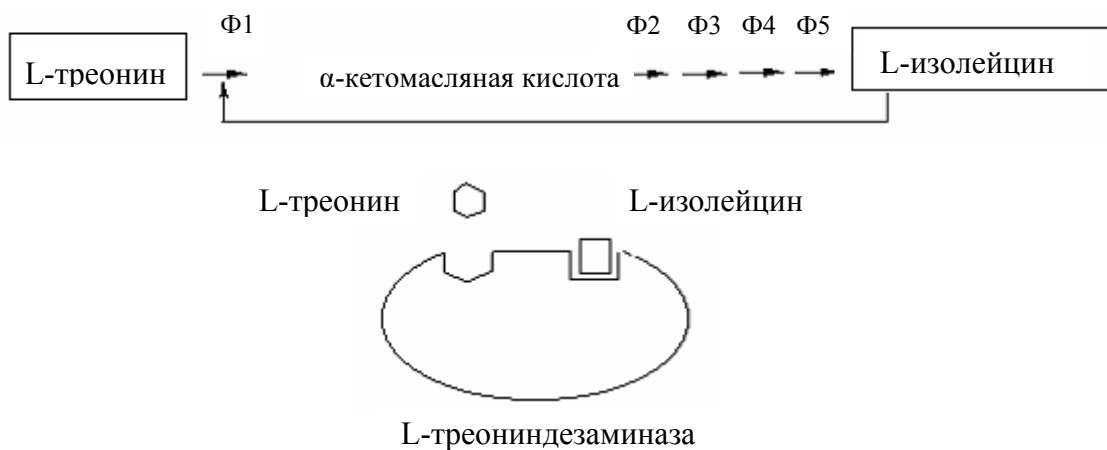
Наиболее простой случай аллостерической регуляции – регуляция конечным продуктом активности первого или ключевого фермента неразветвленного биосинтетического пути. Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента. Этот процесс называется **ретроингибированием**, или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза изолейцина. Превращение L-треонина в L-изолейцин включает пять ферментативных реакций.



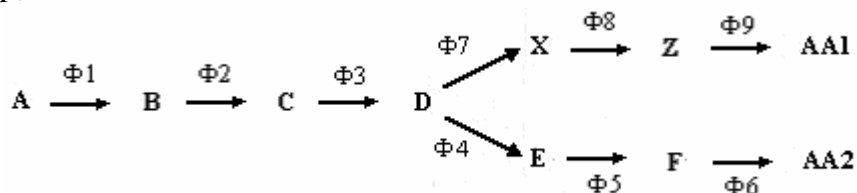
Первый фермент на пути синтеза L-изолейцина L-треониндезаминаза является аллостерическим и ингибируется только L-изолейцином. На поверхности молекулы L-треониндезаминазы имеется два вида участков: каталитический – для связывания субстрата (L-треонина) и регуляторный – для связывания эффектора (L-изолейцина):



При накоплении в клетке L-изолейцина он связывается с аллостерическим центром фермента L-треониндезаминазы, подавляя его активность, и синтез L-изолейцина прекращается.



При разветвлении метаболических путей активность аллостерических ферментов регулируется сложнее, так как от активности первого фермента зависит биосинтез нескольких конечных продуктов. Например,

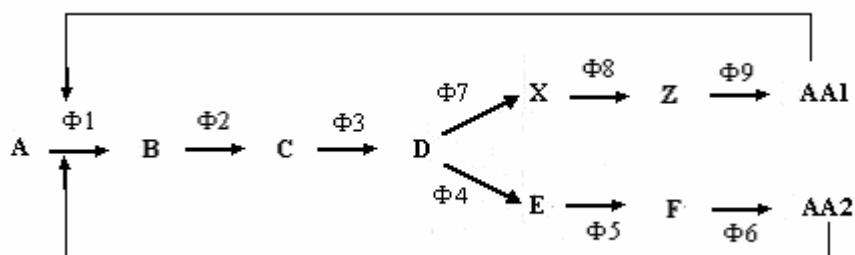


В этом случае на поверхности молекулы фермента, катализирующего первый этап биосинтетического пути, имеются различные аллостерические центры, с каждым из которых связывается один из конечных продуктов, выполняющих функцию эффектора. Ингибирование активности этого фермента может происходить двояко:

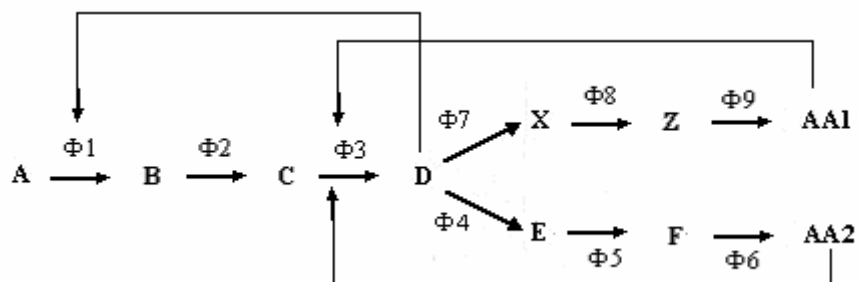
- **мультивалентное ингибирование** – необходимо связывание с аллостерическими центрами всех конечных продуктов. Каждый конечный продукт (эффектор) по отдельности, связавшись со «своим» аллостерическим центром, не меняет активности фермента.

- **кумулятивное или аддитивное ингибирование** – присоединение к ферменту одного конечного продукта частично снижает его ак-

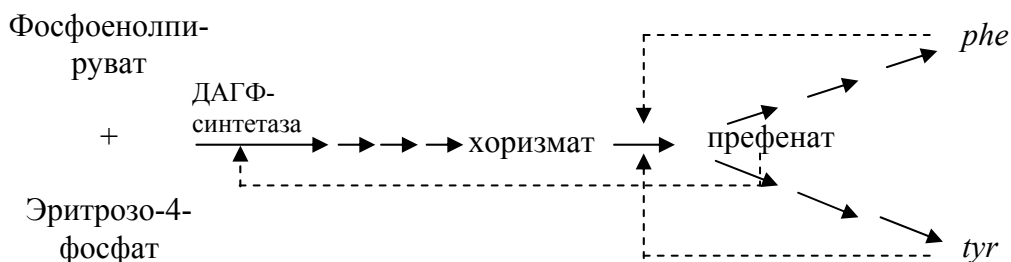
тивность, с присоединением каждого последующего конечного продукта эффект ингибирования нарастает.



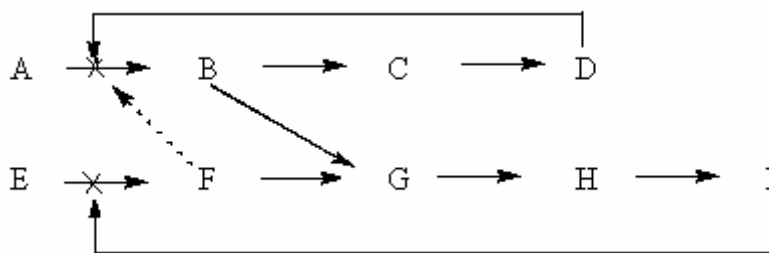
В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента осуществляется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, образующимся непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования получил название **последовательного**.



Примером такого ретроингибирования является ингибирование фермента ДАГФ-синтетазы (3-дезоксид-арабиногептулозы-7-фосфата) у бактерий *B. subtilis* префенатом:



Существуют разветвленные метаболические пути, в которых регуляция осуществляется таким образом, что одновременно существуют и активация и ингибирование:



Метаболит В является общим для двух путей синтеза конечных продуктов D и I. Вещество D ингибирует аллостерический фермент, который катализирует превращение А в В ($A \rightarrow B$), но вещество F является активатором этой же реакции. Вещество D поэтому продолжает синтезироваться. Количество вещества В после активации становится достаточным для синтеза продукта I. Затем, когда продукт I синтезируется, он блокирует реакцию $E \rightarrow F$. Концентрация продукта F падает и поэтому активность фермента реакции $A \rightarrow B$ снижается. Такой двойной контроль обеспечивает необходимое количество продукта В, которое обеспечивает синтез двух конечных продуктов D и I.

В настоящее время в селекции микроорганизмов - продуцентов аминокислот и других биологически активных продуктов используются методы получения мутантов нечувствительных к ретроингибированию. Такие мутанты все время синтезируют нужный конечный продукт.

7.9.2. Регуляция на уровне генов или регуляция синтеза ферментов

Этот тип регуляции был разработан благодаря исследованиям Ф.Жакоба и Ж.Моно, которые пытались выяснить, каким образом бактериальные клетки реагируют на изменение окружающей среды. В частности изучался синтез фермента β -галактозидазы у бактерий *E.coli*. Если бактерии *E.coli* выращивать на среде с глюкозой, то β -галактозидаза не синтезируется. Если клетки перенести в среду с лактозой, то содержание фермента β -галактозидазы, участвующего в расщеплении лактозы, увеличивается в 1000 раз. Такая активация транскрипции называется индукцией. Одновременно с β -галактозидазой индуцируется синтез еще двух ферментов: β -галактозидпермеазы, обеспечивающей транспорт лактозы внутрь клетки через цитоплазматическую мембрану и β -галактозидтрансацилазы. Установлено, что дефект в любом из трех генов, ответственных за синтез одного из этих ферментов, приводит к неспособности утилизировать лактозу.

При наличии в среде лактозы синтез этих трех ферментов начинается одновременно. Это позволило предположить, что гены, ответственные за их синтез, располагаются на хромосоме рядом (образуют кластер) и запускаются одним механизмом в ответ на воздействие индуктора – лактозы. Следовательно, в клетке бактерий должен быть какой-то репрессор, который блокирует транскрипцию структурных генов в отсутствие индуктора. Как только индуктор инактивирует репрессор, структурные гены, ответственные за синтез ферментов, выходят из-под репрессии и начинается их транскрипция.

Жакоб Ф. и Моно Ж. предложили концепцию оперона. Хромосома бактерий устроена по оперонному принципу, т.е. она состоит из различных оперонов.

Разберем строение оперона на примере *Lac*-оперона (рис. 80).

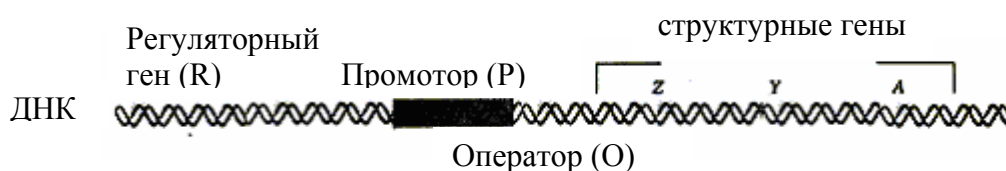


Рис. 80. Схематическое изображение лактозного оперона бактерий *E.coli*

Lac-оперон состоит из кодирующей области, представленной тремя структурными генами, ответственными за синтез трех ферментов: β -галактозидазы, β -галактозидпермеазы и β -галактозидтрансацилазы; а также промоторно-операторной области. Оператор (O) представляет собой небольшой участок ДНК, граничащий с первым структурным геном. С оператором может связываться белок-репрессор, блокируя тем самым инициацию (начало) транскрипции. Промотор (P) – это небольшой участок ДНК перед оператором. Он служит местом связывания ДНК-зависимой РНК-полимеразы (транскриптазы) и от него начинается транскрипция ДНК. Оператор и промотор слегка перекрываются, так что, когда репрессор находится на ДНК (на операторе), то РНК-полимераза не может связаться с промотором и транскрипция структурных генов не идет. Таким образом, 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 молекулы информационной РНК.

Транскрипционная активность входящих в оперон генов регулируется специальным геном-регулятором или регуляторным геном

(ген R), который может располагаться рядом со структурными генами или на некотором расстоянии от них. Ген R кодирует синтез специфического белка-репрессора. Репрессор – аллостерический белок, имеющий два центра связывания: один центр узнает оператор, другой – взаимодействует с эффектором или индуктором. Для *Lac*-оперона индуктором является лактоза, которая связывается с репрессором, переводит его в неактивную форму, в результате чего репрессор отсоединяется от оператора.

Различают **опероны индуцибельные** и **репрессибельные**. Индуцибельные опероны ответственны за катаболизм лактозы, арабинозы, галактозы и других углеводов. Рассмотрим работу индуцибельного оперона на примере *Lac*-оперона (рис. 81).

В основе индукции синтеза ферментов лактозного оперона лежит механизм негативной или отрицательной регуляции. В отсутствие лактозы молекула репрессора активная в свободном состоянии, связывается с оператором, закрывая при этом промотор, тем самым препятствует связыванию с ним РНК-полимеразы и началу транскрипции структурных генов. При наличии в среде внешнего индуктора лактозы, она транспортируется с помощью β -галактозидпермеазы внутрь клетки и с помощью фермента β -галактозидазы превращается в аллолактозу, которая действует как внутренний индуктор. Возникает вопрос, откуда же берутся ферменты β -галактозидпермеаза и β -галактозидаза? Дело в том, что они присутствуют и в неиндуцированных клетках, но в концентрациях, составляющих менее 0,001 от их концентраций после полной индукции. Аллолактоза связывается с репрессором, который при этом претерпевает конформационное изменение, уменьшающее его сродство к ДНК оператора, и в результате репрессор отсоединяется от *lac*-оператора. Начинается транскрипция структурных генов, приводящая к синтезу ферментов катаболизма лактозы. При удалении из клетки индуктора репрессор снова переходит в активное свободное состояние, связывается с оператором, что приводит к прекращению синтеза соответствующих ферментов.

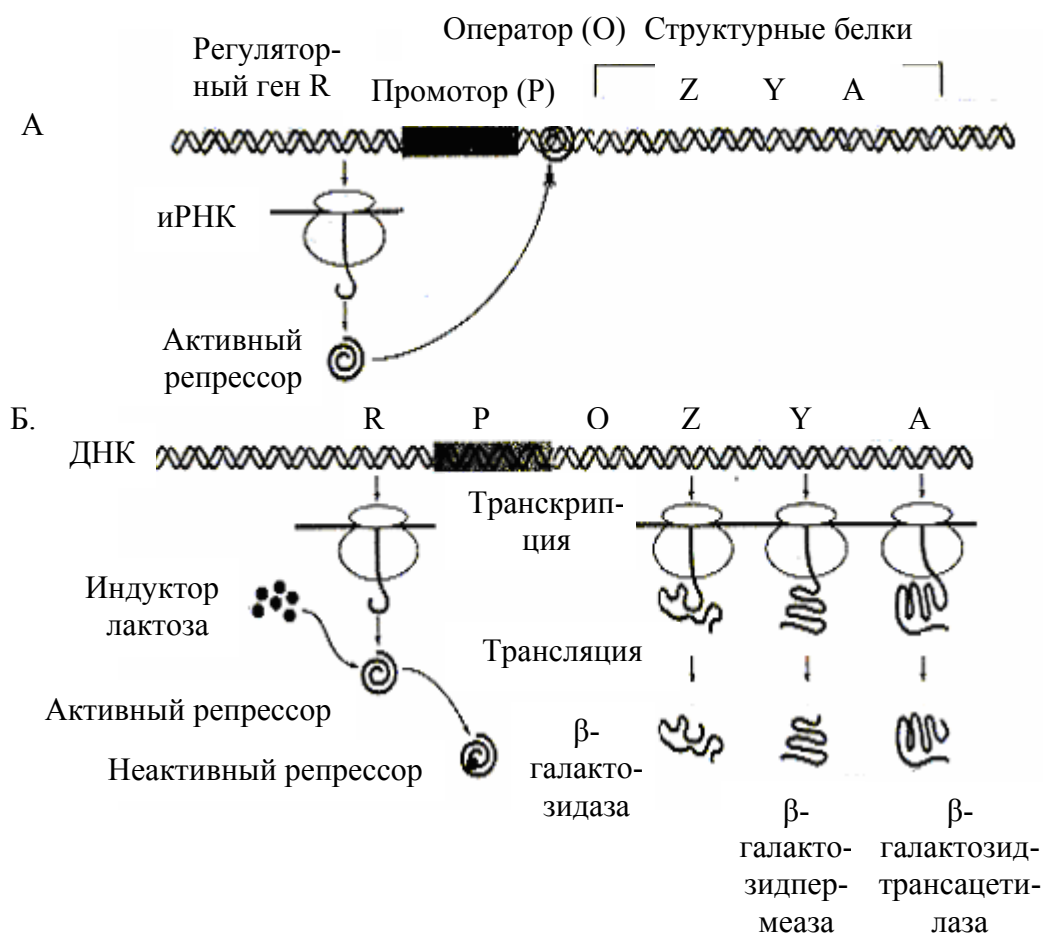


Рис. 81. Работа лактозного оперона бактерий *E.coli*:
 А – без лактозы; Б – с лактозой

Лактозный оперон подвержен также второму типу регуляции – позитивному или положительному. Дело в том, что РНК-полимераза может связаться с промотором лишь тогда, когда к нему присоединен регуляторный белок БАК (белок, активирующий катаболизм) или CAP (*catabolite activator protein*). Однако БАК может связаться с промотором только в том случае, если в клетке в достаточно высокой концентрации присутствует циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), т.е. БАК связывается с промотором только в комплексе с цАМФ. Если в клетке цАМФ отсутствует, то БАК не способен взаимодействовать с промотором. Это было установлено с использованием феномена диауксического роста или диауксии – когда в среде содержится и глюкоза и лактоза, то клетки бактерий вначале используют глюкозу и после ее полного израсходования начинают катаболизировать лактозу. Оказалось, что глюкоза репрессирует синтез

β -галактозидазы. При наличии в среде глюкозы резко снижается количество цАМФ. Это явление называют **катаболитной репрессией**. Оно наблюдается и в тех случаях, когда вместо лактозы используется какой-то другой углевод. Катаболитная репрессия глюкозой может быть снята, если в среду добавить цАМФ. Образуется комплекс цАМФ с БАК и РНК-полимераза присоединяется к промотору, а далее идет синтез ферментов катаболизма лактозы, даже в присутствии глюкозы.

Кроме индуцибельных оперонов, управляющих катаболизмом углеводов, у бактерий имеются и репрессибельные опероны. Это опероны, ответственные за синтез аминокислот аргинина, гистидина и триптофана. Максимальная транскрипция структурных генов этих оперонов достигается только в отсутствие в клетке конечных продуктов или эффекторов этих биосинтетических путей. Такие эффекторы, которыми являются конечные продукты называют корепрессорами, а соответствующие регуляторные белки – апорепрессорами. Синтез ферментов репрессибельного оперона включается посредством derepression.

Разберем строение триптофанового оперона *E.coli* (рис. 82). Он содержит пять структурных генов, ответственных за синтез пяти ферментов, участвующих в превращении хоризмовой кислоты в триптофан, а также промоторно-операторную область. Ген-регулятор (*traR*) расположен на хромосоме далеко от оперона. Он ответственен за синтез регуляторного белка – апорепрессора, который неактивен в свободном состоянии. Он не может связываться с оператором и неспособен таким образом, препятствовать началу транскрипции.

Когда конечный продукт метаболического пути триптофан накапливается выше определенного уровня, он взаимодействует с апорепрессором и активирует его. Активированный апорепрессор (апорепрессор + корепрессор) присоединяется к оператору и подавляет транскрипцию структурных генов триптофанового оперона. Синтез триптофана прекращается.

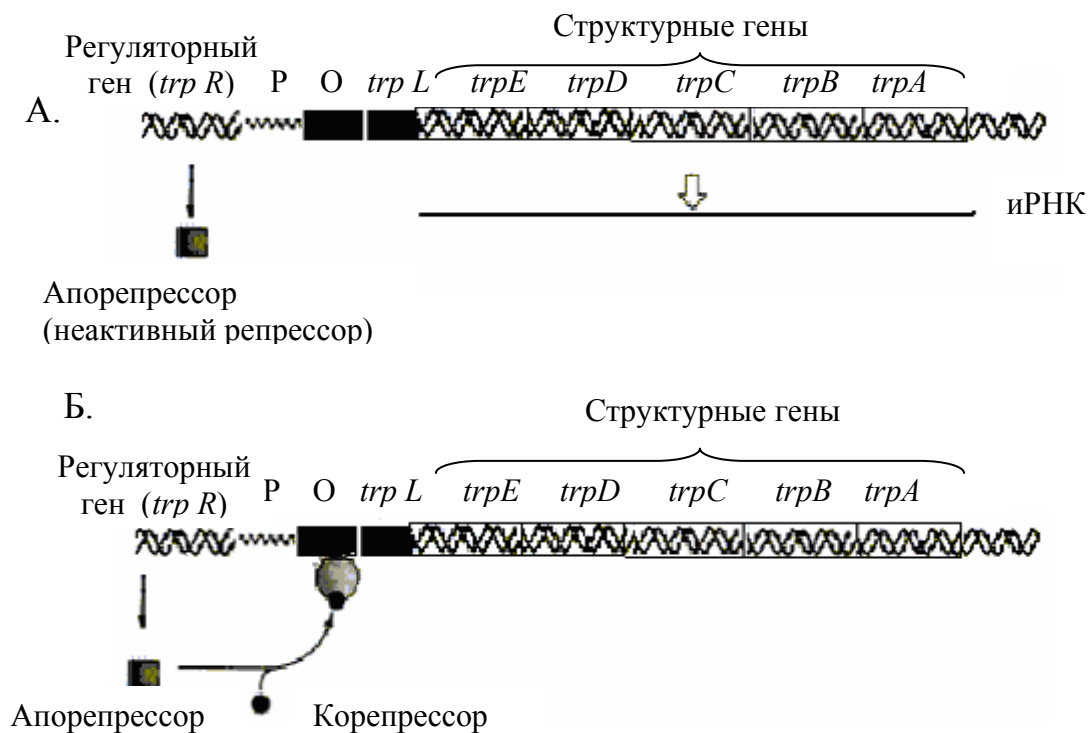


Рис. 82. Работа триптофанового оперона бактерий *E.coli*:
 А – нет триптофана; Б – избыток триптофана

Установлено, что отсутствие активированного репрессора вызывает примерно 70-кратное увеличение актов инициации транскрипции. Но, даже в условиях репрессии структурные гены сохраняют низкий уровень экспрессии. Для того, чтобы ещё более понизить уровень транскрипции в присутствии триптофана клетка бактерий *E.coli* имеет ещё одно приспособление – это ещё одна область регуляции транскрипции, которая называется **атенуатором**. В условиях избытка триптофана только одна из десяти молекул РНК-полимеразы, начавшая транскрибирование с промотора, попадает на структурные гены и продолжает транскрипцию. Таким образом, действие атенуатора проявляется в терминации транскрипции, а сам процесс атенуации классифицируется как регулируемая терминация транскрипции.

Установлено, что в отличие от репрессии атенуация зависит не от самой аминокислоты, а от образования триптофанил-тРНК, т.е. от активированной аминокислоты, присоединенной к определенной транспортной РНК.

При уменьшении внутриклеточной концентрации триптофана сначала осуществляется дерепрессия, это значит образуется возможность связывания молекул РНК-полимеразы с промотором *Trp*-оперона. При более глубоком голодании снижается уровень триптофанил-тРНК и возникают условия для преодоления атенуатора.

Таким образом, и в случае индукции путем негативной регуляции (*Lac*-оперон) и в случае репрессии синтеза ферментов (*Trp*-оперон) взаимодействие репрессора с оператором приводит к подавлению процесса транскрипции соответствующих структурных генов. Различие заключается в том, что при индукции путем негативной регуляции эффектор (индуктор), взаимодействуя с репрессором, понижает сродство репрессора к оператору, а в случае репрессии эффектор (корепрессор) повышает это сродство.