

М. В. ГУСЕВ, Л. А. МИНЕЕВА

МИКРО- БИОЛОГИЯ

Второе издание

Допущено Министерством высшего
и среднего специального
образования СССР
в качестве учебника
для студентов
биологических специальностей
университетов

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА
1985

УДК 576.8

Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология: Учебник. — 2-е изд. М.: Изд-во Моск ун-та, 1985, — 376 с. Библиогр. назв. 45. Ил. 111. Табл. 44.

Учебник охватывает современные проблемы микробиологии: особенности конструкторного и энергетического метаболизма основных групп микроорганизмов, эволюцию энергетических процессов, строение и химический состав прокариотной клетки, пути химической и биологической эволюции, проблемы возникновения и дальнейшего развития жизни. Второе издание в целом сохраняет структуру первого издания, однако отдельные главы существенно переработаны, что продиктовано успехами, достигнутыми в изучении некоторых групп прокариот за последний период.

Рецензенты:
кафедра микробиологии Ленинградского государственного университета
(зав. кафедрой проф. Б. В. Громов)

Г $\frac{2003000000-034}{077(02)-85}$ 165—85

© Издательство Московского университета, 1985 г.

І. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1

ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК

На протяжении длительного времени человек жил в окружении невидимых существ, использовал их, вернее, продукты жизнедеятельности этих существ (например, при выпечке хлеба из кислого теста, при приготовлении вина и уксуса), страдал от них, когда эти существа являлись причинами болезней или портили запасы пищи, но не подозревал об их присутствии. Не подозревал потому, что не видел, а не видел потому, что размеры этих микросуществ лежали много ниже того предела видимости, на который способен человеческий глаз. Известно, что человек с нормальным зрением на оптимальном расстоянии (25—30 см) может увидеть в виде точки предмет размером 0,07—0,08 мм. Меньшие объекты человек заметить не может. Это определяется особенностями строения его органа зрения.

Попытки преодолеть созданный природой барьер и расширить возможности человеческого глаза были сделаны давно. Так, при археологических раскопках в Древнем Вавилоне находили двояковыпуклые линзы — самые простые оптические приборы. Линзы были изготовлены из отшлифованного горного хрусталя. Можно считать, что с изобретением этих линз человек сделал первый шаг на пути в микромир.

Дальнейший прогресс в развитии оптической техники относится к XVI—XVII вв. и связан с развитием астрономии. В начале XVII в. голландские шлифовальщики стекла сконструировали первые подзорные трубы. Оказалось, что если линзы расположить иначе, не так, как в телескопе, то можно получить увеличение очень мелких предметов. Микроскоп подобного типа был создан в 1610 г. Г. Галилеем (G. Galilei, 1564—1642). Изобретение микроскопа открыло новые возможности для изучения живой природы.

Одним из первых микроскопов, состоящий из двух двояковыпуклых линз, дававших увеличение примерно в 30 раз, сконструировал и использовал для изучения строения растений английский физик и изобретатель Р. Гук (R. Hooke, 1635—1703). Рассматривая срезы пробки, он обнаружил правильное ячеистое строение древесной ткани. Эти ячейки впоследствии были названы им «клетками» и изображены в книге «Микрография» (1665). Именно Р. Гук ввел термин «клетка» для обозначения тех структурных единиц, из которых построен сложный живой организм. Дальнейшее проникновение в тайны микромира неразрывно связано с совершенствованием оптических приборов.

Зарождение микробиологии

Если считать, что микробиология возникла в тот момент, когда человек увидел первые микроорганизмы, то мы можем совершенно



А. ван Левенгук

точно указать «день рождения» микробиологии и имя первооткрывателя. Человек этот — голландец Антони ван Левенгук (Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723), мануфактурщик из Дельфта. Заинтересовавшись строением льняного волокна, он отшлифовал для себя несколько грубых линз. Позднее А. ван Левенгук увлекся этой тонкой и кропотливой работой и достиг большого совершенства в деле изготовления линз, названных им «микроскопиями». По внешней форме это были одинарные двояковыпуклые стекла, оправленные в серебро или латунь (то, что мы теперь называем «лупы»), однако по своим оптическим свойствам линзы А. ван Левенгука, дававшие увеличение в 200—270 раз, не знали себе равных. Чтобы оценить их, достаточно напомнить, что теоретический предел увеличения двояковыпуклой линзы — 250—300 раз.

Не имея естественного образования, но обладая природной любознательностью, А. ван Левенгук с интересом рассматривал все, что попадалось под руку: воду из пруда, зубной налет, настой перца, слюну, кровь и многое другое. С 1673 г. результаты своих наблюдений он начал посылать в Лондонское Королевское общество, членом которого впоследствии был избран. Всего А. ван Левенгук написал в Лондонское Королевское общество свыше 170 писем, а позднее завещал ему 26 своих знаменитых «микроскопий». Вот выдержка из одного письма: «24 апреля 1676 г. я посмотрел на... воду под микроскопом и с большим удивлением увидел в ней огромное количество мельчайших живых существ. Некоторые из них в длину были раза в 3—4 больше, чем в ширину, хотя они и не были толще волосков, покрывающих тело вши... Другие имели правильную овальную форму. Был там еще и третий тип организмов — наиболее многочисленный — мельчайшие существа с хвостиками». Сопоставив описание, приведенное в этом отрывке, и оптические возможности имевшихся в распоряжении А. ван Левенгука линз, можно сделать заключение о том, что в 1676 г. ему впервые удалось увидеть бактерии (рис. 1).

А. ван Левенгук повсюду обнаруживал микроорганизмы и пришел к выводу, что окружающий мир густо заселен микроскопическими обитателями. Все виденные им микроорганизмы, в том числе и бактерии, А. ван Левенгук считал маленькими животными, названными им «анималькулями», и был убежден, что они устроены так же, как и крупные организмы, т. е. имеют органы пищеварения, ножки, хвостики и т. д. Открытия А. ван Левенгука были настолько неожиданными и даже фантастическими, что на протяжении почти 50 последующих лет вызвали всеобщее изумление. Будучи в Голландии в 1698 г., Петр I посетил А. ван Левенгука и беседовал с ним. Из этой поездки Петр I привез в Россию микроскоп, а позднее, в 1716 г., в мастерских при его дворе были изготовлены первые отечественные микроскопы.

Дальнейшее систематическое изучение окружающей природы с помощью совершенствовавшихся микроскопов подтверждало обнаруженное А. ван Левенгуком повсеместное распространение в ней микроорганизмов. Три основные проблемы, волновавшие умы ученых на протяжении длительного времени, послужили могучим стимулом для развития исследований, приведших к возникновению и последующему интенсивному развитию микробиологии: природа процессов брожения и гниения, причины возникновения инфекционных болезней и проблема самозарождения организмов¹.

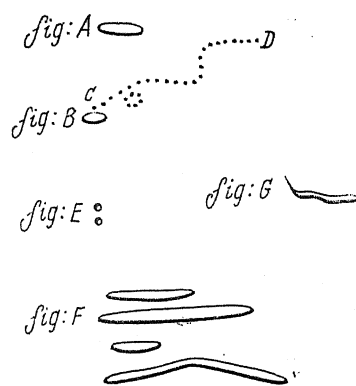


Рис. 1. Рисунок бактерий А. ван Левенгука (письмо № 39, 17 сентября 1683 г.)

Развитие представлений о природе процессов брожения и гниения

Многие процессы, осуществляемые микроорганизмами, были известны человеку с незапамятных времен. В первую очередь это гниение и брожение. По словам французского микробиолога Э. Дюкло (E. Duclaux), «явления брожения стары как мир». В сочинениях древних греческих и римских авторов можно найти рецепты приготовления вина, кислого молока, хлеба, свидетельствующие о широком использовании в быту брожений. В средние века алхимики не обошли вниманием эти процессы и изучали их наряду с другими чисто химическими превращениями. Именно в этот период были сделаны первые попытки выяснить природу процессов брожения.

Термин «брожение» (*fermentatio*) для обозначения процессов, идущих с выделением газа, впервые употребил голландский алхимик Я. Б. ван Гельмонт (J. B. van Helmont, 1577—1644). Им было обнаружено сходство между газом, образующимся при сбраживании виноградного сока (углекислым газом), газом, выделяющимся при сжигании угля, и газом, который появляется, «когда уксус льют на известковые камни». На основании этого Я. ван Гельмонт пришел к заключению, что все описанные выше химические превращения имеют одинаковую природу.

Позднее брожения стали выделять из группы химических процессов, сопровождающихся газовыделением. Для обозначения материальной движущей силы брожения, его активного начала использовали термин «фермент». Взгляд на брожение и гниение как на чисто химические процессы был сформулирован в 1697 г. немецким врачом и химиком Г. Э. Шталем (G. E. Stahl, 1660—1734). По представлениям Г. Штала, брожение и гниение — это химические превращения, идущие под влиянием молекул «фермента», которые передают присущее им внутреннее активное движение молекулам сбраживаемого субстрата, т. е. выступают в качестве своеобразных катализаторов реакции. Взгляды Г. Штала на природу процессов гниения и брожения полностью разделял и отстаивал один из крупнейших химиков своего времени Ю. Либих (J. von Liebig, 1803—1873). Однако эта точка зрения принималась не всеми исследователями.

¹ О развитии представлений по проблеме самозарождения см. с. 160.

Одна из первых догадок о связи описанных А. ван Левенгуком «глобул» (дрожжей) с явлениями брожения и гниения принадлежит французскому натуралисту Ж. Л. Л. Бюффону (G. L. L. Buffon, 1707—1788). Весьма близко подошел к пониманию роли дрожжей в процессе брожения французский химик А. Л. Лавуазье (A. L. Lavoisier, 1743—1794), изучавший количественно химические превращения сахара при спиртовом брожении. В 1793 г. он писал: «Достаточно немного пивных дрожжей, чтобы... дать первый толчок к брожению: оно потом продолжается само собой. Я доложу в другом месте о действии фермента в целом». Однако сделать это ему не удалось: А. Лавуазье стал жертвой террора французской буржуазной революции.

С 30-х гг. XIX в. начинается период интенсивных микроскопических наблюдений. В 1827 г. французский химик Ж. Б. Демазьер (J. B. Demazier, 1783—1862) описал строение организмов (дрожжей) *Mycoderma cerevisiae*, формирующих пленку на поверхности пива, и, будучи убежденным в том, что это — мельчайшие животные, отнес их к инфузориям. Однако в работе Ж. Б. Демазьера нет никаких указаний на возможную связь процесса брожения с развивающейся на поверхности бродящей жидкости пленкой. Спустя 10 лет, французский ботаник Ш. Каньяр де Латур (Ch. Cagniard de Latour, 1777—1859) предпринял тщательное микроскопическое изучение осадка, образующегося при спиртовом брожении, и пришел к выводу, что он состоит из живых существ, жизнедеятельность которых и является причиной брожения.

Почти одновременно немецкий естествоиспытатель Ф. Кютцинг (F. Kützing, 1807—1893), исследуя образование уксуса из спирта, обратил внимание на слизистую массу, имеющую вид пленки на поверхности жидкости, содержащей спирт. Изучая слизистую массу, Ф. Кютцинг установил, что она состоит из микроскопических живых организмов и имеет непосредственное отношение к накоплению уксуса в среде. К аналогичным выводам пришел другой немецкий естествоиспытатель Т. Шванн (Th. Schwann, 1810—1882).

Таким образом, Ш. Каньяр де Латур, Ф. Кютцинг и Т. Шванн независимо друг от друга и почти одновременно пришли к заключению о связи процессов брожения с жизнедеятельностью микроскопических живых существ. Основной вывод из этих исследований был четко сформулирован Ф. Кютцингом: «Мы теперь должны каждый процесс брожения рассматривать иначе, чем до сих пор их рассматривала химия... Весь процесс спиртового брожения зависит от присутствия дрожжей, уксуснокислого — от наличия уксусной матки».

Однако идеи о биологической природе «фермента» брожения, высказанные тремя исследователями, не получили признания. Более того, они были подвергнуты суровой критике со стороны приверженцев теории физико-химической природы брожения, обвинивших своих научных противников в «легкомыслии в выводах» и отсутствии каких-либо доказательств, подтверждающих эту «странную гипотезу». Господствовавшая оставалась теория физико-химической природы процессов брожения.

Формирование представлений о микробной природе инфекционных заболеваний

Еще древнегреческий врач Гиппократ (ок. 460—377 до н. э.) высказывал предположение о том, что заразные болезни вызываются невидимыми живыми существами. Авиценна (ок. 980—1037) в «Каноне

медицины» писал о «невидимых» возбудителях чумы, оспы и других заболеваний. Подобные мысли можно обнаружить и в трудах итальянского врача, астронома и поэта Дж. Фракастро (J. Fracastro, 1478—1553). В том, что инфекционные болезни вызываются живыми микроскопическими существами, был глубоко убежден русский врач-эпидемиолог Д. С. Самойлович (1744—1805), пытавшийся под микроскопом обнаружить возбудителя чумы. Возможности существовавших тогда микроскопов не позволили ему этого сделать, однако разработанные Д. С. Самойловичем в соответствии с его идеей меры по дезинфекции и изоляции больных оказались весьма эффективными в борьбе с эпидемиями и получили широкую известность в медицинском мире. В 1827 г. итальянский естествоиспытатель А. Басси (A. Bassi, 1773—1856), изучая заболевание шелковичных червей, обнаружил передачу болезни при переносе микроскопического грибка от больной особи к здоровой. Таким образом, А. Басси впервые удалось экспериментально установить микробную природу этого заболевания.

Несмотря на блестящие догадки отдельных ученых и опыты А. Басси, в целом представление о микробной природе инфекционных болезней в течение долгого времени не получало признания. Подавляющее большинство исследователей было убеждено в том, что причинами всех заболеваний являются нарушения течения химических процессов в организме. Однако острый интерес к изучению инфекционных заболеваний и совершенствование микроскопической техники приводили к быстрому накоплению данных, говорящих об участии микробов в инфекционных заболеваниях.

В 1846 г. немецкий анатом Ф. Г. Я. Генле (F. G. J. Henle, 1809—1885) в книге «Руководство по рациональной патологии» четко определил основные положения для распознавания инфекционных заболеваний. Позднее идеи Ф. Генле, сформулированные в общей форме (самому Ф. Генле не удалось увидеть ни одного возбудителя инфекционных заболеваний человека), были экспериментально обоснованы Р. Кохом (R. Koch, 1843—1910) и вошли в науку под названием «триада Генле—Кох».)

Научная деятельность Л. Пастера

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

По образованию Л. Пастер был химиком и свою научную деятельность начал как химик с работ по кристаллографии. Им было обнаружено, что при перекристаллизации солей оптически неактивной рацемической винной кислоты образуются два типа кристаллов. Раствор, приготовленный из кристаллов одного типа, вращает плоскость поляризованного света вправо, из кристаллов другого типа — влево. Далее Л. Пастер заметил, что плесневый гриб, выросший в растворе рацемической винной кислоты, потребляет только одну из изомерных форм (правовращающую). Это позволило ему сделать вывод о специфическом воздействии микроорганизмов на субстраты и послужило теоретической основой для последующего изучения физиологии микроорганизмов. Наблюдения Л. Пастера над низшим плесневым грибком привлекли его внимание к микроорганизмам вообще.



Л. Пастер

В 1854 г. Л. Пастер получил должность штатного профессора в университете г. Лилля. Именно здесь он начал свои микробиологические исследования, положившие начало микробиологии как самостоятельной научной дисциплине. К этому времени было накоплено довольно много сведений о повсеместном распространении микроорганизмов, однако роль микроскопических существ в природе, и в частности для человека, оставалась загадкой.

Поводом для начала изучения процессов брожения послужило обращение к Л. Пастеру лилльского фабриканта с просьбой помочь выяснить причины систематических неудач в сбраживании свежесквашенного сока для получения спирта. Результаты исследования, опубликованные в конце 1857 г., с несомненностью доказывали, что процесс спиртового брожения связан с жизнедеятельностью определенной группы микроорганизмов — дрожжей и проис-

ходит в условиях без доступа воздуха. Почти одновременно с изучением спиртового брожения Л. Пастер приступил к изучению молочнокислого брожения и также показал, что этот вид брожения вызывается микроорганизмами.

Изучение маслянокислого брожения привело Л. Пастера к выводу, что жизнь некоторых микроорганизмов не только может протекать в отсутствие свободного кислорода, но последний вреден для них.

Итог двадцатилетним исследованиям в области брожений был подведен Л. Пастером в «Исследовании о пиве, его болезнях, их причинах, способах сделать его устойчивым, с приложением новой теории брожения» (1876). В этой работе была четко сформулирована в законченном виде физиологическая теория брожений, являющихся результатом «жизни без воздуха, жизни без свободного кислорода».

В 1865 г. французское правительство обратилось к Л. Пастеру с просьбой помочь шелководам, терпевшим большие убытки из-за болезней шелковичных червей. Около 5 лет посвятил Л. Пастер изучению этого вопроса и пришел к выводу, что болезни шелковичных червей вызываются определенными микроорганизмами.

Дальнейшие работы Л. Пастера в области изучения инфекционных заболеваний привели к открытию им возбудителей куриной холеры, остеомиелита, гнойных абсцессов, одного из возбудителей газовой гангрены. Таким путем Л. Пастер показал и доказал, что каждое заболевание порождается специфическим микроорганизмом.

В 1879 г. при изучении куриной холеры Л. Пастер разработал метод получения культур микробов, которые утрачивают способность быть возбудителем заболевания, т. е. теряют вирулентность, и использовал это открытие для предохранения организма от последующего заражения. Последнее легло в основу создания теории иммунитета, т. е. невосприимчивости организма к инфекционным заболеваниям.

Трудно переоценить значение научных открытий Л. Пастера, каждого из которых достаточно, чтобы навсегда вписать имя ученого в историю науки. Изучая молочнокислое, спиртовое, маслянокислое брожение, Л. Пастер выяснил, что эти процессы вызываются определенными видами микроорганизмов и непосредственно связаны с их жизнедеятельностью. Позднее, изучая «болезни» вина, болезни животных и человека, он экспериментально установил, что их «виновниками» также являются микроорганизмы. Таким образом, Л. Пастер впервые показал, что микроорганизмы — это активные формы, полезные или вредные, энергично воздействующие на окружающую природу, в том числе и на человека.

Принципиально важным не только для микробиологии, но и для более глубокого понимания сущности живого в его разнообразных

проявлениях было открытие Л. Пастером у микроорганизмов новых типов жизни, непохожих на те, которые имеют место в мире растений и животных. В 1857 г. Л. Пастер при изучении спиртового брожения установил, что оно — результат жизнедеятельности дрожжей без доступа кислорода. Позднее при изучении маслянокислого брожения он обнаружил, что возбудители брожения вообще отрицательно относятся к кислороду и могут размножаться только в условиях, исключающих его свободный доступ. Таким образом, Л. Пастер обнаружил существование «жизни без кислорода», т. е. анаэробный способ существования. Он же ввел термины «аэробный» и «анаэробный» для обозначения жизни в присутствии или в отсутствие молекулярного кислорода.

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

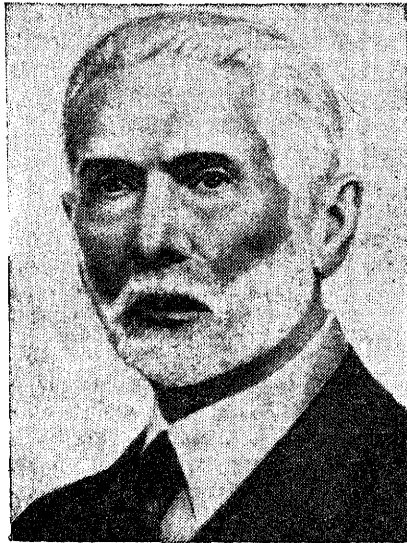
И, наконец, работы Л. Пастера в области изучения инфекционных болезней животных и человека (болезнь шелковичных червей, сибирская язва, куриная холера, бешенство) позволили ему не только выяснить природу этих заболеваний, но и найти способ борьбы с ними. Поэтому мы с полным правом можем считать, что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

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

Успехи микробиологии во второй половине XIX в.

Оценивая успехи, достигнутые микробиологией во второй половине XIX в., французский исследователь П. Таннери (P. Tannery) в работе «Исторический очерк развития естествознания в Европе (1300—1900)» писал: «Перед лицом бактериологических открытий история других естественных наук за последние десятилетия XIX столетия кажется несколько бледной».

Успехи микробиологии в этот период непосредственно связаны с новыми идеями и методическими подходами, внесенными в микробиологические исследования Л. Пастером. В числе первых, кто оценил значение открытий Л. Пастера, был английский хирург Дж. Листер



С. Н. Виноградский

ния Р. Кох начал, еще будучи сельским врачом, с изучения сибирской язвы и в 1877 г. опубликовал работу, посвященную возбудителю этого заболевания — *Bacillus anthracis*. Вслед за этим внимание Р. Коха привлекла другая тяжелая и широко распространенная болезнь того времени — туберкулез. В 1882 г. Р. Кох сообщил об открытии возбудителя туберкулеза, который в его честь был назван «палочкой Коха». (В 1905 г. за исследование туберкулеза Р. Коху была присуждена Нобелевская премия.) Ему принадлежит также открытие в 1883 г. возбудителя холеры.

Родоначальником русской микробиологии является Л. С. Ценковский (1822—1887). Объектом его исследований были микроскопические простейшие, водоросли, грибы. Л. С. Ценковский открыл и описал большое число простейших, изучал их морфологию и циклы развития. Это позволило ему сделать вывод об отсутствии резкой границы между миром растений и животных. Л. С. Ценковский интересовался проблемами медицинской микробиологии. Им была организована одна из первых Пастеровских станций в России и предложена вакцина против сибирской язвы (так называемая «живая вакцина Ценковского»).

Основоположником медицинской микробиологии справедливо считают также и И. И. Мечникова (1845—1916). И. И. Мечников был очень разносторонним исследователем, но основные его научные интересы были сосредоточены на проблеме изучения взаимоотношений хозяина и микроорганизма-паразита. В 1883 г. И. И. Мечников создал фагоцитарную теорию иммунитета. Невосприимчивость человека к повторному заражению после перенесенного инфекционного заболевания была известна давно. Однако природа этого явления оставалась непонятной и после того, как были разработаны и широко применялись прививки против ряда инфекционных заболеваний. И. И. Мечников показал, что защита организма от болезнетворных микроорганизмов — сложная биологическая реакция, в основе которой лежит способность белых кровяных телец (фагоцитов) захватывать и разрушать посторонние тела, попавшие в организм. Вклад И. И. Мечникова

(J. Lister, 1827—1912). Он понял, что причина большого процента смертных случаев после операций — заражение ран бактериями из-за незнания, во-первых, и несоблюдения, во-вторых, элементарных правил антисептики. Дж. Листер впервые ввел в медицинскую практику методы предупреждения подобного заражения ран, заключавшиеся в обработке всех хирургических инструментов карболовой кислотой и разбрызгивании ее в операционной во время операции. Таким путем он добился существенного снижения числа смертельных исходов после операций.

Одним из основоположников медицинской микробиологии наряду с Л. Пастером явился немецкий микробиолог Р. Кох, занимавшийся изучением возбудителей инфекционных заболеваний. Свои исследования

в науку был оценен его современниками. В 1909 г. за исследования по фагоцитозу И. И. Мечникову была присуждена Нобелевская премия.

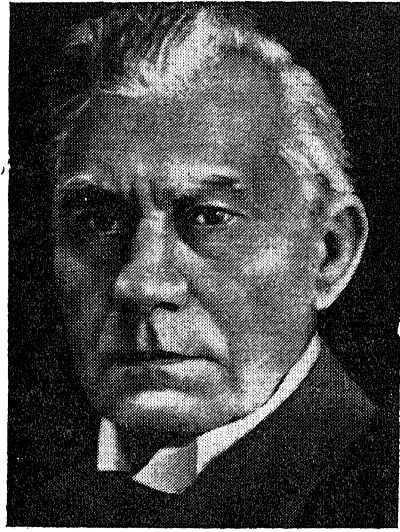
Большой вклад в развитие общей микробиологии внесли русский микробиолог С. Н. Виноградский (1856—1953) и голландский микробиолог М. Бейеринк (M. Beijerinck, 1851—1931). Оба много и плодотворно работали в разных областях микробиологии. Впитав идеи Л. Пастера о многообразии форм жизни в микромире, С. Н.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

Для выделения в лабораторных условиях группы бактерий с определенными свойствами С. Н. Виноградский предложил создавать специфические (элективные) условия, дающие возможность преимущественного развития данной группы организмов. Поясним это примером. С. Н. Виноградский предположил, что среди микроорганизмов есть виды, способные усваивать молекулярный азот атмосферы, являющийся инертной формой азота по отношению ко всем животным и растениям. Для выделения таких микроорганизмов в питательную среду были внесены источники углерода, фосфора и другие минеральные соли, но не добавлено никаких соединений, содержащих азот. В результате в этих условиях не могли расти микроорганизмы, которым необходим азот в форме органических или неорганических соединений, но могли расти виды, обладавшие способностью фиксировать азот атмосферы. Именно так С. Н. Виноградским в 1893 г. был выделен из почвы анаэробный азотфиксатор, названный им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

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

Микрoэкологический принцип был успешно развит М. Бейеринком, и применен им при выделении различных групп микроорганизмов. В частности, спустя восемь лет после открытия С. Н. Виноградским анаэробного азотфиксатора, М. Бейеринк обнаружил в почве еще один вид бактерий, способных к росту и азотфиксации в аэробных условиях, — *Azotobacter chroococcum*. Круг научных интересов М. Бейеринка был необычайно широк. Ему принадлежат работы по исследованию физиологии клубеньковых бактерий, изучению процесса денитрификации и сульфатредукции, работы по изучению ферментов разных групп микроорганизмов.

С. Н. Виноградский и М. Бейеринк являются основоположниками экологического направления микробиологии, связанного с изучением



М. Бейеринк

ем роли микроорганизмов в природных условиях и участием их в круговороте веществ в природе.

Сообщения об активном участии микроорганизмов в процессах превращения веществ в природе стали быстро накапливаться в 70—80-х гг. XIX в. В 1877 г. французские химики Т. Шлезинг (T. Schloesing, 1824—1919) и А. Мюнц (A. Müntz, 1848—1917) доказали микробиологическую природу процесса нитрификации. В 1882 г. П. Дегерен (P. Deherein, 1830—1902) обнаружил аналогичную природу процесса денитрификации, а двумя годами позднее он же установил микробиологическую природу анаэробного разложения растительных остатков. М. С. Воронин (1838—1903) в 1867 г. описал клубеньковые бактерии, а спустя почти двадцать лет Г. Гельригель (H. Hellriegel, 1831—1895) и Г. Вильфарт (H. Willfarth, 1853—1904) показали их способность к азотфиксации. П. А. Костычев (1845—1895) создал теорию микробиологической природы процессов почвообразования. Конец XIX в. ознаменовался еще одним важным открытием в области микробиологии. В 1892 г. Д. И. Ивановский (1864—1920) обнаружил вирус табачной мозаики — представителя новой группы микроскопических существ. В 1898 г. независимо от Д. И. Ивановского вирус табачной мозаики был описан М. Бейеринком.

Таким образом, вторая половина XIX в. характеризуется выдающимися открытиями в области микробиологии. На смену описательному морфолого-систематическому изучению микроорганизмов, господствовавшему в первой половине XIX в., пришло физиологическое изучение микроорганизмов, основанное на точном эксперименте. Развитие нового этапа микробиологии связано в первую очередь с трудами Л. Пастера. К концу XIX в. намечается дифференциация микробиологии на ряд направлений: общая микробиология, медицинская, почвенная.

Микробиология в XX в.

Успехи микробиологии во второй половине XIX в. привели к обнаружению чрезвычайного разнообразия типов жизни в микромире. Главная заслуга в утверждении этого принадлежит Л. Пастеру, С. Н. Виноградскому и М. Бейеринку. Следующий вопрос, который встал перед исследователями, — как объяснить такое многообразие, определить его границы, выявить, на чем оно основано. Постановкой этой проблемы, имеющей общеприкладное значение, мы обязаны двум крупнейшим микробиологам нашего времени А. Клюйверу (A. Kluyver, 1888—1956) и К. ван Нилью (C. van Niel, p. 1897). А. Клюйвер и его ученики (одним из них был К. ван Ниль) провели сравнительные биохимические исследования в относительно далеко отстоящих друг от друга физиологических группах микроорганизмов. Было изучено много форм микроорганизмов и примерно к середине 50-х гг. нашего века сформулировано то, что теперь называется теорией биохимического единства жизни.

В чем же конкретно состоит биохимическое единство жизни, сочетающееся с большим физиологическим разнообразием и разными типами жизни в мире микроорганизмов? Общее основано на единстве трех групп процессов: механизмах передачи информации, энергетических и конструктивных процессах. А. Клюйвер доказал два последних положения. Что касается первого, то сам А. Клюйвер изучением этой проблемы не занимался. Единство системы передачи информа-

ции у всех типов жизни было установлено позднее. В настоящее время мы пока не знаем исключений, которые ставили бы под сомнение теорию биохимического единства жизни.

С начала XX в. продолжается дальнейшая дифференциация микробиологии. От нее отпочковываются новые научные дисциплины (вирусология, микология) со своими объектами исследования, выделяются направления, различающиеся задачами исследования (общая микробиология, техническая, сельскохозяйственная, медицинская, генетика микроорганизмов). Перечисление достижений микробиологии XX в. в кратком очерке представляется необычайно сложным, что и привело нас к заключению не делать этого. Фактически все последующее изложение материала (и то достаточно краткое и не затрагивающее всех направлений современной микробиологии) есть попытка охарактеризовать достижения в некоторых областях микробиологии на современном этапе. Вклад отдельных исследователей в решение определенных микробиологических проблем мы старались отмечать по мере изложения материала.

Итак, мы коротко остановились на истории микробиологии, особо подчеркнув роль исследователей, работы которых имели этапное значение не только для развития микробиологии, но и биологии в целом: А. ван Левенгук — и открытие микромира, Л. Пастер — и выяснение роли микроорганизмов в природе, С. Н. Виноградский и М. Бейеринк — и утверждение многообразия форм жизни в микромире, А. Кляйвер и К. ван Ниль — и доказательство биохимического единства жизни.

ГЛАВА 2

ПОЛОЖЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В СИСТЕМЕ ЖИВОГО МИРА

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

Во второй половине XIX в. немецкий биолог Э. Геккель (E. Haeckel, 1834—1919) приходит к заключению, что микроорганизмы настолько существенно отличаются как от царства животных, так и от царства растений, что не укладываются ни в одно из этих подразделений. Э. Геккель предложил выделить все микроорганизмы, у которых отсутствует дифференцировка на органы и ткани (простейшие, водоросли, грибы, бактерии), в отдельное царство Protista¹ (протисты, первосущества), включив в него организмы, во многих отношениях занимающие промежуточное положение между растениями и животными. Термин Protista и сейчас применим для обозначения объектов, исследуемых микробиологами.

В настоящее время нет единства во взглядах на общую систему живого мира. Согласно одной из точек зрения, попытки уложить все существующее разнообразие организмов в жесткую схему нецелесообразны, поскольку любые искусственные разграничения нарушают естественные связи между организмами. Следствие этого — тенденция наименьшего дробления органического мира, признание целесообразности выделения только двух царств: Plantae (растения) и Animalia (животные). Эта точка зрения акцентирует внимание на чертах сходства, соединяющих различные типы организмов, и на существовании переходов от одной группы организмов к другой в процессе эволюции. В соответствии с противоположным представлением, разделение всех живых форм на крупные таксоны (царства) наиболее полно отражает существующее многообразие типов жизни, подчеркивая эту сторону живого мира. Согласно первой точке зрения, все микроорганизмы рассматриваются как примитивные растения или животные и соответственно входят в состав царств Plantae или Animalia. Согласно второй, микроорганизмы могут претендовать на уникальное место в иерархии живых форм, что впервые понял Э. Геккель. Дальнейшее изучение геккелевских «первосуществ» выявило неоднородность этой группы. Тогда же стало ясно, что понятие «микроорганизм» не имеет таксономического смысла. Оно объединяет организмы по признаку их малых (как правило, видимых только с помощью соответствующих приборов) размеров и связанных с этим специфических методов изучения.

¹ По гречески protos — самый простой.

Данные о различии в строении клеток микроорганизмов, входящих в группу Protista, начали накапливаться с конца XIX в. Это повлекло за собой деление группы на высшие и низшие протисты. К высшим протистам стали относить микроскопических животных (простейших), микроскопические водоросли (кроме сине-зеленых) и микроскопические грибы (плесени, дрожжи); к низшим — все бактерии и сине-зеленые водоросли (последние чаще называют теперь цианобактериями). Деление на высшие и низшие протисты происходило в соответствии с двумя выявленными типами клеточной организации — эукариотной и прокариотной². Высшие протисты имеют эукариотное строение клеток (т. е. являются эукариотами), низшие — прокариотное.

Обоснование того, что прокариотный и эукариотный типы клеточной организации являются наиболее существенной границей, разделяющей все клеточные формы жизни, связано с работами Р. Стейниера (R. Stanier, 1916—1982) и К. ван Ниля, относящимися к 60-м гг. Поясним разницу между прокариотами и эукариотами. Клетка — это кусочек цитоплазмы, ограниченный мембраной. Последняя под электронным микроскопом имеет характерную ультраструктуру: два электронно-плотных слоя толщиной 25—30 нм, разделенных электронно-прозрачным промежутком. Такие мембраны получили название элементарных. Обязательными химическими компонентами каждой клетки являются два вида нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), белки, липиды и углеводы. Цитоплазма и элементарная мембрана, окружающая ее, — неперенные и обязательные структурные элементы клетки. Это то, что лежит в основе строения всех без исключения клеток. Изучение тонкой структуры выявило существенные различия в строении клеток прокариот (бактерий и цианобактерий) и эукариот (остальные макро- и микроорганизмы).

Прокариотная клетка отличается тем, что имеет одну внутреннюю полость, образуемую элементарной мембраной, называемой клеточной, или цитоплазматической (ЦПМ). У подавляющего большинства прокариот ЦПМ — единственная мембрана, обнаруживаемая в клетке. В эукариотных клетках в отличие от прокариотных есть вторичные полости. Ядерная мембрана, ограничивающая ДНК от остальной цитоплазмы, формирует вторичную полость. Наружные мембраны хлоропластов и митохондрий, окружающие заключенные в них функционально специализированные мембраны, играют аналогичную роль. Клеточные структуры, ограниченные элементарными мембранами и выполняющие в клетке определенные функции, получили название органелл. Ядро, митохондрии, хлоропласты — это клеточные органеллы. В эукариотных клетках помимо перечисленных выше есть и другие органеллы.

В клетках прокариот органеллы, типичные для эукариот, отсутствуют. Ядерная ДНК у них не отделена от цитоплазмы мембраной. В цитоплазме находятся функционально специализированные структуры, но они не изолированы от цитоплазмы с помощью мембран и, следовательно, не образуют замкнутых полостей. Эти структуры могут быть сформированы и мембранами, но последние не замкнуты и, как правило, обнаруживают тесную связь с ЦПМ, являясь результатом ее локального внутриклеточного разрастания. В клетках прокариот имеются также образования, окруженные особой мембраной, имеющей иное по сравнению с элементарной строение и химический состав.

² Термины были предложены в 30-х гг. XX в. протозоологом Э. Шаттоном (E. Chatton).

Таким образом, основное различие между двумя типами клеток — существование в эукариотной клетке вторичных полостей, являющихся обязательным структурным элементом клеточных органелл.

Сопоставление некоторых черт клеточной организации прокариотных и эукариотных организмов представлено в табл. 1.

Таблица 1

Сопоставление некоторых черт прокариотной и эукариотной клеточной организации

Признак	Прокариотная клетка	Эукариотная клетка
Организация генетического материала	нуклеоид (ДНК не отделена от цитоплазмы мембраной); нуклеотид состоит из одной хромосомы; митоз отсутствует	ядро (ДНК отделена от цитоплазмы мембраной); ядро содержит обычно больше одной хромосомы; репликация хромосомы митозом
Локализация ДНК	в нуклеоиде и не зависящих от нуклеоида плаزمидях, не ограниченных элементарной мембраной	в ядре и некоторых органеллах
Цитоплазматические органеллы	отсутствуют	имеются
Рибосомы в цитоплазме	70S-типа	80S-типа
Движение цитоплазмы	отсутствует	часто обнаруживается
Клеточная стенка (там, где она имеется)	в большинстве случаев содержит пептидогликан	пептидогликан отсутствует
Жгутики	состоят из одной или нескольких фибрилл	каждый жгутик состоит из микротрубочек, собранных в группы: $2 \times 9 + 2$

В связи с тем, что прокариотная и эукариотная организация клеток принципиально различна, было предложено только на основании этого признака выделить все прокариоты в особое царство. Р. Меррей (R. Murray, 1968) предложил все клеточные организмы разделить на две группы по типу их клеточной организации: царство Prokaryotae, куда вошли все организмы с прокариотным строением клетки, и царство Eukaryotae, куда включены все высшие протисты, растения и животные.

Р. Виттэкер (R. Whittaker, 1969) предложил схему, по которой все живые организмы, имеющие клеточное строение, представлены разделенными на пять царств (рис. 2). Такая система классификации живого мира отражает три основных уровня его клеточной организации: Monera включает прокариотные организмы, находящиеся на самом примитивном уровне клеточной организации живых систем; Protista — микроскопические, в большинстве своем одноклеточные, недифференцированные формы жизни, сформировавшиеся в результате качественного скачка в процессе эволюции, приведшего к возникновению эукариотных клеток; многоклеточные эукариоты представлены в свою очередь тремя царствами — Plantae, Fungi и Animalia.

Три последние таксономические группы различаются по способу питания: фототрофный тип питания за счет процесса фотосинтеза характерен для растений (Plantae); грибы (Fungi) в основном характеризуются осмотрофным типом питания, т. е. питанием растворенными органическими веществами; животные (Animalia) осуществляют голозойное питание, заключающееся в захватывании и переваривании твердой пищи. Способы питания, специфические для растений и грибов, возникли в процессе эволюции на уровне Monera. На уровне Protista они получили свое дальнейшее развитие; здесь же сформировался третий тип питания — голозойный.

Не берясь судить о целесообразности деления живой природы на пять или шесть царств, можно с определенностью утверждать, что обособление прокариотных микроорганизмов в отдельное царство Prokaryotae правомерно, поскольку основано на принципиальных различиях в структуре прокариотных и эукариотных клеток, т. е. тех единиц, из которых построены все клеточные формы жизни.

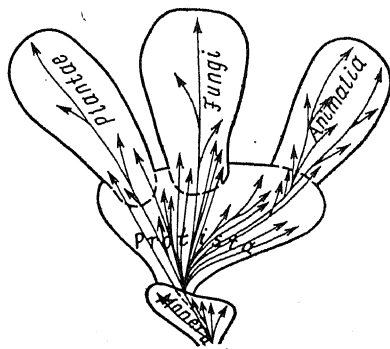


Рис. 2. Схема пяти царств живого мира: прокариоты (царство Monera), одноклеточные эукариоты (царство Protista), многоклеточные эукариоты (царства Plantae, Fungi, Animalia) (по Whittaker, 1969)

ГЛАВА 3

РАЗМЕРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Как показывает само название, объекты, относимые к микроорганизмам, были выделены по признаку их малых размеров. Если принять за критерий границу видимости невооруженным глазом, равную 70—80 мкм¹, то все объекты, которые лежат за пределами этой границы, можно отнести к микроорганизмам. Мир микроорганизмов — это преимущественно мир одноклеточных форм. Диапазон размеров микроорганизмов велик (табл. 2). Величина самых крупных представителей микромира, лежащих на границе видимости невооруженным глазом, приблизительно 100 мкм (например, некоторые диатомовые водоросли, высшие протисты). На порядок ниже размеры одноклеточных зеленых водорослей и клеток дрожжей и еще ниже размеры, характерные для большинства бактерий. В среднем линейные размеры бактерий лежат в пределах 0,5—3 мкм, но есть среди бактерий свои «гиганты» и «карлики». Например, клетки нитчатой серобактерии *Beggiatoa gigantea* имеют диаметр до 55 мкм; *Achromatium oxaliferum*, считающийся одним из крупных бактериальных организмов, имеет в длину 15—125 мкм при поперечнике около 5—33 мкм, а длина клетки спирохеты может быть до 500 мкм.

Самые мелкие из известных прокариотных клеток — бактерии, принадлежащие к группе микоплазм. Описаны микоплазмы с диаметром клеток 0,1—0,15 мкм. Поскольку молекулы всех соединений имеют определенные физические размеры, то исходя из объема клетки с диаметром 0,15 мкм легко подсчитать, что в ней может содержаться порядка 1200 молекул белка и осуществляться около 100 ферментативных реакций. Это минимум, необходимый для поддержания клеточной структуры и частичного обеспечения клеточного метаболизма. Таким образом, в группе микоплазм достигнут размер клеток, являющийся теоретическим пределом клеточного уровня организации жизни. Мельчайшие микоплазменные клетки равны или даже меньше частиц другой группы микроскопических организмов — вирусов.

Если бактериальные клетки обычно можно увидеть в световой микроскоп, то вирусы, размеры большинства которых находятся в диапазоне 16—200 нм, лежат за пределами его разрешающей способности. Впервые наблюдать вирусы и выяснить их структуру удалось после изобретения электронного микроскопа. По своим размерам вирусы занимают место между самыми мелкими бактериальными клетками и самыми крупными органическими молекулами. Размер частиц вируса-сателлита (18 нм) и величина крупной молекулы глобулярного белка (13 нм) близки. Таким образом, если раньше между известными биологам организмами и неживыми молекулами химиков существовала пропасть, то теперь этой пропасти не существует: она заполнена вирусами.

¹ 1 миллиметр (мм) = 10³ микрометров (мкм) = 10⁶ нанометров (нм) = 10⁷ ангстрем (А) = 10⁹ пикометров (пм).

Таблица 2

Размеры различных объектов

Объект		Линейные размеры, мкм*
Одноклеточные эукариоты		
Некоторые диатомовые водоросли и высшие протисты		100
Зеленая водоросль <i>Chlorella</i>		2—10
Клетка дрожжей <i>Saccharomyces</i>		6—10
Прокариотные организмы		
Крупные	<i>Achromatium oxaliferum</i>	5—33×15—125
	<i>Beggiatoa gigantea</i>	5—13×26—55
	<i>Cristispira pectinis</i>	1,5×36—72
	<i>Macromonas mobilis</i>	6—14×10—30
	<i>Thiovu im majus</i>	5—25
	<i>Spirochaeta plicatilis</i>	0,5—0,7×100—500
Обычные	<i>Bacillus subtilis</i>	0,7—0,8×2—3
	<i>Escherichia coli</i>	0,4—0,7×1—3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,6—1,0
	<i>Thiobacillus thioparus</i>	0,5×1—3
	<i>Rickettsia prowazeki</i>	0,3—0,6×0,8—2,0
Мелкие	<i>Mycoplasma mycoides</i>	0,1×0,25
	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	0,3×1
	<i>Haemobartonella muris</i>	0,1×0,3—0,7
	<i>Wolbachia melophagi</i>	0,3×0,6
Вирусы		
Крупные	табачной мозаики	0,02×0,3
	коревой оспы	0,26
	гриппа	0,1
	фаг T2	0,06×0,2
Мелкие	Ø X 174	0,025
	желтой лихорадки	0,022
	вирус-сателлит	0,018
Толщина ЦПМ бактериальной клетки		0,01
Рибосома		0,018
Молекула глобулярного белка		
крупная		0,013
мелкая		0,004

* Для сферических или близких к ним форм дано одно линейное значение.

Размеры всех живых организмов, выраженные в одних единицах, например в ангстремах, располагаются в диапазоне от 10^2 (самые мелкие вирусы) до 10^{11} (размеры кита). Если за границу, разделяющую микро- и макромиры, принять предел видимости невооруженным глазом, т. е. приблизительно 10^5 Å, то, как можно видеть из приведенных значений, на долю микромира приходится огромный диапазон величин.

Краткое рассмотрение различных представителей микромира, занимающих определенные «этажи» размеров, показывает, что, как правило, величина объектов определенно связана с их структурной сложностью. Нижний предел размеров свободноживущего одноклеточного организма определяется пространством, требуемым для упаковки внутри клетки аппарата, необходимого для независимого существования. Ограничение верхнего предела размеров микроорганизмов определяется, по современным представлениям, соотношениями между клеточной поверхностью и объемом. При увеличении клеточных размеров поверхность возрастает в квадрате, а объем в кубе, поэтому соотношение между этими величинами сдвигается в сторону последнего. У микроорганизмов по сравнению с макроорганизмами очень велико отношение поверхности к объему. Это создает благоприятные условия для активного обмена между микроорганизмами и внешней средой. И действительно, метаболическая активность микроорганизмов, измеренная по разным показателям, в расчете на единицу биомассы намного выше, чем у более крупных клеток. Поэтому представляется закономерным, что низшие формы жизни могли возникнуть и в настоящее время могут существовать только на базе малых размеров, так как последние создают целый ряд преимуществ, обеспечивающих жизнеспособность этим формам жизни.

II. МИР ПРОКАРИОТ

Прокариотные организмы, которым посвящен весь последующий материал настоящего учебника, характеризуются морфологическим и особенно физиологическим разнообразием. В основе морфологического разнообразия лежат различия в размерах и форме отдельных клеток, способах их деления, природе и наборе цитоплазматических включений, строении клеточной стенки и структур, локализованных снаружи от нее, наличии и типе дифференцированных форм, образующихся в процессе жизненного цикла. Всем этим вопросам посвящена гл. 4. В гл. 5 представлена общая картина физиологического разнообразия прокариот, складывающегося из различий в механизмах получения энергии и источниках питания, разного отношения к молекулярному кислороду и другим факторам внешней среды, прежде всего свету, температуре, кислотности среды. В гл. 6 обсуждаются генетические механизмы, приведшие в процессе эволюции к структурно-физиологическому разнообразию прокариот. Гл. 7, посвященная проблемам систематики и описанию основных групп прокариот, иллюстрирует на конкретных примерах материал, представленный в предыдущих главах. Завершает раздел гл. 8, в которой излагается наиболее общепринятая гипотеза происхождения жизни на Земле, приведшая к возникновению первичной клетки, и имеющийся в настоящее время экспериментальный материал, подтверждающий эту гипотезу.

ГЛАВА 4

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОКАРИОТНОЙ КЛЕТКИ. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА У ПРОКАРИОТ

Форма прокариот

До недавнего времени большинство исследователей традиционно считали, что клетки прокариот достаточно однообразны и в подавляющем большинстве имеют форму сферы, цилиндра или спирали. Они бывают одиночными, в иных случаях образуют нити или колонии. Прокариоты сферической формы, называемые кокками, могут после деления не расходиться. Если деление происходит в одной плоскости, обра-

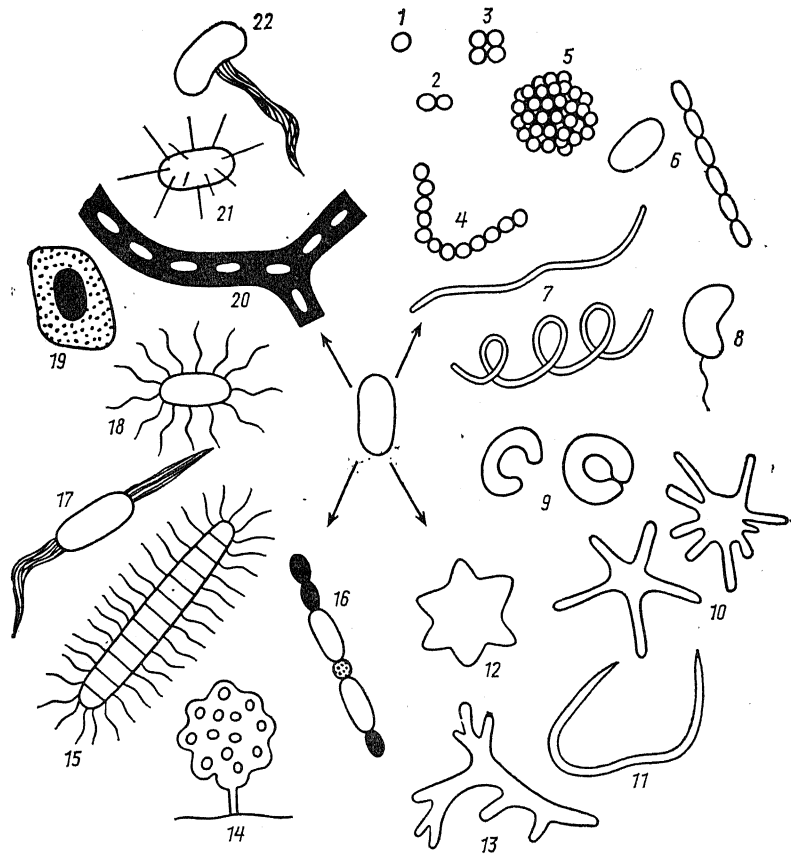


Рис. 3. Разнообразие форм прокариот:
 1 — кокк; 2 — диплококк; 3 — сарцина; 4 — стрептококк; 5 — колония сферической формы; 6 — палочковидные бактерии (одиночная клетка и цепочка клеток); 7 — спириллы; 8 — вибрион; 9 — бактерии, имеющие форму замкнутого или незамкнутого кольца; 10 — бактерии, образующие выросты (простеки); 11 — бактерия червеобразной формы; 12 — бактериальная клетка в форме шестиугольной звезды; 13 — представитель актиномицетов; 14 — плодовое тело миксобактерии; 15 — нитчатая бактерия рода *Caryophanon* с латерально расположенными жгутиками; 16 — нитчатая цианобактерия, образующая споры (акинеты) и гетероцисты; 17, 15, 17, 18 — бактерии с разными типами жгутикования; 19 — бактерия, образующая капсулу; 20 — нитчатые бактерии группы *Sphaerotilus*, заключенные в чехол, инкрустированный гидратом окиси железа; 21 — бактерия, образующая шипы; 22 — *Gallionella* sp.

зуются пары клеток (диплококки) или цепочки (стрептококки). В том случае, когда деление происходит относительно равномерно в трех взаимно перпендикулярных направлениях и клетки после деления остаются соединенными друг с другом, возникают пакеты правильной формы (сарцины) или колонии сферической формы. Если же деление происходит в нескольких плоскостях неравномерно, образуются клеточные скопления неправильной формы (рис. 3, 1—5). Прокариоты, имеющие форму цилиндра (палочковидные), сильно различаются по величине отношения длины клетки к ее поперечнику. У коротких палочек длина лишь ненамного превышает поперечник клетки, так что иногда довольно трудно отличить их от кокков. Прокариоты спиралевидной формы характеризуются разным числом витков: у спирилл — от одного до нескольких витков, вибрионы выглядят наподобие изогнутых палочек, так что их можно рассматривать как неполный виток спирали (рис. 3, 6—8).

За последнее время среди прокариот обнаружены организмы, отличающиеся от описанных выше основных форм. Некоторые бактерии имеют вид кольца, замкнутого или разомкнутого в зависимости от стадии роста (рис. 3, 9). У прокариот, в основном размножающихся почкованием, описано образование клеточных выростов (простек), число которых может колебаться от 1 до 8 и больше (рис. 3, 10). Из природных субстратов выделены бактерии червеобразной формы (длинные клетки с загнутыми, очень тонкими концами) и напоминающие шестиугольную звезду (рис. 3, 11, 12). Для некоторых групп прокариот характерно слабое или довольно хорошо выраженное ветвление (рис. 3, 13). Описаны прокариоты, обладающие морфологической изменчивостью (плеоморфизмом), которые в зависимости от условий могут иметь вид палочек, кокков или слабоветвящихся форм. Форма многоклеточных прокариот также разнообразна: это скопления различной формы, чаще — нити (рис. 3, 14—16). Свообразие бактериальным клеткам придают жгутики, имеющие различное расположение на клеточной поверхности (рис. 3, 8, 15, 17, 18), а также выделения внеклеточных веществ разной химической природы (рис. 3, 19—22).

Форма клетки прокариот определяется жесткой (ригидной) клеточной стенкой. Именно последняя придает клетке определенную, наследственно закрепленную внешнюю форму. Консерватизм этого признака был вначале, скорее, угадан, а позднее доказан и использован при создании первых классификаций микроорганизмов. Но и из этого положения имеются исключения. У ряда бактерий клеточная стенка довольно эластична, поэтому они способны в определенных пределах менять форму клеток, например, путем периодического изгибания. Наконец, известны прокариоты, у которых клеточная стенка отсутствует совсем. Это микоплазмы и L-формы. Микоплазмы существуют в природе и в большинстве патогенны для человека и животных. L-формы получены экспериментально под действием химических соединений, которые разрушают клеточную стенку бактерий или подавляют синтез веществ, являющихся ее необходимыми компонентами. Для этих организмов характерен ярко выраженный плеоморфизм.

Строение, химический состав и функции компонентов прокариотной клетки

Клетка прокариотных организмов обладает рядом принципиальных особенностей, касающихся как ее ультраструктурной, так и химической организации (рис. 4). Структуры, расположенные снаружи от

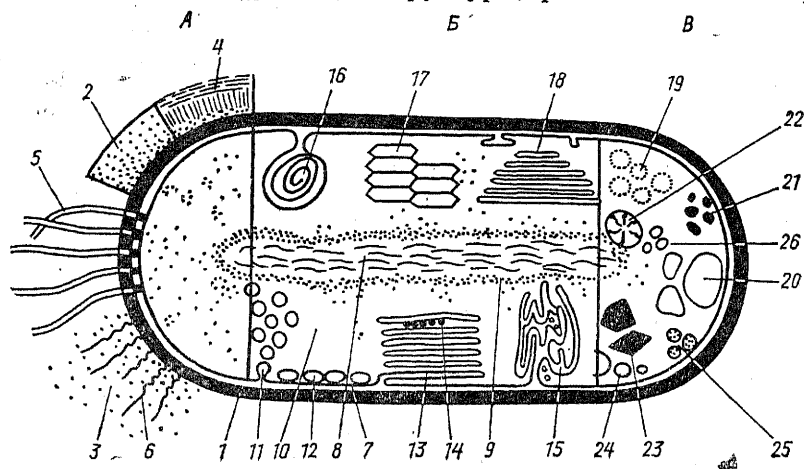


Рис. 4. Схематическое комбинированное изображение прокариотной клетки. А. Поверхностные клеточные структуры и внеклеточные образования: 1 — клеточная стенка; 2 — капсула; 3 — слизистые выделения; 4 — чехол; 5 — жгутики; 6 — ворсинки.

Б. Цитоплазматические клеточные структуры: 7 — ЦПМ; 8 — нуклеоид; 9 — рибосомы; 10 — цитоплазма; 11 — хроматофоры; 12 — хлоросомы; 13 — пластинчатые тилакоиды; 14 — фикобилисомы; 15 — трубчатые тилакоиды; 16 — мезосома; 17 — аэросомы (газовые вакуоли); 18 — ламеллярные структуры.

В. Запасные вещества: 19 — полисахаридные гранулы; 20 — гранулы поли-β-оксимасляной кислоты; 21 — гранулы полифосфата; 22 — цианофициновые гранулы; 23 — карбоксисомы (полиэдральные тела); 24 — включения серы; 25 — жировые капли; 26 — углеводородные гранулы (по Schlegel, 1972)

ЦПМ (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол, жгутики, ворсинки), называют обычно поверхностными структурами. Термином «клеточная оболочка» часто обозначают все слои, располагающиеся с внешней стороны от ЦПМ (клеточная стенка, капсула, слизистый чехол). ЦПМ вместе с цитоплазмой называется протопластом. Рассмотрим сначала строение, химический состав и функции поверхностных клеточных структур.

Клеточная стенка

Клеточная стенка — важный и обязательный структурный элемент прокариотной клетки (исключение — микоплазмы и L-формы), располагающийся под капсулой или слизистым чехлом или же непосредственно контактирующий с окружающей средой (у клеток, не содержащих этих слоев клеточной оболочки). На долю клеточной стенки приходится от 5 до 50% сухих веществ клетки. Клеточная стенка служит механическим барьером между протопластом и внешней средой и придает клеткам определенную, присущую им форму. Концентрация солей в клетке, как правило, намного выше, чем в окру-

жающей среде, и поэтому между ними существует большое различие в осмотическом давлении. Клеточная стенка чисто механически защищает клетку от проникновения в нее избытка воды.

По строению и химическому составу клеточная стенка прокариот резко отличается от таковой эукариотных организмов. В ее состав входят специфические полимерные комплексы, которые не содержатся в других клеточных структурах. Химический состав и строение клеточной стенки постоянны для определенного вида и являются важным диагностическим признаком. В зависимости от строения клеточной стенки прокариоты делятся на две большие группы. Было обнаружено, что если фиксированные клетки прокариот обработать сначала кристаллическим фиолетовым, а затем йодом, образуется окрашенный комплекс. При последующей обработке спиртом в зависимости от строения клеточной стенки судьба комплекса различна: у так называемых грамположительных видов этот комплекс удерживается клеткой, и последние остаются окрашенными, у грамотрицательных видов, наоборот, окрашенный комплекс вымывается из клеток и они обесцвечиваются¹. У некоторых прокариот положительная реакция при окрашивании описанным выше способом свойственна только клеткам, находящимся в стадии активного роста. Выяснено, что окрашенный комплекс образуется на протопласте, но его удерживание клеткой или вымывание из нее при последующей обработке спиртом определяются особенностями строения клеточной стенки.

Клеточные стенки грамположительных и грамотрицательных про-

Таблица 3

Химический состав клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных прокариот (по Rose, 1971; Freer, Salton, 1971)

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

Обозначения: (+) — присутствуют; (—) — отсутствуют; (±) — присутствуют не у всех видов.

¹ Этот способ окрашивания был впервые предложен в 1884 г. датским ученым Х. Грамом (Ch. Gram, 1853—1938), занимавшимся окрашиванием тканей. Позднее он был использован для окрашивания прокариот.

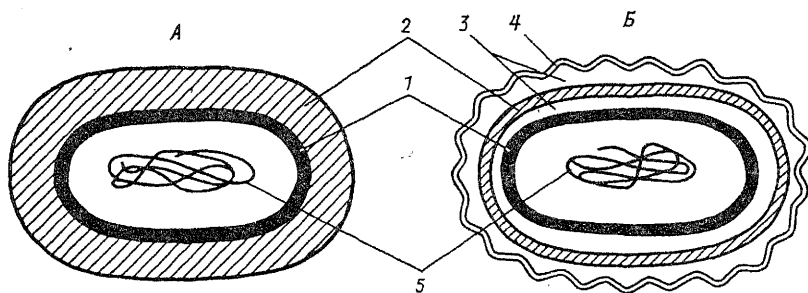


Рис. 5. Схематическое изображение клеточной стенки грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) прокариот:
 1 — цитоплазматическая мембрана; 2 — пептидогликан; 3 — периплазматическое пространство; 4 — наружная мембрана; 5 — ДНК

кариот резко различаются как по химическому составу (табл. 3), так и по ультраструктуре (рис. 5).

В состав клеточной стенки прокариот входят семь различных групп химических веществ, при этом пептидогликан присутствует только в клеточной стенке, придавая ей необходимую жесткость. У грамположительных прокариот он составляет основную массу вещества клеточной стенки (от 50 до 90%), у грамотрицательных — содержание пептидогликана значительно меньше (1—10%). Клеточная стенка изученных видов цианобактерий, сходная с таковой грамотрицательных прокариот, содержит от 22 до 52% этого гетерополимера.

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

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

Клеточная стенка грамположительных прокариот. Основную массу клеточной стенки грамположительных прокариот составляет специфический гетерополимер — пептидогликан. Полисахаридный остов молекулы построен из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных между собой посредством β -1,4-гликозидных связей (рис. 6). Молекула N-ацетилглюкозамина — производное глюкозы, в котором гидроксильная группа при втором атоме углерода замещена аминогруппой; к последней в свою очередь присоединен ацетильный остаток. N-ацетилмурамовая кислота представляет собой эфир N-ацетилглюкозамина и молочной кислоты, к кар-

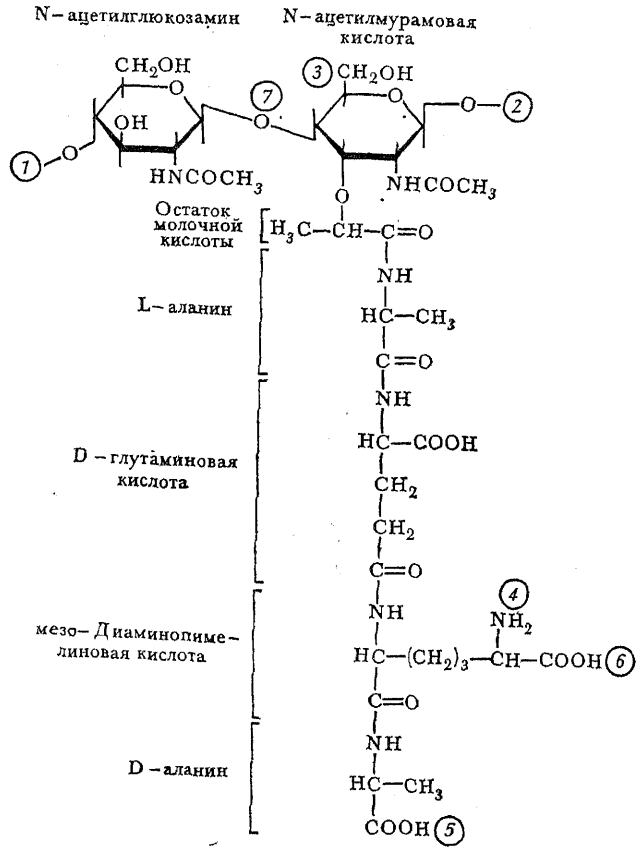
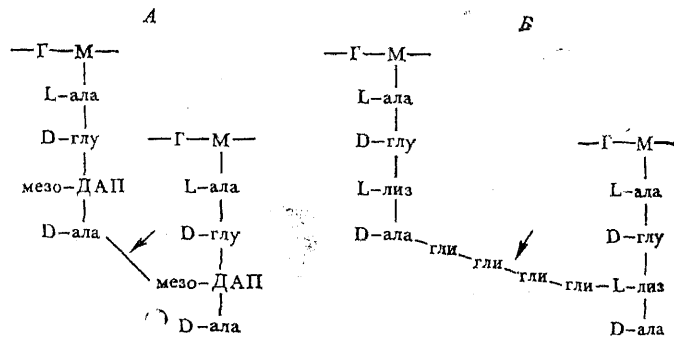


Рис. 6. Структура повторяющейся единицы пептидогликана клеточной стенки прокариот. Цифры в кружках обозначают: 1, 2 — места полимеризации гликанового остова молекулы; 3 — место присоединения с помощью фосфодиэфирной связи молекулы тейхоевой кислоты в клеточной стенке грамположительных прокариот; 4, 5 — места, по которым происходит связывание между гликановыми цепями с помощью пептидных связей; 6 — место ковалентного связывания (пептидная связь) с липопротеидом наружной мембраны у грамотрицательных прокариот; 7 — место действия лизоцима

боксильной группе которой присоединен короткий пептидный хвост, состоящий из небольшого числа (обычно 4—5) аминокислот: D- и L-аланина, L-лизина, D-глутаминовой, мезо-диаминопимелиновой кислот и некоторых других. Две особенности пептидного хвоста заслуживают внимания: наличие аминокислот в D-форме (неприродная кон-

Рис. 7. Схематическое изображение пептидных мостиков между гетерополимерными цепочками:

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



фигурация) и высокое содержание аминокислот с двумя аминогруппами. Это имеет принципиальное значение для пространственной организации пептидогликана.

Обе аминогруппы этих аминокислот могут участвовать в образо-

вании пептидных связей, причем вторые аминогруппы — в образовании дополнительных пептидных связей между гетерополимерными цепочками. В большинстве случаев в образовании пептидной связи участвует карбоксильная группа D-аланина одного тетрапептида и свободная аминогруппа диаминокислоты другого (рис. 7, А). Иногда связь между тетрапептидами разных гликановых цепей осуществляется

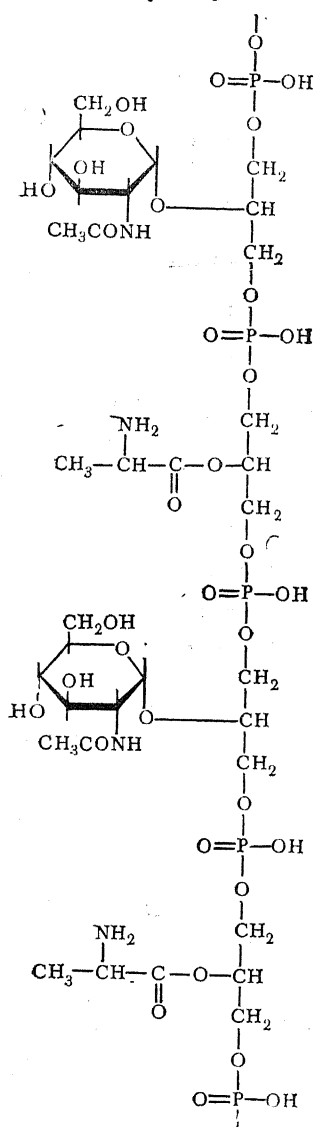


Рис. 8. Структурная формула глиперинтейхоевой кислоты. Содержит чередующиеся остатки D-аланина и N-ацетилглюкозамина (по Rose, 1971)

с помощью других аминокислот (рис. 7, Б). Нетрудно себе представить, что таким образом можно «сшить» между собой множество гетерополимерных цепей. Частота «сшивков» различна, поскольку не все пептидные хвосты участвуют в образовании межцепочечных связей. Некоторые образуют ковалентные связи с другими химическими молекулами, входящими в состав клеточной стенки, и, наконец, часть тетрапептидных хвостов находится в свободном состоянии.

Пептидогликан, окружающий протопласт грамположительных бактерий, — это по существу одна гигантская молекула с перекрестно расположенными гликановыми цепями, «сшитая» с помощью гликозидных и пептидных связей. Именно последние обеспечивают ей жесткую трехмерную пространственную организацию.

Кроме пептидогликана в состав клеточных стенок грамположительных прокариот входит другой уникальный класс химических соединений — тейхоевые кислоты, представляющие собой полимеры, построенные на основе рибита (пятиатомного спирта) или глицерина (трехатомного спирта), остатки которых соединены между собой фосфодиаэфирными связями (рис. 8). Свободные гидроксильные группы в молекулах спиртов могут быть замещены остатками D-аланина, глюкозы, N-ацетилглюкозамина и некоторых других сахаров. Тейхоевые кислоты ковалентно могут соединяться с N-ацетилмуравовой кислотой (см. рис. 6). Поскольку это длинные линейные молекулы, они могут пронизывать весь пептидогликановый слой, достигая внешней поверхности клеточной стенки. В этом случае, вероятно, они являются основными антигенами грамположительных прокариот.

В составе клеточной стенки грамположительных прокариот в небольших количествах также найдены полисахариды, белки и липиды. Для полисахаридов и липидов показана возможность ковалентного связывания с макромолекулами клеточной стенки, в отличие от белков, которые (у тех видов, где имеются)

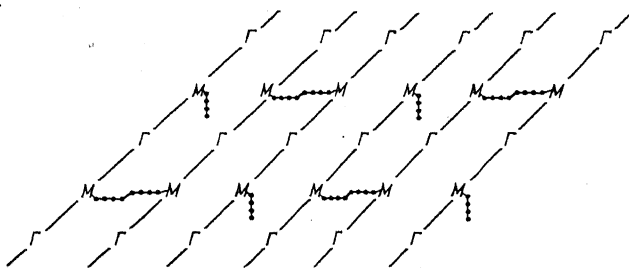
формируют на ее внешней поверхности отдельный слой. Таким образом, основными компонентами клеточной стенки грам-

положительных прокариот являются три типа макромолекул: пептидогликаны, тейхоевые кислоты и полисахариды, которые с помощью ковалентных связей образуют сложную структуру с весьма упорядоченной пространственной организацией. О механической прочности этой структуры говорит тот факт, что она может выдерживать давление до 30 атм.

Клеточная стенка грамотрицательных прокариот. У грамотрицательных прокариот строение клеточной стенки намного сложнее, чем у грамположительных (см. рис. 5). В ее состав входит гораздо большее число макромолекул разного химического типа (см. табл. 3). Пептидогликан образует только внутренний слой клеточной стенки, неплотно прилегая к ЦПМ. Для разных видов грамотрицательных прокариот содержание этого гетерополимера колеблется в широких пределах (1—10% и больше от веществ клеточной стенки). Предполагается, что у большинства видов грамотрицательных прокариот он образует одно- или двухслойную структуру, характеризующуюся весьма редкими поперечными связями между гетерополимерными цепями (рис. 9).

Рис. 9. Схематическое изображение однослойной структуры пептидогликана.

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



Химическая структура пептидогликана грамотрицательных прокариот в основном сходна со структурой типичного пептидогликана грамположительных прокариот (см. рис. 6, 7, А). Снаружи от пептидогликана располагается дополнительный слой клеточной стенки — наружная мембрана. Она состоит из полисахаридов, белков и липидов (рис. 10, А).

Специфическим компонентом наружной мембраны является липополисахарид сложного молекулярного строения (рис. 10, Б).

Помимо слоев клеточной стенки, типичных для большинства грамотрицательных прокариот, у некоторых представителей этой группы обнаружены дополнительные слои разной электронной плотности, располагающиеся с внешней стороны от наружной клеточной мембраны. Однако до настоящего времени не ясно, относятся ли они к клеточной стенке, являясь результатом ее последующего усложнения, или же представляют собой структурные элементы многослойного чехла.

Необычные клеточные стенки прокариот. Некоторые скользящие бактерии (миксобактерии, флексибактерии) способны в процессе перемещения по твердому субстрату периодически менять форму клеток, например путем изгибания, что говорит об эластичности их клеточной стенки, и в первую очередь ее пептидогликанового слоя. Электронно-микроскопическое изучение, однако, обнаружило у этих бактерий клеточную стенку, типичную для грамотрицательных прокариот с жесткой клеточной стенкой. Наиболее вероятное объяснение гибкости клеточной стенки у некоторых скользящих бактерий — чрезвычайно низкая сшитость ее пептидогликанового компонента.

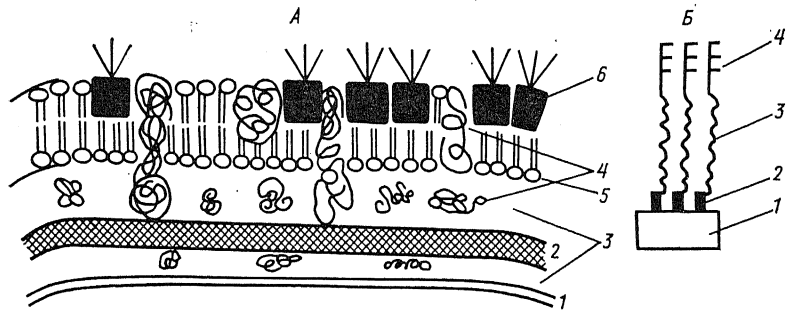


Рис. 10. А. Схематическое изображение клеточной стенки грамотрицательных прокариот: 1 — цитоплазматическая мембрана; 2 — пептидогликановый слой; 3 — периплазматическое пространство; 4 — молекулы белков; 5 — фосфолипид; 6 — липополисахарид.
 Б. Схематическое изображение строения молекулы липополисахарида: 1 — липид А; 2 — внутреннее полисахаридное ядро; 3 — наружное полисахаридное ядро; 4 — О-антиген

Наконец, обнаружены прокариоты, клеточная стенка которых по структуре и химическому составу резко отличается от описанных выше типов. Это метанобразующие бактерии, галобактерии и ацидофильно-термофильные бактерии рода *Sulfolobus*. В клеточных стенках некоторых метанобразующих бактерий, дающих положительную реакцию при окрашивании по Граму, обнаружен пептидогликан особого химического строения, получивший название псевдомуреина². Химический анализ клеточных стенок этих бактерий обнаружил, что гликановый остов построен из N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилгалактозаминуриновой кислоты, а пептидные фрагменты — только из L-аминокислот (глутаминовой, аланина, лизина). Ни мурамовой кислоты, ни D-аминокислот не обнаружено. Под электронным микроскопом клеточная стенка этих бактерий выглядит как однородный слой толщиной 15—40 нм, ничем морфологически не отличающийся от клеточной стенки типичных грамположительных прокариот.

Описаны метанобразующие бактерии с очень толстой (500 нм) аморфной клеточной стенкой, дающей положительную реакцию по Граму, построенной исключительно из кислого гетерополисахарида, в составе которого обнаружен галактозамин, нейтральные сахара и уроновые кислоты. Наличие у этих бактерий положительной реакции по Граму может служить указанием на то, что она определяется не химическим составом клеточной стенки, а только ее строением.

Наконец, у некоторых галобактерий, метанобразующих бактерий и ацидофильно-термофильных бактерий рода *Sulfolobus* клеточная стенка построена только из белка. В некоторых случаях в следовых количествах обнаружены аминокислоты. Под электронным микроскопом клеточная стенка выглядит обычно как ряд регулярно расположенных белковых субъединиц. Все бактерии с клеточной стенкой белковой природы грамотрицательны.

Прокариоты без клеточной стенки. При воздействии определенными химическими веществами оказалось возможным получать в лаборатории из разных видов прокариот формы с частично (сферопласты) или полностью (протопласты) отсутствующей клеточной стенкой. Впервые это обнаружили при действии на бактериальные клетки лизоцимом, ферментом из группы гликозидаз, содержащимся в яичном белке,

² В составе всех до сих пор известных пептидогликанов в качестве обязательного химического компонента присутствовала мурамовая кислота. Отсюда и часто употребляющееся их название — муренин.

слезной жидкости и выделяемом некоторыми бактериями. Было выяснено, что лизоцим разрывает β -1,4-гликозидные связи, соединяющие остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты в гетерополисахаридной цепи (см. рис. 6), что в конечном итоге может привести к полному удалению пептидогликана из клеточной стенки. Полученные под действием лизоцима сферопласты (из грамотрицательных прокариот) или протопласты (из грамположительных) принимают сферическую форму и очень чувствительны к внешнему осмотическому давлению. Существовать они могут только в условиях, когда осмотическое давление питательной среды сбалансировано с осмотическим давлением внутри клетки. В благоприятных условиях сферопласты и протопласты проявляют определенную метаболическую активность, но утрачивают способность к размножению.

Прокариоты, не содержащие клеточной стенки, обнаружены и в природе. Это группа микоплазм, сапрофитов и внутриклеточных паразитов растений, животных и человека. Отсутствие у них клеточной стенки повлекло за собой ряд морфологических, культуральных и цитологических особенностей. Функции клеточной стенки у микоплазм частично выполняет ЦПМ. Формы, сходные с микоплазмами, были получены также опытным путем с помощью пенициллина, лизоцима и других факторов. Это так называемые L-формы. В благоприятных условиях они обладают метаболической активностью и способностью к размножению. L-формы могут быть генетически стабильными. Существует точка зрения, что микоплазмы произошли в результате мутации, нарушившей синтез веществ клеточной стенки, от обычных бактериальных форм аналогично тому, как в экспериментальных условиях получают генетически стабильные L-формы.

Уникальность химического состава клеточной стенки прокариот, ее отличие от таковой эукариот сделали возможным создание и применение лекарственных препаратов, специфически действующих только на прокариотную клеточную стенку. На этом основано действие пенициллина, бацитрацина, ванкомицина, новобиоцина и других антибиотиков, подавляющих разные этапы синтеза пептидогликана. Пенициллин, например, ингибирует образование связей между пептидными хвостами на этапе «сшивания» полимера, происходящего в клеточной стенке в процессе роста прокариотной клетки (см. рис. 7).

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

Структурная дифференцировка клеточной стенки у грамотрицательных прокариот, приведшая к формированию дополнительного слоя в виде наружной мембраны, значительно расширила круг функций клеточной стенки. Прежде всего это связано с проблемами проницаемости и избирательного транспорта веществ в клетку. Наружная мембрана имеет специфические и неспецифические каналы (диффузионные поры) для пассивного транспорта веществ и ионов, необходимых клетке, т. е. осуществляет функции дополнительного клеточного барьера (основной — ЦПМ). Она препятствует проникновению в клетку токсических веществ, что находит отражение в большей устойчивости грамотрицательных прокариот (сравнительно с грамположительными) к действию некоторых ядов, химических веществ, ферментов и антибиотиков. Появление у грамотрицательных прокариот дополнительной мембраны в составе клеточной стенки фактически привело к созданию

обособленной полости (периплазматического пространства), отграниченной от цитоплазмы и внешней среды специфическими мембранами и несущей важную функциональную нагрузку.

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

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

Капсулы, слизистые слои и чехлы

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

Под капсулой понимают слизистое образование, обволакивающее клетку, сохраняющее связь с клеточной стенкой и имеющее аморфное строение (см. рис. 3, 19; 4, 2). Если толщина образования меньше 0,2 мкм и, следовательно, оно может быть обнаружено только с помощью электронного микроскопа, говорят о микрокапсуле, если больше 0,2 мкм, говорят о макрокапсуле. Последнюю можно видеть в обычный световой микроскоп. Для этого препарат просматривают в капле туши, которая не в состоянии проникнуть в капсулу. На темном фоне выделяются клетки, окруженные светлыми зонами (этот прием называется негативным контрастированием). Если же слизистое вещество имеет аморфный, бесструктурный вид и легко отделяется от поверхности прокариотной клетки, говорят о слизистых слоях, окружающих клетку (см. рис. 4, 3).

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

Связь капсулы с клеточной стенкой различна. Некоторые бак-

терий синтезируют слизистые вещества, легко отделяемые от клеток, особенно при культивировании в жидкой среде. Наоборот, у других связь между капсулой (особенно микрокапсулой) и клеточной стенкой столь прочна, что такую капсулу иногда предлагают рассматривать как часть клеточной стенки. Наличие капсулы зависит от штамма микроорганизма и условий его культивирования. Бактерии, образующие капсулу, могут легко в результате мутации превращаться в бескапсульные формы, что не приводит к какому-либо нарушению клеточной активности, поэтому капсулы нельзя рассматривать как обязательный структурный компонент прокариотной клетки.

Капсулы, слизистые образования и чехлы могут содержать компоненты, одинаковые с клеточной стенкой, однако их химические составы не идентичны. Как правило, химический состав капсул, образуемых бактериями, родо- или видоспецифичен. Основные химические компоненты большинства капсул прокариот — полисахариды гомо- или гетерополимерной природы. Исключение составляет капсула некоторых видов *Bacillus*, построенная из полипептида, являющегося полимером D-глутаминовой кислоты. Для ряда бактерий показана способность синтезировать и выделять в окружающую среду волокна целлюлозы.

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

Хотя капсулы, слизистые вещества и чехлы являются необязательными структурами прокариотной клетки, им приписывают определенные полезные для клетки функции. Вязкость внеклеточной среды, обусловленная наличием слизистых веществ, очевидно, благоприятна для клетки. Они защищают клетку от механических повреждений, высыхания, создают дополнительный осмотический барьер, служат препятствием для проникновения фагов. Иногда слизистые образования могут служить источником запасных питательных веществ. С помощью слизи осуществляется связь между соседними клетками в колонии, а также прикрепление клеток к различным поверхностям. В настоящее время способность определенных бактерий синтезировать эти своеобразные внеклеточные полимеры находит практическое применение: их используют в качестве заменителя плазмы крови, а также для получения синтетических пленок.

Жгутики и механизмы движения

На клеточной поверхности многих прокариот имеются структуры, определяющие способность клетки к движению в жидкой среде. Это — жгутики. Их число, размеры, расположение, как правило, являются признаками, постоянными для определенного вида, и поэтому учитываются при систематике прокариот. Однако в последнее время накапливаются данные о том, что количество и расположение жгутиков у одного и того же вида может в значительной степени определяться условиями культивирования и, следовательно, не стоит переоценивать таксономическое значение этого признака.

Если жгутики находятся у полюсов или в полярной области клетки, говорят об их полярном или субполярном расположении, если — вдоль боковой поверхности, говорят о латеральном расположении. В зависимости от числа жгутиков и их локализации на поверхности клетки различают монополярные монотрихи (один жгутик прикреплен

к одному из полюсов клетки; см. рис. 3, 8), монополярные политрихи (пучок жгутиков расположен на одном из полюсов клетки), биполярные политрихи (на каждом полюсе — по пучку жгутиков; см. рис. 3, 17) и перитрихи (многочисленные жгутики расположены по всей поверхности клетки или вдоль ее боковой поверхности; см. рис. 3, 18). В последнем случае число жгутиков может достигать 1000 на клетку.

Обычная толщина жгутика — 10—20 нм, длина — от 3 до 15 мкм. У некоторых бактерий длина жгутика может на порядок превышать диаметр клетки. Как правило, полярные жгутики более толстые, чем перитрихальные. Скорость перемещения бактерий с помощью жгутиков высока (20—60 мкм/с). Изучение строения жгутика под электронным микроскопом обнаружило, что он состоит из трех частей (рис. 11).

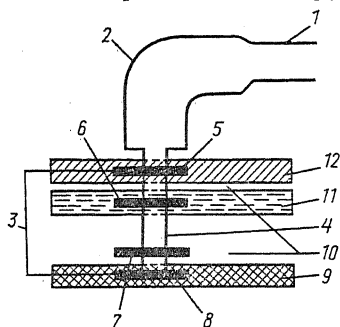


Рис. 11. Схематическое изображение строения жгутика грамотрицательных прокариот:
1 — нить; 2 — крюк; 3 — базальное тело; 4 — стержень; 5 — L-кольцо; 6 — P-кольцо; 7 — S-кольцо; 8 — M-кольцо; 9 — ЦПМ; 10 — периплазматическое пространство; 11 — пептидогликановый слой; 12 — наружная мембрана (по De Pamphilis, Adler, 1971)

Основную массу жгутика (до 95%) составляет длинная спиральная нить (фибрилла), у поверхности клеточной стенки переходящая в утолщенную изогнутую структуру — крюк. Нить с помощью крюка прикреплена к базальному телу, вмонтированному в ЦПМ и клеточную стенку. У большинства прокариот нить состоит только из одного типа белка — флагеллина. Белковые субъединицы уложены в виде спирали, внутри которой проходит полый канал. Нарастивание жгутика происходит с дистального конца, куда субъединицы поступают по внутреннему каналу. У некоторых видов жгутик снаружи дополнительно покрыт чехлом особого химического строения или же являющимся продолжением клеточной стенки и, вероятно, построенным из того же материала.

Крюк (толщина 20—45 нм) состоит из белка, отличающегося от флагеллина. Функция крюка не ясна. Вероятно, он служит для обеспечения гибкого соединения нити с базальным телом. Базальное тело содержит 11 различных белков и представляет собой систему из двух или четырех колец, нанизанных на стержень, являющийся продолжением крюка. Два внутренних кольца (M и S) — обязательные составные части базального тела, в то время как наружные кольца (P и L) отсутствуют у грамположительных бактерий и, следовательно, не необходимы для движения. M-кольцо локализовано в ЦПМ, S-кольцо располагается в периплазматическом пространстве грамотрицательных или в пептидогликановом мешке грамположительных бактерий.

Кольца P и L, имеющиеся только у грамотрицательных бактерий, локализованы соответственно в пептидогликановом слое и в наружной мембране. Особенности строения базального тела определяются, таким образом, строением клеточной стенки. Интактность последней необходима для движения жгутиковых бактерий. Обработка клеток

лизосимом, приводящая к удалению пептидогликанового слоя клеточной стенки, вызывает и потерю способности бактерий к движению, хотя жгутики остаются при этом неповрежденными. Предполагается, что функция колец Р и L сводится к тому, чтобы обеспечить наилучшее крепление стержня, проходящего через клеточную стенку грамотрицательных бактерий, в то время как у грамположительных бактерий эту функцию выполняет многослойный жесткий пептидогликановый мешок.

В последнее время достигнуты большие успехи в расшифровке механизма движения прокариот, имеющих жгутики. Показано, что жгутиковый «мотор» локализован во внутренних кольцах базального тела, которые вращаются, сообщая вращение связанной с ними жгутиковой нити. Если клетка имеет много жгутиков, все они при движении собираются в пучок, вращаясь в одном направлении (рис. 12). Вращение многочисленных жгутиков (или одиночного полярного) передается клетке, начинающей вращаться в противоположном направлении. Жгутики обеспечивают эффективное движение (плавание) в жидкой среде и более медленное перемещение по поверхности твердых сред.

Для работы двигательного аппарата прокариот необходима энергия. В настоящее время установлено, что движение жгутиковых прокариот обеспечивается энергией трансмембранного электрохимического потенциала ($\Delta\mu_{H^+}$), причем обе его составляющих — электрическая ($\Delta\phi$) и концентрационная (ΔpH) — поддерживают движение. Таким образом, прокариотная клетка обладает механизмом, позволяющим превращать электрохимическую форму энергии непосредственно в механическую. Молекулярное устройство, обеспечивающее это превращение, к настоящему времени не выяснено, но можно полагать, что оно должно быть весьма эффективным, так как, по проведенным расчетам, энергия, расходуемая на движение, составляет десятые доли процента от общего количества энергетических потребностей клетки.

Необычная локализация структур, ответственных за движение, описана у спирохет (рис. 13). Трехслойная структура, окружающая клетку и называемая у спирохет наружным чехлом, аналогична наружной мембране клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Этот чехол окружает так называемый протоплазматический цилиндр, состоящий из пептидогликанового слоя клеточной стенки, ЦПМ и цитоплазматического содержимого. Протоплазматический цилиндр обвивается пучком нитчатых структур — аксиальных фибрилл. Число их колеблется от 2 до 100. Один конец каждой аксиальной фибриллы прикреплен вблизи полюса протоплазматического цилиндра, другой конец — свободный. Клетка содержит по два набора фибрилл, прикрепленных субполярно у каждого клеточного конца. Так как каждая аксиальная фибрилла тянется почти вдоль всей длины клетки, пучки фибрилл, прикрепленных у разных полюсов, в центральной части перекрываются.

Изучение строения и химического состава аксиальных фибрилл спирохет обнаружило их близкое сходство с бактериальными жгутиками. Отличие заключается в том, что аксиальные фибриллы спиро-

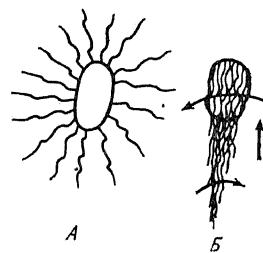


Рис. 12. Клетка *Salmonella typhimurium* в состоянии покоя (А) и при движении (Б). Стрелками показано направление вращения и движения клетки

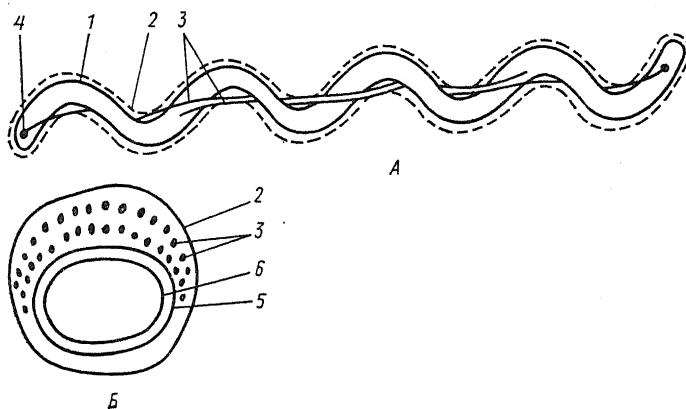


Рис. 13. Схематическое изображение клетки спирохеты в продольном (А) и поперечном (Б) разрезе. На рис. А изображена клетка, содержащая по одной аксиальной фибрилле у каждого конца; на рис. Б — поперечный разрез, прошедший через среднюю часть клетки, где показаны два пересекающихся пучка, состоящих из множества аксиальных фибрилл: 1 — протоплазматический цилиндр; 2 — наружный чехол; 3 — аксиальные фибриллы; 4 — место прикрепления аксиальных фибрилл; 5 — пептидогликановый слой клеточной стенки; 6 — ЦПМ

хет — внутриклеточные структуры, но обеспечивают движение как в жидкой среде, так и по твердому субстрату. Движение спирохет осуществляется за счет вращения фибрилл в периплазматическом пространстве между пептидогликановым слоем и наружной мембраной клеточной стенки, вызывающего эластичную волну на поверхности клеточной стенки. Spirochetes совершают движения трех типов: быстро вращаются вокруг длинной оси спирали, способны к изгибанию клеток и осуществляют передвижение по винтовому или волнообразному пути. Для спирохет (так же как для типичных жгутиковых бактерий) показано, что движение обеспечивается энергией в форме $\Delta\mu_{H^+}$.

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

Способность к скольжению обнаружена у разных групп прокариот как одноклеточных, так и многоклеточных, имеющих нитчатое строение: некоторых микоплазм, миксобактерий, цитофаг, нитчатых серобактерий, цианобактерий и др. Скорость этого типа движения невелика: 2—11 мкм/с. Общим для всех скользящих организмов является способность к выделению слизи. Кроме того, у ряда скользящих форм в составе клеточной стенки между пептидогликановым слоем и наружной мембраной обнаружен тонкий слой, состоящий из белковых фибрилл. Например, у нитчатой цианобактерии *Oscillatoria princeps* к наружной поверхности пептидогликанового слоя примыкают параллельные ряды фибрилл диаметром 5—7 нм; на 1 мкм² поверхности прихо-

дится до 55 таких фибрилл. У нитчатых цианобактерий фибриллы формируют единую систему, непрерывно в виде спирали обволакивающую весь трихом (нить). Скольжение нитчатых форм сопровождается и одновременным их вращением, так что любая точка на поверхности трихома описывает при движении спираль. Направление вращения является видоспецифическим признаком и коррелирует с направлением хода спирали белковых фибрилл.

Механизм скользящего движения не ясен. Согласно гипотезе реактивного движения оно обусловлено выделением слизи через многочисленные слизевые поры в клеточной стенке, в результате чего клетка отталкивается от субстрата в направлении, противоположном направлению выделения слизи. Однако анализ этой модели привел к заключению, что для обеспечения скольжения по реактивному механизму клетке необходимо в течение ее l выделять такой объем слизи, который во много раз превосходит ее цитоплазматическое содержимое.

По другой получившей распространение в последние годы гипотезе скользящее движение связано с особенностями строения клеточной стенки подвижных безжгутиковых форм — наличием белкового слоя, состоящего из упорядоченно расположенных фибрилл. По этим представлениям, фибриллы аналогичны нитям жгутиков с той разницей, что находятся «внутри» клеточной стенки. У некоторых скользящих бактерий описаны структуры, весьма напоминающие базальные тела жгутиковых форм. Вращательное движение фибрилл, «запускаемое» этими структурами, приводит к появлению на поверхности клетки так называемой «бегущей волны», т. е. движущихся микроскопических выпуклостей клеточной стенки, в результате чего клетка отталкивается от твердого или вязкого субстрата. На скольжение расходуется около 5% энергии от общего объема клеточных энергетических затрат. По имеющимся данным, скользящее движение в разных группах бактерий обеспечивается энергией в форме АТФ или $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$.

Необходимость для скольжения слизи пока не ясна. В некоторых случаях показано, что скольжение может происходить в среде подходящей консистенции без какого-либо выделения слизи. Более того, выделение больших количеств слизи, как правило, затрудняет движение клетки и приводит к потере ею подвижности. Согласно гипотезе «бегущей волны» выделение слизи не является абсолютно необходимым для скольжения, но облегчает в определенных условиях отталкивание клетки от субстрата.

Подвижные бактерии активно и направленно перемещаются. Такие направленные перемещения бактерий называются таксисами. Факторами, определяющими направление движения, являются концентрация веществ или кислорода в среде, освещенность и др. В зависимости от этого различаются хемо-, аэро- и фототаксисы. Подвижные клетки стремятся переместиться в ту область, в которой условия для них наиболее оптимальны.

Ворсинки

К поверхностным структурам бактериальной клетки относятся также ворсинки (фимбрии, пили) (см. рис. 4, 6). Их насчитывается от нескольких единиц до нескольких тысяч на клетку. Эти структуры не имеют никакого отношения к движению бактерий и обнаружены как у подвижных, так и неподвижных форм. Как и жгутики, ворсинки построены из одного вида белка — пилина, субъединицы которого орга-

низованы в форме одинарной полой внутри нити и берут начало от ЦПМ. Ворсинки, как правило, тоньше жгутиков (диаметр — 5—10 нм, длина — 0,3—4 мкм). Описано несколько типов ворсинок, различающихся морфологически и антигенными свойствами. Вероятно, это сборная и функционально неоднородная группа.

Наиболее хорошо изучены так называемые половые ворсинки, или F-пили, принимающие участие в половом процессе бактерий. Считают, что F-пили необходимы клетке-донору, обеспечивая контакт между ней и реципиентом и служа конъюгационным тоннелем, по которому происходит передача ДНК. Предполагается также, что ворсинки принимают участие в транспорте метаболитов, прикреплении бактерии к субстрату. Через пили в клетки могут проникать вирусы. Ворсинки нельзя считать обязательной клеточной структурой, так как без них бактерии тоже хорошо растут и размножаются.

Мембраны

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

Химический состав мембран прокариот. ЦПМ — белково-липидный комплекс, в котором белки составляют 50—75%, липиды — от 15 до 45%. Кроме того, в составе мембран обнаружено небольшое количество углеводов (табл. 4). Как правило, липиды и белки состав-

Таблица 4

Химический состав цитоплазматических мембран прокариот (по Salton, 1971)

Прокариоты	Химический состав, %		
	белки	липиды	углеводы
Грамположительные			
<i>Bacillus licheniformis</i>	75	23	—
<i>Bacillus subtilis</i>	63	18	—
<i>Bacillus megaterium</i>	67	18	5
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	52	28	16—19
<i>Staphylococcus aureus</i>	69	30	—
Грамотрицательные			
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	47	36	6
<i>Azotobacter agilis</i>	75	19	—
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52	45	2
<i>Paracoccus denitrificans</i>	60	32	1

ляют 95% и больше вещества мембран. Главным липидным компонентом бактериальных мембран являются фосфолипиды — производные 3-фосфоглицерина (рис. 14). Основные фосфолипиды бактериальных мембран — фосфатидилглицерин и кардиолипин (дифосфатидилглицерин). В меньших количествах и реже содержатся фосфатидилинозит, фосфатидилэтаноламин и аминокислотные производные фосфати-

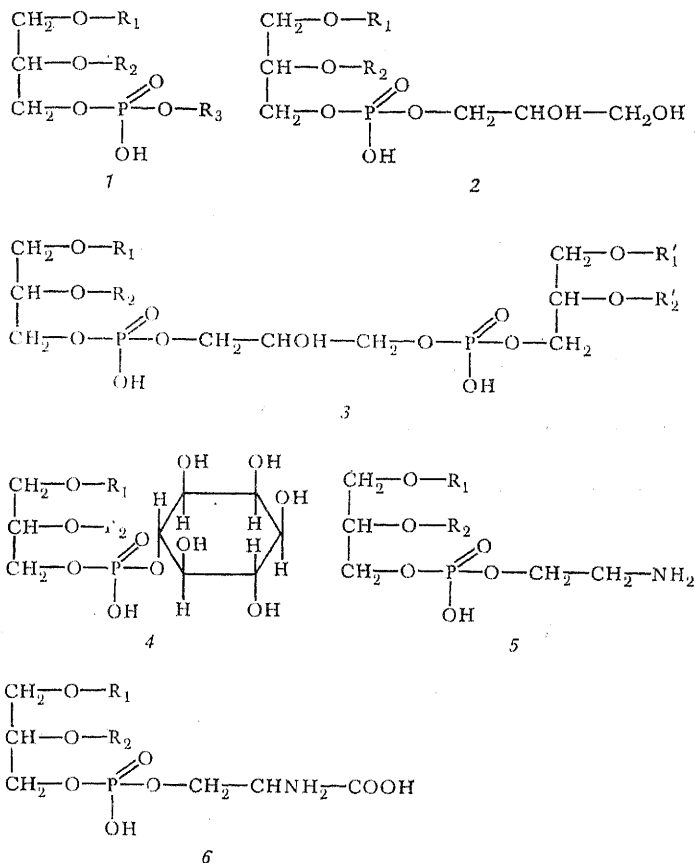


Рис. 14. Структура основных фосфолипидов мембран прокариот.

R_1 и R_2 — остатки длинноцепочечных жирных кислот, образующих гидрофобный «хвост» молекулы; R_3 может быть остатком глицерина, его производных, этаноламина, инозита и других соединений. Эта часть составляет гидрофильную «голову» молекулы. Простейшим фосфолипидом является фосфатидная кислота, не имеющая R_3 -остатка, связанного с фосфорной кислотой сложной эфирной связью. 1 — общая структура фосфолипидов; 2 — фосфатидилглицерин; 3 — дифосфатидилглицерин (кардиолипин); 4 — фосфатидилинозит; 5 — фосфатидилэтаноламин; 6 — фосфатидилсерин

диглицерина, например, фосфатидилсерин. Хотя у прокариот найдено множество различных фосфолипидов, набор их в значительной степени родо- и даже видоспецифичен.

Из других групп липидов в бактериальных мембранах широко представлены различные гликолипиды, например, моно- и диглюкозилдиглицериды (табл. 5). Стерины отсутствуют у подавляющего большинства прокариот, за исключением представителей группы микоплазм и цианобактерий. Так, в ЦПМ *Acholeplasma* содержится 10—30% холестерина, поглощаемого из внешней среды, от общего содержания мембранных липидов. В небольших количествах стерины обнаружены у ряда цианобактерий. У галофильных бактерий найден сквален — предшественник в цепи синтеза холестерина. Из других групп липидов в мембранах прокариот обнаружены каротиноиды, хиноны (менахиноны, убихиноны и др.), углеводороды.

Состав липидов в мембранах прокариот
(по Whiteside et al., 1971)

Прокариоты	Молярная доля различных фосфолипидов, %*					Гликолипиды	
	КЛ	ФГ	ФИ	ААФГ	ФЭ	ГЛ ₁	ГЛ ₂
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	39	46	13			±	+
<i>Micrococcus conglomeratus</i>	27	69		1		+	
<i>Micrococcus caseolyticus</i>	10	52		36			
<i>Sarcina lutea</i>	1	90	9			+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	4	78		17	+**		

* При вычислении принимали, что 2 моля фосфата приходится на 1 моль фосфолипида для кардиолипина и 1 моль фосфата на 1 моль для других фосфолипидов.

** Значение символов: + — присутствует; ± — по-видимому, содержится в небольших количествах. Сокращенные обозначения: КЛ — кардиолипин (дифосфатидилглицерин); ФГ — фосфатидилглицерин; ФИ — фосфатидилинозит; ААФГ — аминоацилфосфатидилглицерин; ФЭ — фосфатидилэтанолламин; ГЛ₁ и ГЛ₂ — гликолипиды

Все липиды — производные глицерина — содержат один или несколько остатков жирных кислот, состав которых у прокариот весьма своеобразен. В основном это насыщенные или мононенасыщенные жирные кислоты с 16—18-углеродными атомами. Полиненасыщенные жирные кислоты у прокариот отсутствуют. Исключение составляют цианобактерии, у разных видов которых найдены полиненасыщенные жирные кислоты типа C_{16:2}, C_{18:2}, C_{18:3}, C_{18:4}. Помимо обычных жирных кислот, т. е. обнаруживаемых и в клетках эукариот, в составе мембранных липидов прокариот находят и кислоты, не встречающиеся, как правило, в мембранах эукариот. Это циклопропановые жирные кислоты, содержащие одно или больше трехчленных колец, присоединенных вдоль углеводородной цепи. Другие, редко встречающиеся и обнаруженные практически только у прокариот кислоты — это разветвленные жирные кислоты с 15—17-углеродными атомами.

Набор жирных кислот в липидах мембран прокариот также чрезвычайно видоспецифичен. У некоторых грамположительных бактерий C₁₅-жирная кислота с разветвленной цепью может составлять до 90% всех жирных кислот липидов. Главная функция липидов — поддержание механической стабильности мембраны и придание ей гидрофобных свойств.

На долю белков приходится больше половины сухой массы мембран. К мембранам с наиболее высоким содержанием белка относятся бактериальные ЦПМ. При изучении их белкового состава не было обнаружено какого-либо универсального структурного белка. ЦПМ *Escherichia coli* содержит 27 основных и множество минорных белков, но ни один из основных белков не содержится в преобладающих количествах. Поскольку ЦПМ прокариот многофункциональна и участвует в осуществлении разнообразных ферментативных процессов, был сделан вывод, что мембранные белки — это, как правило, ферменты. По аминокислотному составу мембранные белки не отличаются от других клеточных белков, за исключением того, что в них содержится мало

(иногда следы) цистина.

В некоторых бактериальных мембранах в значительных количествах обнаружены углеводы (см. табл. 4). По-видимому, они содержатся не в свободном состоянии, а входят в состав гликолипидов и гликопротеидов.

Структура мембран. Большинство мембранных липидов образуют бислой, в которых полярные «голова» молекул обращены наружу, а гидрофобные «хвосты» погружены в толщу мембраны. Углеводородные цепи, прилегающие к полярным «головам», довольно жестко фиксированы, а более удаленные части «хвостов» обладают достаточной гибкостью. При «биологических» температурах мембранные липиды находятся в жидкокристаллическом («разжиженном») состоянии, характеризующемся частичной упорядоченностью структуры. При понижении температуры они переходят в кристаллическое состояние. Чем более ненасыщены и разветвлены остатки жирных кислот или чем большее число циклических группировок они содержат, тем ниже температура перехода из жидкокристаллического состояния в кристаллическое.

«Жидкая» структура мембран обеспечивает свободу белков, что является необходимым для осуществления процессов транспорта электронов и веществ через мембрану. Это же свойство обуславливает высокую эластичность мембран: они легко сливаются друг с другом, растягиваются и сжимаются.

В отличие от липидов у мембранных белков нет единого способа структурной организации. 30—50% белка имеет конфигурацию α -спирали, остальная часть находится преимущественно в виде беспорядочного клубка. Вероятно, часть белков лишена ферментативной активности и участвует только в поддержании мембранной структуры. В то же время доказано, что для осуществления белками некоторых функций необходима их строго упорядоченная взаимная организация в мембране. Мембранные белки подразделяются на две группы — периферические и интегральные. К первой группе относят белки, легко вымываемые из мембраны и, таким образом, связанные с поверхностями мембран. Вторую группу составляют белки, частично или полностью погруженные в толщу мембраны, а иногда пронизывающие ее насквозь. Обычно интегральные белки образуют комплексы с липидами. Белки и липиды в мембране могут быть связаны ковалентно, а также за счет электростатического и гидрофобного взаимодействий.

Предложено несколько моделей строения мембраны. Одна из первых была выдвинута Г. Доусоном и Д. Даниелли в 1935 г. (H. Davson, J. Danielli), предположившими, что мембрана — это непрерывный липидный бислой, к обеим сторонам которого снаружи прилегают слои, построенные из молекул белка (рис. 15, А). Справедливость принципиальной основы этой модели была подтверждена позднее электронно-микроскопическими исследованиями Дж. Робертсона (J. D. Robertson, 1959). Мембрана такого типа, получившая название «элементарной», на ультратонких срезах под электронным микроскопом выглядит как два электронно-плотных слоя, разделенных электронно-прозрачным промежутком. Такая модель позволила понять многие свойства природных мембран. Однако некоторые из них (повышенная проницаемость для воды и полярных полипептидов) не могли быть объяснены исходя из модели Доусона — Даниелли. Поэтому было высказано предположение о наличии в мембранах гидрофильных пор (рис. 15, Б).

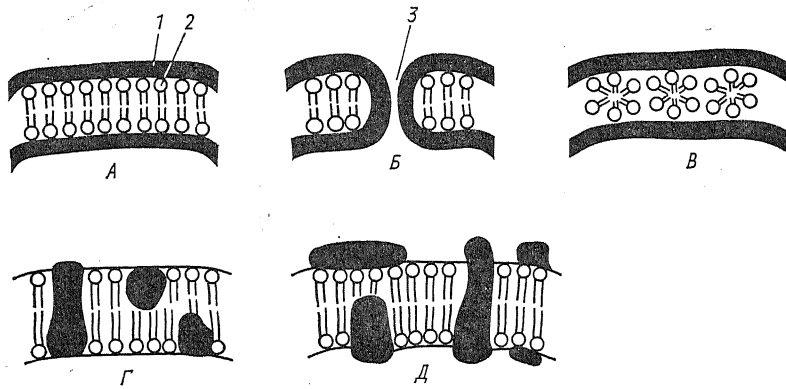


Рис. 15. Модели строения элементарной биологической мембраны. А — модель, предложенная Г. Доусоном и Д. Даниелли; Б — модель, предусматривающая наличие в мембране гидрофильных пор; В — модель мембраны, структурными единицами которой являются липидные глобулы; Г — модель, предусматривающая наличие в мембране белковых глобул; Д — одна из последних моделей мембраны, подчеркивающая асимметрию ее строения: 1 — белковый слой; 2 — липидный слой; 3 — гидрофильная пора

В ряде предложенных моделей выявлены новые возможности структурной организации мембраны. Согласно одной из них структурными единицами мембраны являются липидные глобулы, погруженные в белковую матрицу таким образом, что полярные «головы» образуют периферию глобул (рис. 15, В). По другой модели белковые глобулы погружены в липидную массу, сохраняющую организацию бислоя (рис. 15, Г). Однако в свете имеющихся данных по многообразию функций и морфологии мембран модели с повторяющимися структурными единицами воспринимаются критически.

В последнее время наибольшее признание получила модель, учитывающая большинство данных, известных о мембранах, согласно которой в липидную основу включены асимметрично расположенные белковые молекулы (рис. 15, Д). Некоторые из них образуют скопления на поверхностях липидного бислоя, другие частично или полностью погружены в него, третьи пронизывают его насквозь. В последней модели подчеркнута асимметрия строения мембраны, основанная на различиях как в химическом строении молекул белка внешнего и внутреннего слоя, так и в их расположении в каждом слое.

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

Общепризнана роль ЦПМ прокариот в превращениях клеточной энергии. У бактерий, источником энергии для которых служат процессы дыхания или фотосинтеза, в ЦПМ определенным образом расположены переносчики цепи электронного транспорта, функционирование которых приводит к генерированию электрохимической энергии ($\Delta \mu_{H^+}$), используемой затем в клетке по разным каналам, в том числе

и для образования химической энергии (АТФ). ЦПМ является одним из компонентов аппарата генерирования $\Delta\mu_{H^+}$. В мембране расположены также ферментные комплексы, обеспечивающие превращения: $\Delta\mu_{H^+} \rightleftharpoons \text{АТФ}$.

По имеющимся данным, ЦПМ принимает участие в репликации и последующем разделении хромосомы прокариотной клетки.

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

ЦПМ является основным барьером, обеспечивающим избирательное поступление в клетку и выход из нее разнообразных веществ и ионов³. Осуществляется это с помощью разных механизмов мембранного транспорта. Молекулы воды, некоторых газов (таких, как O_2 , H_2 , N_2) и углеводов, концентрации которых во внешней среде выше, чем в клетке, проходят через ЦПМ внутрь клетки посредством пассивной диффузии. Движущей силой этого процесса служит градиент концентрации вещества по обе стороны мембраны. Основным соединением, поступающим в клетку и покидающим ее таким путем, является вода. Движение воды через мембрану, подчиняющееся законам пассивной диффузии, привело к выводу о существовании в мембране пор. Эти поры пока что не удалось увидеть в электронный микроскоп, но некоторые данные о них были получены косвенными методами. Расчетным путем установлено, что поры должны быть очень мелкими и занимать небольшую часть поверхности ЦПМ. Высказывается предположение, что они не являются стабильными структурными образованиями, а возникают в результате временных перестроек молекулярной организации мембраны.

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

Известен механизм транспорта, получивший название облегченной диффузии, который требует для переноса веществ через мембрану участия транслоказ. Перенос веществ в этом случае происходит по градиенту их концентрации и не требует энергетических затрат. Этот механизм транспорта не получил широкого распространения у прокариот. Основным механизмом избирательного переноса веществ через ЦПМ прокариот является активный транспорт, позволяющий «накачивать» в клетку молекулы и ионы против их концентрационных и электрических градиентов. Этот процесс, так же как

³ У грамположительных прокариот ЦПМ является и единственным барьером такого рода, у грамотрицательных форм функции дополнительного барьера выполняет наружная мембрана клеточной стенки, через которую молекулы транспортируются только по механизму пассивной диффузии.

и облегченная диффузия, протекает при участии локализованных в ЦПМ переносчиков белковой природы с высокой специфичностью к субстрату, но в отличие от облегченной диффузии для движения против электрохимического градиента требует затрат метаболической энергии. Транспорт такого рода должен быть поэтому сопряжен с реакциями, продуцирующими энергию в химической или электрохимической форме.

Во всех описанных выше путях переноса веществ через ЦПМ они поступают в клетку в химически неизменном виде. У прокариот известны системы транспорта, с помощью которых осуществляется поступление в клетку ряда сахаров, при этом процесс их переноса через мембрану сопровождается химической модификацией молекул. Так происходит, например, поступление в клетки многих прокариот молекул глюкозы, в процессе которого они фосфорилируются. Источником фосфатной группы служит фосфоенолпируват, от которого фосфатный остаток ферментативно переносится на молекулу специального белка, а с него при участии второго фермента, локализованного в ЦПМ и обнаруживающего высокую субстратную специфичность, фосфатная группа поступает на молекулу глюкозы. Глюкоза в виде глюкозо-6-фосфата высвобождается в цитоплазму и может накапливаться в ней, так как ЦПМ непроницаема для подавляющего большинства фосфорилированных соединений. Такая система переноса глюкозы и ряда других сахаров получила название фосфотрансферазной. Перенос веществ с помощью фосфотрансферазной системы оказался весьма выгодным с энергетической точки зрения. Хотя при этом происходит затрата богатой энергией фосфатной связи молекулы фосфоенолпирувата, в процессе переноса образуется молекула глюкозы в фосфорилированной форме, что делает ненужным фосфорилирование глюкозы за счет АТФ на первом этапе ее катаболизирования.

Внутрицитоплазматические мембраны прокариот. Выше были отмечены различия между прокариотной и эукариотной клетками в отношении их мембранных систем (см. табл. 1). Отсутствие у прокариот типичных органелл, т. е. структур, полностью отграниченных от цитоплазмы элементарными мембранами, — принципиальная особенность их клеточной организации.

В клетках разных групп прокариот обнаружены мембраны, построенные по принципу элементарной, иные, нежели ЦПМ. Строение, химический состав и функции наружной мембраны грамотрицательных бактерий описаны ранее. Имеющиеся данные говорят о том, что наружную мембрану можно рассматривать как мембрану другого типа, отличного от ЦПМ. Это касается конкретных аспектов ее строения и функционирования, но не основного принципа организации. Однако наружная мембрана относится к поверхностным структурам прокариотной клетки.

Среди внутрицитоплазматических мембран выделяют несколько видов (табл. 6). Развитая система внутрицитоплазматических мембран характерна для большинства фотосинтезирующих прокариот. Поскольку было показано, что в этих мембранах локализован фотосинтетический аппарат клетки, они получили общее название фотосинтетических мембран. Все фотосинтетические мембраны (как и все внутриклеточные) — производные ЦПМ, возникшие в результате ее разрастания и глубокого впячивания (инвагинации) в цитоплазму. У некоторых организмов (пурпурные бактерии) фотосинтетические мембраны сохранили тесную связь с ЦПМ, легко обнаруживаемую при электронномикроскопическом изучении ультратонких срезов клетки. У цианобак-

Мембраны прокариот

Прокариоты	Физиологические группы	Мембраны				
		наружная клеточная	цитоплазматическая	внутрицитоплазматические		
				фотосинтетические	мезосомальные	прочие
Грамположительные	хемотрофы	—	+	—	±	—
Грамотрицательные	фототрофы	+	+	±*	∓	—
	хемотрофы	+	+	—	∓	+**

* Отсутствуют у зеленых бактерий и цианобактерии *Gloeobacter violaceus*.

** Сильно развиты у нитрифицирующих, азотфиксирующих, метаноокисляющих бактерий.

терий эта связь менее очевидна. Одни авторы считают, что связь фотосинтетических мембран с ЦПМ у цианобактерий всегда существует, но трудно выявляется, поскольку редко попадает в плоскость среза препарата. По другому мнению, фотосинтетические мембраны цианобактерий — структуры, возникшие первоначально из ЦПМ, но впоследствии отделившиеся от нее и являющиеся в настоящее время автономными клеточными компонентами.

Внутрицитоплазматические мембраны фотосинтезирующих прокариот могут иметь вид трубочек, пузырьков (везикул, хроматофоров) или уплощенных замкнутых дисков (тилакоидов), образованных двумя тесно сближенными мембранными пластинами (ламеллами) (см. рис. 4). Система фотосинтетических мембран очень пластична. Ее морфология и степень развития в клетке определяются многими факторами внешней среды (интенсивностью света, концентрацией кислорода, снабжением клетки питательными веществами), а также возрастными характеристиками культуры. В то же время в группе зеленых бактерий и у цианобактерии *Gloeobacter violaceus* нет внутриклеточных фотосинтетических мембран. Основные компоненты их фотосинтетического аппарата локализованы в ЦПМ, и только светособирающие пигменты находятся в особых, не содержащих элементарных мембран частицах, примыкающих к ЦПМ: хлоросомах у зеленых бактерий и фикобилисомах у цианобактерии.

У прокариот, принадлежащих к разным группам, описаны локальные впячивания ЦПМ, получившие название мезосом (см. рис. 4). Хорошо развитые и сложно организованные мезосомы характерны для грамположительных прокариот. У грамотрицательных видов они встречаются значительно реже и относительно просто организованы. Мезосомы различаются размерами, формой и локализацией в клетке. Выделяют три основных типа мезосом: ламеллярные (пластинчатые), везикулярные (имеющие форму пузырьков) и тубулярные (трубчатые). Часто можно наблюдать мезосомы смешанного типа: состоящие из ламелл, трубочек и пузырьков. По расположению в клетке различают мезосомы, образующиеся в зоне клеточного деления и формирования поперечной перегородки (септы), мезосомы, к которым прикреплен нуклеоид, и мезосомы, сформированные в результате инвазии периферических участков ЦПМ.

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

Высказывается также предположение, что мезосомы не принимают активного участия в процессах клеточного метаболизма, но выполняют структурную функцию, обеспечивая компартиментализацию прокариотной клетки, т. е. пространственное разграничение внутриклеточного содержимого на относительно обособленные отсеки, что создает более благоприятные условия для протекания определенных последовательностей ферментативных реакций. Одновременное существование различных гипотез относительно роли мезосом в прокариотной клетке уже указывает на то, что их функции продолжают оставаться неясными. Наиболее вероятен взгляд на мезосомы как на структуры, служащие для усиления мембранозависимых функциональных активностей клетки.

Сильно развитая система внутрицитоплазматических мембран, морфологически отличающихся от мезосомальных, описана у представителей трех групп грамотрицательных хемотрофных бактерий (азотфиксирующих, нитрифицирующих и метанооксиляющих), для которых показана высокая активность дыхания, а также способность метаболизировать растворенные в жидкой среде газообразные соединения.

Цитоплазма и рибосомы

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

Рибосомы — рибонуклеопротеидные частицы размером 15—20 нм. Их количество в клетке зависит от интенсивности процессов синтеза белка. В быстро растущей клетке *Escherichia coli* содержится приблизительно 15 000 рибосом, общая масса которых может составлять примерно 1/4 всей клеточной массы. Отношение РНК/белок в рибосомах *E. coli* составляет 2 : 1, у других прокариот оно может быть несколько сдвинуто в сторону преобладания белка.

Рибосомы прокариот имеют константу седиментации 70 S, отчего получили название 70 S-частиц. Они построены из двух неодинаковых субчастиц: 30 S- и 50 S-субъединиц⁴. 30 S-частица содержит 1 молекулу 16 S-РНК и в большинстве случаев по одной молекуле белка

⁴ Обозначения 30S, 50S, 70S — константы седиментации, характеризующие скорость, с которой эти частицы осаждаются в центрифуге при определенных стандартных условиях.

21 вида. 50 S-субъединица состоит из двух молекул РНК (23 S и 5 S). В ее состав входят около 35 различных белков, также представленных, как правило, одной копией. Большая часть рибосомальных белков выполняет структурную функцию.

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

Генетический аппарат и репликация хромосомы

Строение генетического аппарата прокариот долгое время было предметом жарких дискуссий, суть которых сводилась к тому, есть или нет у них такое же ядро, как у эукариот. В настоящее время установлено, что генетический материал прокариотных организмов, как и эукариотных, представлен ДНК, но имеются существенные различия в его структурной организации. У прокариот ДНК представляет собой более или менее компактное образование, занимающее определенную область в цитоплазме и не отделенное от нее мембраной, как это имеет место у эукариот. Чтобы подчеркнуть структурные различия в генетическом аппарате прокариотных и эукариотных клеток, предложено у первых его называть нуклеоидом в отличие от ядра у вторых.

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

Вся генетическая информация прокариот содержится в одной молекуле ДНК, имеющей форму ковалентно замкнутого кольца и получившей название бактериальной хромосомы⁵. Длина молекулы в развернутом виде может составлять более 1 мм, т. е. почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки. Длительное время считали, что в распределении нитей ДНК бактериальной хромосомы не прослеживается никакой закономерности. Однако если исходить из того, что молекула ДНК образует беспорядочный клубок, трудно объяснить процесс репликации и последующее распределение образовавшихся хромосом по дочерним клеткам. Специальные исследования показали, что хромосомы прокариот представляют собой высокоупорядоченную компактную структуру. Такая структура, получившая название «компактная хромосома», имеет высокую константу седиментации, равную 1300—2000S для свободной и 3200—7000S для связанной с мембраной формы. В том и другом случае ДНК в этой структуре представлена системой из 20—100 независимо суперспирализованных петель. В обеспечении суперспирализованной организации хромосомы участвуют молекулы РНК.

Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах $1-3 \cdot 10^9$ Д⁶. В группе микоплазм генетический материал

⁵ В прокариотной клетке ДНК может находиться и вне бактериальной хромосомы — в плазидах, но последние не являются обязательными клеточными компонентами.

⁶ Д — дальтон, или единица атомной массы, равен $1,66033 \cdot 10^{-27}$ кг.

представлен молекулами, имеющими наименьшее для клеточных организмов количество ДНК ($0,4-0,5 \cdot 10^9$), а наибольшее содержание ДНК обнаружено у нитчатых цианобактерий ($8,5 \cdot 10^9$). Хотя каждая прокарриотная клетка содержит 1 хромосому, часто в экспоненциально растущей культуре количество ДНК на клетку может достигать массы, равной 3, 4, 8 и более хромосомам. Нередко в клетках при действии на них определенных факторов (температуры, рН среды, ионизирующего излучения, солей тяжелых металлов, некоторых антибиотиков и др.) происходит образование множества копий хромосомы. При устранении воздействия этих факторов, а также после перехода в стационарную фазу в клетках, как правило, обнаруживается по одной копии хромосомы⁷.

ДНК прокарриот построена так же, как и эукарот (рис. 16).

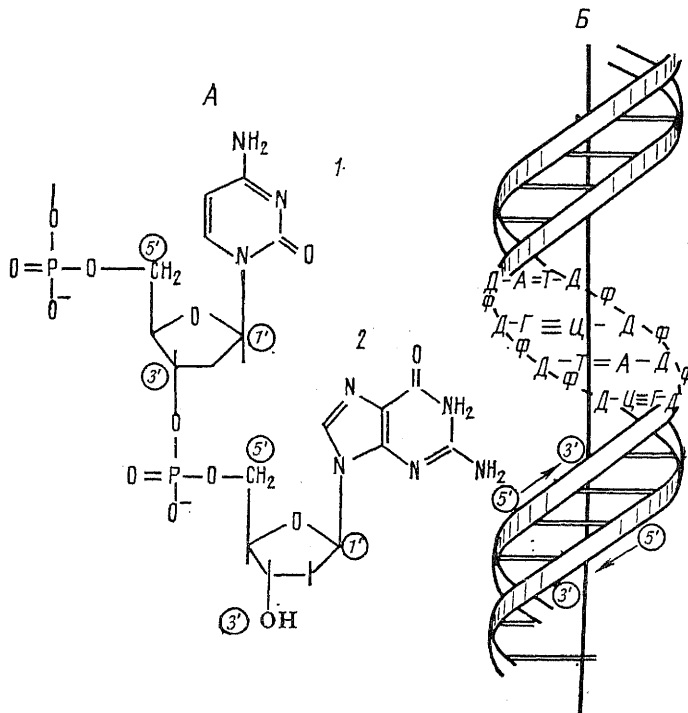


Рис. 16. Строение ДНК.

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

Молекула ДНК несет множество отрицательных зарядов, так как каждый фосфатный остаток содержит ионизированную гидроксильную группу. У эукарот отрицательные заряды нейтрализуются образованием комплекса ДНК с основными белками — гистонами. У подавляющего большинства прокарриот в клетках не обнаружено гистонов, поэтому нейтрализация зарядов осуществляется взаимодействием

⁷ Из изложенного выше следует, что термины «нуклеоид» и «хромосома» не всегда совпадают. В зависимости от условий нуклеоид прокарриотной клетки может состоять из одной или некоторого числа копий хромосомы.

ДНК с полиаминами (спермином и спермидином), а также с ионами Mg^{2+} . В последнее время у представителя группы микоплазм *Thermoplasma acidophila* и некоторых цианобактерий обнаружены гистоноподобные белки, связанные с ДНК. Содержание пар оснований А+Т и Г+Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком. У прокариот молярная доля ГЦ в ДНК колеблется в очень широких пределах: от 23—24 до 75%.

Деление молекулы ДНК (репликация) происходит по полуконсервативному механизму и в норме всегда предшествует делению клетки. С помощью электронного микроскопа установлено, что репликация ДНК начинается в точке прикрепления кольцевой хромосомы к ЦПМ, где, по современным представлениям, локализован ферментативный аппарат, ответственный за репликацию. Часто можно обнаружить, что контакт ДНК с ЦПМ осуществляется посредством мембранных структур — мезосом. Репликация, начавшаяся в точке прикрепления, идет затем в двух противоположных направлениях, образуя характерную для кольцевой хромосомы промежуточную структуру (рис. 17).

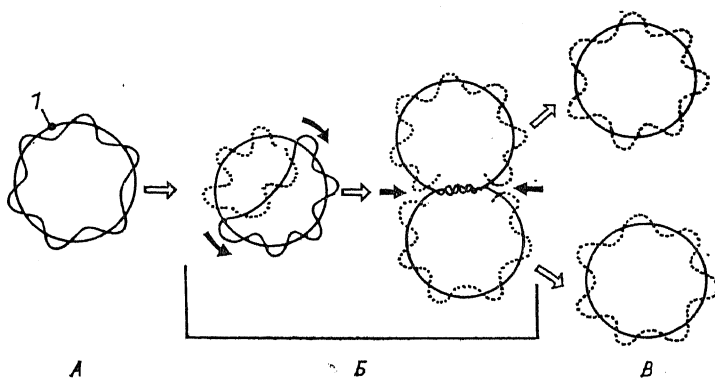


Рис. 17. Схематическое изображение репликации кольцевой бактериальной хромосомы в двух направлениях. А — родительская молекула ДНК; Б — промежуточные репликативные формы; В — дочерние молекулы ДНК после завершения процесса репликации и расхождения: 1 — точка начала репликации; черными стрелками показано направление репликации

К настоящему времени довольно много известно о ферментативном аппарате репликации ДНК. В зоне репликации (репликативной вилке) на небольшом участке происходит разрыв водородных связей, обеспечивающих поддержание двунитевой структуры ДНК. На подготовленных таким путем одонитевых участках, служащих матрицами, начинается синтез комплементарных нитей ДНК (рис. 18).

Важная роль в репликации и последующем разделении дочерних хромосом принадлежит мембранам бактериальной клетки. Процесс репликации начинается с присоединения к специфическим точкам на мембране участков ДНК, определяющих начало и конец ее репликации. В местах, где происходит присоединение хромосомы к мембране, локализованы ферменты, обеспечивающие репликацию ДНК. Возникающие дочерние хромосомы остаются прикрепленными к мембране. Репликация молекулы ДНК происходит параллельно с синтезом мем-

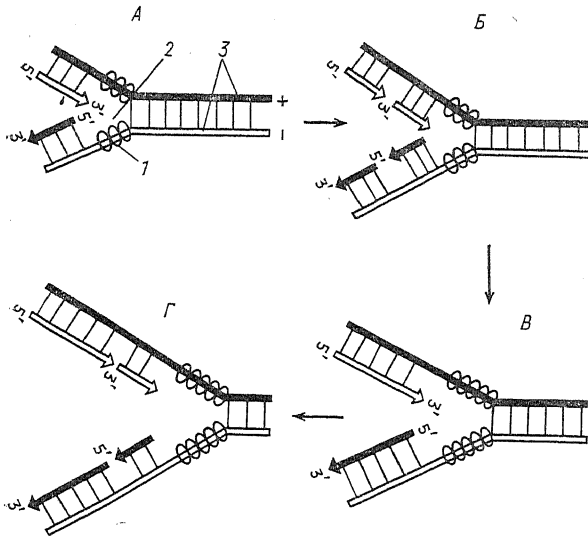


Рис. 18. Схематическое изображение репликации ДНК. А — частичное расхождение родительской двойной спирали и последующий синтез коротких фрагментов на обеих родительских цепях в направлении 5'→3'; Б — синтез следующих коротких фрагментов; В — ферментативное «сшивание» коротких фрагментов и расплетание очередного участка родительской двойной спирали; Г — синтез новых коротких фрагментов на одноцепочечных матрицах: 1 — расплетающиеся белки; 2 — точка роста; 3 — родительские цепи ДНК (по Watson, 1978)

браны в области контакта ДНК с ЦПМ. Это приводит к разделению (сегрегации) дочерних молекул ДНК и оформлению обособленных хромосом (рис. 19).

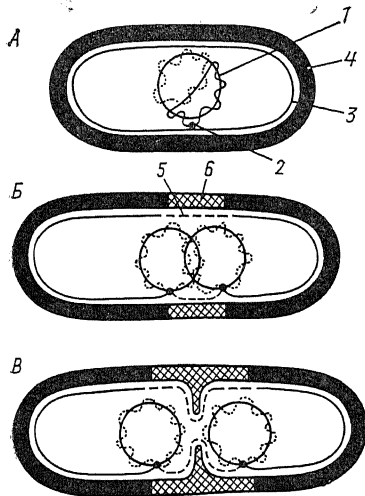


Рис. 19. Схематическое изображение механизма распределения бактериальных хромосом. А — бактериальная клетка содержит частично реплицированную хромосому, прикрепленную к мембране в точке (или точках) репликации; Б — репликация хромосомы завершена. В бактериальной клетке две дочерние хромосомы, каждая из которых прикреплена к ЦПМ. Показан синтез клеточной стенки и ЦПМ; В — продолжающийся синтез мембраны и клеточной стенки приводит к разделению дочерних хромосом. Показано начало деления клетки путем образования поперечной перегородки: 1 — ДНК; 2 — прикрепление хромосомы к ЦПМ; 3 — ЦПМ; 4 — клеточная стенка; 5 — синтезированный участок ЦПМ; 6 — новый материал клеточной стенки

Рост и способы размножения

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

Для подавляющего большинства прокариот характерно равновеликое бинарное поперечное деление, приводящее к образованию двух одинаковых дочерних клеток. При таком способе де-

ления имеет место симметрия в отношении продольной и поперечной оси. У большинства грамположительных бактерий и нитчатых цианобактерий деление происходит путем синтеза поперечной перегородки, идущего от периферии к центру (рис. 20, А). Так, у *Bacillus subtilis* в середине клетки сначала имеет место кольцевое впячивание ЦПМ, сопровождающееся формированием мембранных структур разного внешнего вида (мезосом). Они образуются в месте закладки поперечной перегородки, и предполагается их активное участие в процессах синтеза пептидогликана и других компонентов клеточной стенки. Поперечная перегородка формируется из ЦПМ и пептидогликанового слоя, ее наружные слои синтезируются позднее. Клетки большинства грамотрицательных бактерий делятся путем перетяжки. У *E. coli* на месте деления обнаруживается постепенно увеличивающееся и направленное внутрь искривление ЦПМ и клеточной стенки (рис. 20, Б).

Вариантом бинарного деления является почкование, которое можно рассматривать как неравновеликое бинарное деление. При почковании на одном из полюсов материнской клетки образуется маленький вырост (почка), увеличивающийся в процессе роста. Постепенно почка достигает размеров материнской клетки, после чего отделяется от последней (рис. 20, В). В то же время почкование отличается от равновеликого бинарного деления некоторыми важными чертами. При почковании симметрия наблюдается в отношении только продольной оси. Клеточная стенка почки в основном синтезируется заново, тогда как при равновеликом бинарном делении значительная часть материнской клеточной стенки попадает в дочерние клетки. И наконец, почкующиеся прокариоты имеют «индивидуальность» и подвергаются старению. При равновеликом бинарном делении материнская клетка, делясь, дает начало двум дочерним клеткам и сама, таким образом, исчезает. При почковании материнская клетка дает начало дочерней клетке и между ними можно в большинстве случаев обнаружить морфологические различия. Это создает возможность для изучения возрастных изменений у прокариотных организмов.

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

Для одной из групп одноклеточных цианобактерий описано раз-

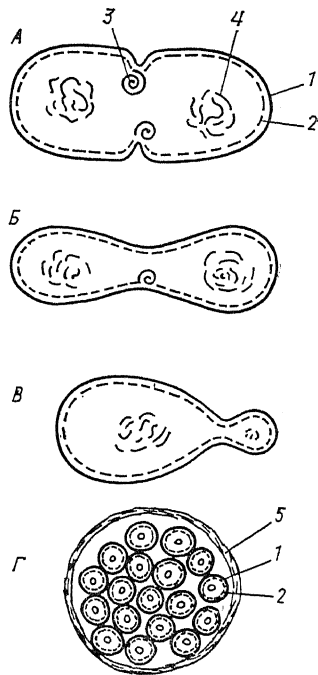


Рис. 20. Схематическое изображение способов деления прокариотной клетки.

А — деление путем образования поперечной перегородки; Б — деление путем перетяжки; В — почкование; Г — множественное деление: 1 — клеточная стенка; 2 — ЦПМ; 3 — мембранная структура; 4 — нуклеоид; 5 — дополнительный фибриллярный слой клеточной стенки

множение путем множественного деления. Оно начинается с увеличения размеров вегетативной клетки, которая затем претерпевает ряд быстрых последовательных бинарных делений, происходящих внутри дополнительного фибриллярного слоя материнской клеточной стенки. Это приводит к образованию мелких клеток, получивших название бaeоцитов⁸, число которых у разных видов колеблется от 4 до 1000. Освобождение бaeоцитов происходит путем разрыва материнской клеточной стенки (рис. 20, Г). Таким образом, в основе множественного деления лежит принцип равновеликого бинарного деления. Отличие заключается в том, что в этом случае после бинарного деления не происходит роста образовавшихся дочерних клеток, а они снова подвергаются делению.

Деление прокариотной клетки начинается, как правило, спустя некоторое время после завершения цикла репликации молекулы ДНК. Вероятно, репликация бактериальной хромосомы запускает какие-то процессы, ведущие к клеточному делению. Более детальное изучение у разных видов прокариот взаимосвязи между репликацией ДНК и делением клетки не привело к однозначным результатам. Получены данные о том, что сигналом к клеточному делению служит начало репликации ДНК, ее завершение или репликация определенного локуса бактериальной хромосомы. Таким образом, в норме существует вполне определенная временная связь между репликацией хромосомы и делением бактериальной клетки. Воздействия различными химическими веществами и физическими факторами, приводящие к подавлению репликации ДНК, останавливают и клеточное деление. Однако при некоторых условиях связь между обоими процессами может быть нарушена, и клетки способны делиться в отсутствие синтеза ДНК. Это удалось получить введением определенных мутаций в генетический аппарат бактериальной клетки.

Нарушить последовательность процессов репликации бактериальной хромосомы и клеточного деления также можно, выращивая бактерии при разной температуре. Культивирование *Bacillus subtilis* на богатой питательной среде при 37° приводит к интенсивному делению бактериальной хромосомы и росту клеток, в результате чего в культуре образуются нитевидные клетки, содержащие множество хромосомных копий с отсутствующими совсем или недосформированными (незамкнутыми) поперечными перегородками. При замедлении скорости роста наблюдается деление нитевидных клеток, приводящее к образованию бактериальных клеток нормальной длины.

Внутрицитоплазматические включения

В цитоплазме прокариот обнаруживаются различные включения. Одни из них следует рассматривать как активно функционирующие структуры, другие — как продукты клеточного метаболизма, не выделяющиеся наружу, но откладывающиеся внутри клетки. Некоторые цитоплазматические включения имеют явно приспособительное значение. И наконец, многие из них являются запасными веществами, отложение которых клеткой происходит в условиях избытка питательных веществ в окружающей среде, а потребление наблюдается, когда организм попадает в условия голодания.

К числу внутрицитоплазматических включений, выполняющих определенную функцию в фотосинтезе, относятся хлоросомы зеленых бактерий и фикобилисомы цианобактерий. В этих структурах локали-

⁸ Баеоцит — по-гречески маленькая клетка.

зованы пигменты, поглощающие кванты света и передающие их в реакционные центры, т. е. выполняющие роль антенны. Хлоросомы имеют форму продолговатых пузырьков длиной 90—150 нм и шириной 25—70 нм, окруженных однослойной электронно-плотной мембраной толщиной 2—3 нм, построенной только из белка. Они располагаются в непосредственной близости от ЦПМ, плотно к ней примыкая (см. рис. 4). В хлоросомах локализованы бактериохлорофиллы *c*, *d* или *e*. Водорастворимые пигменты белковой природы (фикобилипротеиды) цианобактерий содержатся в особых структурах — фикобилисомах, расположенных правильными рядами на внешних поверхностях фотосинтетических мембран и под электронным микроскопом имеющих вид гранул диаметром 28—55 нм (см. рис. 4).

В клетках некоторых прокариот из групп фототрофных и хемолитотрофных бактерий содержатся структуры, имеющие форму многогранника с 4—6 сторонами и диаметром 90—500 нм, получившие название карбоксисом, или полиэдральных тел (см. рис. 4). Под электронным микроскопом удалось показать, что они заполнены гранулярным содержимым и окружены однослойной мембраной белковой природы толщиной около 3 нм. Карбоксисомы состоят из частиц рибулозодифосфаткарбоксилазы, фермента, катализирующего фиксацию CO₂ на рибулозодифосфате в цикле Кальвина. До настоящего времени окончательно не выяснено, в какой форме находится фермент в карбоксисомах: в инертном или функционирующем состоянии. Имеются данные в пользу того, что в активно растущей культуре некоторых прокариот больше фермента находится в растворимой форме. При переходе в стационарную фазу увеличивается доля рибулозодифосфаткарбоксилазы в составе карбоксисом. Эти результаты указывают на возможную роль карбоксисом как структур, обеспечивающих защиту фермента от воздействия внутриклеточными протеазами и, таким образом, его консервирование.

Примером внутрицитоплазматических включений, имеющих приспособительное значение, служат газовые вакуоли, или аэросомы, обнаруженные у широкого круга водных прокариот. В настоящее время газовые вакуоли найдены у представителей, относящихся к 15 таксономическим группам. Газовые вакуоли — сложноорганизованные структуры, напоминающие пчелиные соты (см. рис. 4). Состоят из множества регулярно расположенных газовых пузырьков, имеющих форму вытянутого цилиндра с заостренными концами (диаметр 65—115 нм, длина 200—1200 нм). Каждый пузырек окружен однослойной белковой мембраной толщиной 2—3 нм, построенной из одного или двух видов белковых молекул, и заполнен газом, состав которого идентичен таковому окружающей среды. Мембрана газовых пузырьков проницаема для газов, но непроницаема для воды. Число газовых пузырьков, составляющих аэросому, у разных видов различно и зависит от внешних условий. Основная функция газовых вакуолей состоит в обеспечении плавучести водных организмов, которые с их помощью могут регулировать глубину, выбирая более благоприятные условия. При увеличении объема и числа газовых пузырьков плотность цитоплазмы уменьшается и клетки перемещаются в верхние слои воды. Сжатие газовых пузырьков, наоборот, приводит к погружению клеток. За несколькими исключениями, газовые вакуоли присущи безжгутиковым видам. Их, вероятно, можно рассматривать как альтернативу жгутикам для движения в вертикальной плоскости.

Запасные вещества прокариот представлены полисахаридами, липидами, полипептидами, полифосфатами, отложениями серы (см. рис. 4,

Запасные вещества прокариот

Запасное вещество	Структурные характеристики	Химический состав	Функции	Распространение
Гранулы гликогена (α -гранулы)	сферической формы, диаметр 20—100 нм	высокомолекулярные полимеры глюкозы	источник углерода и энергии	широко распространены тип запасных веществ
Гранулы поли- β -оксимасляной кислоты	диаметр 100—1000 нм; окружены однослойной белковой мембраной 2—3 нм толщиной	98% полимера поли- β -оксимасляной кислоты; 2% белка	источник углерода и энергии	широко распространены только у прокариот
Цианофациновые гранулы	размер и форма различны; могут достигать в диаметре до 500 нм	полипептид, содержащий аргинин и аспарагиновую кислоту (1:1); мол. масса — $25-100 \times 10^3 D$	источник азота	обнаружены у многих видов цианобактерий
Гранулы полифосфата	диаметр около 500 нм, зависит от объекта и условий выращивания	линейные полимеры ортофосфата	источник фосфора	распространенный тип запасных гранул
Гранулы серы	диаметр 100—800 нм; окружены однослойной белковой мембраной толщиной 2—3 нм	включения жидкой серы	донор электронов или источник энергии	пурпурные серобактерии, бесцветные бактерии, окисляющие H_2S
Углеводородные гранулы	диаметр 200—300 нм; окружены белковой оболочкой 2—4 нм толщиной	углеводороды того же типа, что и в среде	источник углерода и энергии	представители родов <i>Arthrobacter</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> и другие прокариоты, использующие углеводороды

табл. 7). Из полисахаридов в клетках откладываются гликоген, крахмал и крахмалоподобное вещество — гранулеза. Последняя — специфический запасной полисахарид анаэробных споровых бактерий группы клостридиев. Названные полисахариды построены из остатков глюкозы. В неблагоприятных условиях они используются в качестве источника углерода и энергии.

Липиды накапливаются в виде гранул, резко преломляющих свет и поэтому хорошо различимых в световой микроскоп. Запасным веществом такого рода является полимер β -оксимасляной кислоты, накапливающийся в клетках многих прокариот. У некоторых бактерий, окисляющих углеводороды, поли- β -оксимасляная кислота составляет до 70% сухого вещества клеток. Отложение липидов в клетке происходит в условиях, когда среда богата источником углерода и бедна азотом. Липиды служат для клетки хорошим источником углерода и энергии.

Другой широко распространенный тип запасных веществ многих прокариот — полифосфаты, содержащиеся в гранулах, называемых волютиновыми, или метахроматиновыми зернами. Используются клетками как источник фосфора. Могут ли они служить источником энергии у прокариот, определенно не доказано.

Специфическим запасным веществом цианобактерий являются цианофициновые гранулы. Химический анализ показал, что они состоят из полипептида, содержащего аргинин и аспарагиновую кислоту в эквимольных количествах. Остов молекулы построен из остатков аспарагиновой кислоты, соединенных пептидными связями, а к ее β -карбоксильным группам присоединены остатки аргинина. Для синтеза цианофицина необходимы затравка, молекулы АТФ, ионы K^+ и Mg^{2+} . Процесс не закодирован в информационной РНК и не связан с рибосомами. Появление цианофициновых гранул при культивировании цианобактерий в среде с азотом и их исчезновение при истощении среды по азоту указывают на то, что они в клетке служат резервом азота, мобилизуемым при его недостатке в среде.

Для двух групп бактерий, метаболизм которых связан с соединениями серы, характерно отложение в клетках молекулярной серы. Сера накапливается, когда в среде содержится сероводород, и окисляется до сульфата, когда весь сероводород среды оказывается исчерпанным. Для аэробных тионовых бактерий, окисляющих H_2S , сера служит источником энергии, а для анаэробных фотосинтезирующих серобактерий она является донором электронов.

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

Морфологическая дифференцировка и уровни клеточной организации прокариот

Для эволюции прокариотных организмов характерен ярко выраженный физиолого-биохимический уклон, т. е. основное развитие прокариот шло по линии формирования и опробования различных функций, результатом чего и явилось сегодняшнее многообразие типов жизни в микромире. Паразитарное физиологическое разнообразие

прокариот сформировано на базе весьма ограниченного числа морфологических форм. Действительно, морфологическая эволюция прокариот прошла незначительный путь, так что мы можем говорить лишь о зачатках морфологической дифференцировки на базе прокариотной клеточной организации.

Вегетативные клетки многих прокариот в определенных условиях дают начало структурам, морфологически отличающимся от исходных. Ими могут быть вегетативные клетки, но измененной формы, клеточные структуры с четко выраженной функциональной специализацией, различные многоклеточные образования. В подавляющем большинстве случаев все известные проявления морфологической дифференцировки прокариот направлены на повышение их выживаемости. Это выражается как в формировании специальных клеток, обладающих повышенной устойчивостью к перенесению неблагоприятных условий (эндоспоры, цисты), так и в формировании структур, обеспечивающих эффективное размножение прокариотных организмов (гормогонии и бaeоциты цианобактерий).

В основе морфологической дифференцировки лежат определенные биохимические процессы, которые в свою очередь являются выражением соответствующей генетической информации⁹. Последняя запрограммирована в генетическом аппарате клетки и реализуется в процессе ее развития или же в зависимости от действия различных внешних факторов.

Морфологически дифференцированные клетки

Образование различных морфологически дифференцированных клеток у разных представителей мира прокариот суммировано в табл. 8. Большинство таких структур относится к категории покоящихся форм, назначение которых обеспечить переживание вида в течение длительного времени в неблагоприятных условиях. Это эндоспоры ряда грамположительных бактерий, цисты азотобактера и миксобактерий, акти-

Таблица 8

Морфологически дифференцированные клетки прокариот

Специализированные клетки	Представители прокариот, у которых они обнаружены
Эндоспоры	<i>Bacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina</i> , некоторые актиномицеты
Экзоспоры	некоторые виды <i>Methylosinus, Rhodomicrobium</i> , многие актиномицеты
Цисты	миксобактерии, скользящие бактерии, <i>Azotobacter, Bdellovibrio</i>
Бактероиды	клубеньковые бактерии
Гетероцисты, акинеты, бaeоциты, гормогонии	цианобактерии

⁹ Ф. Жакоб и Ж. Моно (F. Jacob, J. Monod) определили дифференцировку следующим образом: «Одну клетку следует считать дифференцированной по сравнению с другой, если при одинаковых геномах набор белков, синтезированных в этих клетках, различен».

неты цианобактерий, экзоспоры отдельных представителей метилотрофных и фототрофных бактерий, экзо- и эндоспоры актиномицетов. После попадания в подходящие условия покоящиеся формы прорастают, давая начало вегетативным клеткам. Другие морфологически дифференцированные клетки служат для размножения. К ним относятся, например, гормогонии и бaeоциты цианобактерий. Наконец, трети (гетероцисты цианобактерий, бактериоды клубеньковых бактерий) связаны с осуществлением уникального процесса, свойственного только прокариотным организмам,— фиксацией молекулярного азота атмосферы.

Мы рассмотрим случаи морфологической дифференцировки у прокариот на примерах формирования ими разных типов покоящихся клеток. Сведения о других типах клеточной дифференцировки можно найти в разделах, посвященных краткой характеристике разных групп прокариот.

Покоящиеся формы

Цисты встречаются у разных групп бактерий: азотобактера, спирохет, миксобактерий, риккетсий. У большинства миксобактерий образование цист, называемых также микоспорами,— закономерная стадия их жизненного цикла (рис. 21, А). После окончания стадии активного

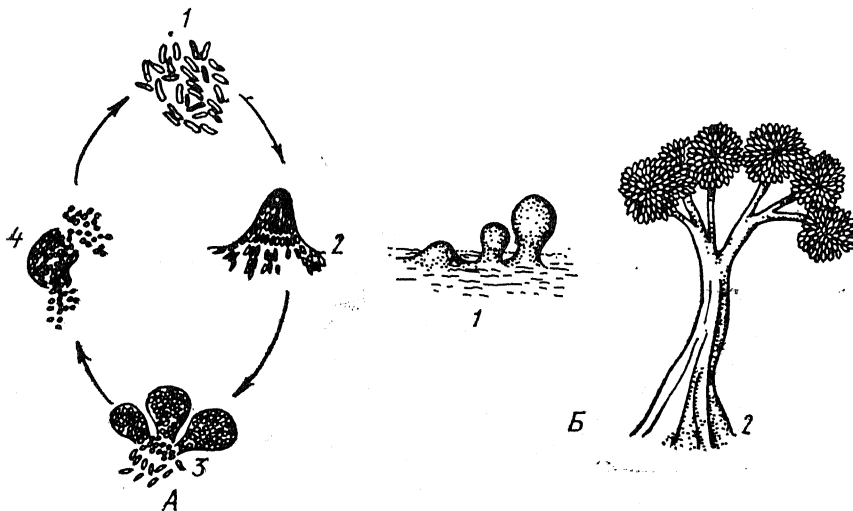


Рис. 21. Схема цикла развития и плодовые тела некоторых миксобактерий. А. Схема цикла развития *Мухососсис*: 1 — активно размножающиеся вегетативные клетки; 2 — скопление клеток, предшествующее образованию плодового тела; 3 — плодовое тело; 4 — микоспоры. Б. Плодовые тела: 1 — *Мухососсис*; 2 — *Chondromyces* (по Schlegel, 1972)

размножения клетки миксобактерий собираются вместе и образуют так называемые плодовые тела, представляющие собой массу слизи, в которую погружены клетки, или весьма дифференцированные структуры, поднимающиеся над поверхностью субстрата на простых или разветвленных стебельках (рис. 21, Б). Внутри плодовых тел клетки переходят в покоящееся состояние. У одних видов цисты могут морфологически не отличаться от вегетативных клеток, у других их образование сопровождается заметными морфологическими и структурными изменениями: происходит утолщение стенки вегетативной клетки, в ре-

зультате чего формируются оптически плотные, более сильно преломляющие свет, окруженные капсулой укороченные палочки или сферические формы (рис. 22, А). Образование микроспор сопровождается синтезом белка, так что сформированная микроспора содержит около

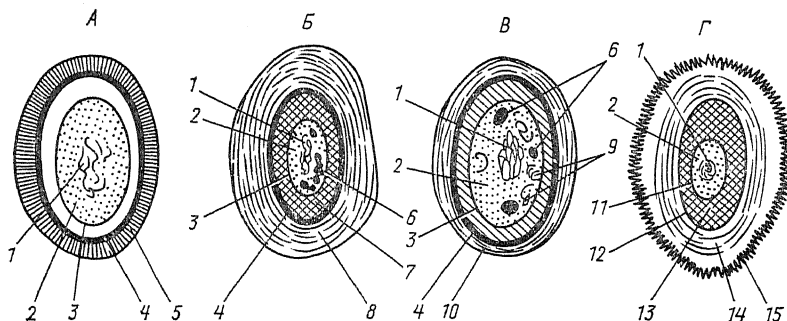


Рис. 22. Схематическое изображение строения покоящихся форм прокариот.

А — микроспоры миксобактерий; Б — цисты азотобактера; В — акинеты цианобактерий; Г — эндоспоры: 1 — нуклеоид; 2 — цитоплазма; 3 — ЦПМ; 4 — клеточная стенка; 5 — капсула; 6 — гранулы запасных веществ; 7 — внутренние покровы (интина); 8 — внешние покровы (экзина); 9 — тилакоиды; 10 — чехол; 11 — внутренняя мембрана споры; 12 — наружная мембрана споры; 13 — кортекс; 14 — покровы споры, состоящие из нескольких слоев; 15 — экзоспориум (по Дуде, Пронину, 1981)

$\frac{1}{3}$ заново синтезированного белка. В то же время ДНК при этом не синтезируется, а переходит из исходных вегетативных клеток. Генетический аппарат микроспор может быть представлен тремя или четырьмя копиями хромосомы вегетативной клетки. Цисты миксобактерий более устойчивы к нагреванию, высушиванию, различным физическим воздействиям, чем вегетативные клетки.

У азотобактера образование цист сопровождается изменением морфологии клетки, потерей жгутиков и накоплением в цитоплазме в больших количествах гранул поли- β -оксимасляной кислоты, одновременно происходит синтез дополнительных клеточных покровов: внешних (экзина) и внутренних (интина) по отношению к клеточной стенке (рис. 22, Б), различающихся структурно и химическим составом.

Покоящимися клетками некоторых цианобактерий, обладающими повышенной устойчивостью к ряду неблагоприятных факторов (высушиванию, пониженным температурам), являются акинеты. Они, как правило, заметно крупнее вегетативных клеток, имеют продолговатую или сферическую форму, гранулированное содержимое и толстую оболочку. Образование акинет происходит в период замедления роста и начинается с увеличения клеточных размеров, при этом в цитоплазме происходит накопление гранул запасных веществ (гликогеновых, полифосфатных и особенно крупных цианофициновых), а также карбоксисом. Одновременно происходит утолщение пептидогликанового слоя клеточной стенки и уплотнение слизистого чехла за счет отложения в нем электронно-плотного фибриллярного материала полисахаридной природы (рис. 22, В). В целом оболочки акинет содержат больше липидов и полисахаридов, а цитоплазма — меньше воды, чем вегетативные клетки. В цитоплазме в процессе формирования акинет отмечается увеличение содержания ДНК, рибосом, но уменьшение количества хлорофилла и фикобилиновых пигментов. Тилакоиды образуют сложную сетчатую структуру. Скорости фотосинтеза в акинетах ниже, а

дыхания выше, чем в вегетативных клетках. Прорастание акинет происходит иногда вскоре после их образования или только после перенесения в свежую питательную среду и может осуществляться двумя путями: иногда в акинете на одном из полюсов формируется пора, через которую выходит проросток, или же прорастание происходит в результате разрыва оболочки акинеты.

Образование эндоспор — процесс, имеющий место только в мире прокариот. Бактериальные эндоспоры — это особый тип покоящихся клеток грамположительных бактерий, формирующихся эндогенно, т. е. внутри цитоплазмы «материнской» клетки (спорангия), обладающих специфическими структурами (многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом) и устойчивостью к высоким температурам и дозам радиации, летальным в норме для вегетативных клеток (рис. 22, Г). Эндоспорам свойственно также и особое физическое состояние протопласта.

К спорообразующим бактериям относится большое число прокариот приблизительно из 15 родов, характеризующихся морфологическим и физиологическим разнообразием (табл. 9). Среди них имеются палочковидные, сферические, мицелиальные формы, спираллы и нитчатые организмы. Все они имеют строение клеточной стенки, харак-

Таблица 9

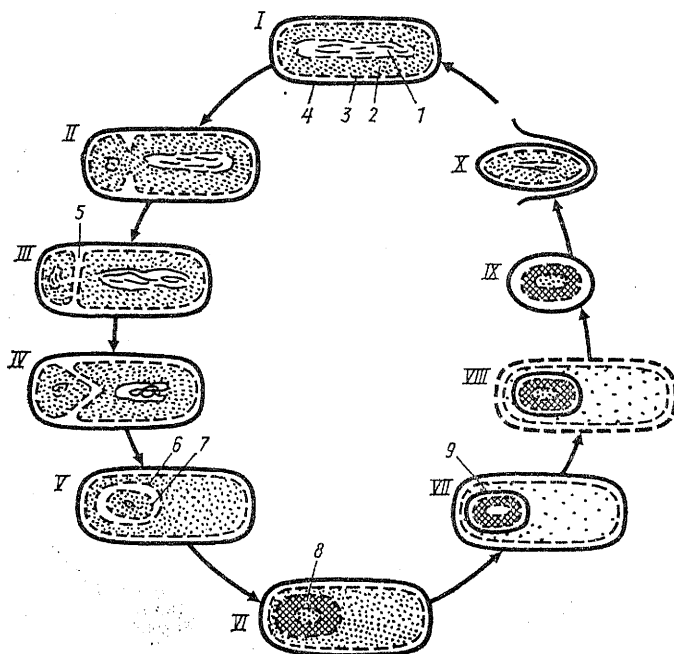
Прокариоты, образующие эндоспоры
(по Дуде, 1982)

Род бактерий	Форма вегетативных клеток	Окраска по Граму	Отношение к кислороду	Тип питания
<i>Bacillus</i>	палочковидная	±	аэробы	хемоорганогетеротрофы
<i>Clostridium</i>	та же	±	анаэробы	тот же
<i>Desulfotomaculum</i>	»	—	то же	» »
<i>Sporolactobacillus</i>	»	+	аэробы	» »
<i>Sulfobacillus</i>	»	—	то же	факультативные хемолитоавтотрофы
<i>Sporosarcina</i>	сферическая	+	» »	хемоорганогетеротрофы
<i>Thermoactinomyces</i>	ветвящиеся нити	+	» »	тот же
<i>Actinobifida</i>	та же	+	» »	» »
<i>Sporospirillum</i>	спираллы	—	анаэробы	» »
<i>Oscillospira</i>	дисквидные клетки в трихомах	—	то же	обитают в рубце и кишечнике животных
<i>Fusosporus</i>	спираллы	—	» »	тот же

терное для таковой грамположительных бактерий. Ни в одном случае не выявлена наружная липопроteidная мембрана, несмотря на то что многие роды и виды спорообразующих бактерий не окрашиваются по Граму. По типу питания среди спорообразующих бактерий обнаружены хемоорганогетеротрофы, факультативные хемолитоавтотрофы и паразитические формы. Отношение к кислороду также разнообразно: часть спорообразующих форм представлена аэробами и факультативными анаэробами, другая часть включает облигатных анаэробов — от аэротолерантных форм до высокочувствительных к O₂.

Лучше всего процесс спорообразования изучен у представителей родов *Bacillus* и *Clostridium*, хотя имеющиеся данные позволяют сделать вывод о принципиальной однотипности этого процесса у всех видов, образующих эндоспоры. В каждой бактериальной клетке, как правило, формируется одна эндоспора. Первым шагом к спорообразованию является изменение морфологии ядерного вещества вегетативной

клетки, образующего тяж вдоль длинной оси спорулирующей клетки (рис. 23). Приблизительно $\frac{1}{3}$ тяжа затем отделяется и переходит в формирующуюся спору. У некоторых видов ядерный тяж образуется



мембрана споры; 8 — кортекс; 9 — покровы споры (по Дуде, 1974)

Рис. 23. Схематическое изображение формирования эндоспоры споробактериями.

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

только на одном полюсе клетки, в его формировании участвует не весь генетический материал вегетативной клетки, и впоследствии ядерный тяж целиком переходит в формирующуюся спору. Биологический смысл формирования ядерного тяжа до сих пор остается невыясненным.

Формирование споры начинается с того, что у одного из полюсов клетки происходит уплотнение цитоплазмы, которая вместе с генетическим материалом обособляется от остального клеточного содержимого с помощью перегородки. Последняя формируется втягиванием внутрь ЦПМ клетки. Мембрана нарастает от периферии к центру, где срывается, что приводит к образованию споровой перегородки. Эта стадия формирования споры напоминает клеточное деление путем образования поперечной перегородки (см. рис. 20, А). Следующий этап формирования споры — «обрастание» отсеченного участка клеточной цитоплазмы с ядерным материалом мембраной вегетативной клетки, конечным результатом которого является образование проспору — структуры, расположенной внутри материнской клетки и полностью отделенной от нее двумя элементарными мембранами: наружной и внутренней по отношению к проспоре.

Описанные выше этапы формирования споры (вплоть до образования проспору) обратимы. Оказалось, что если к спорулирующей культуре добавить антибиотик хлорамфеникол (ингибитор белкового синтеза и, следовательно, ингибитор синтеза мембранных белков), то можно остановить «обрастание» клеточной мембраной отсеченного септой участка цитоплазмы, и процесс спорообразования превратится в процесс клеточного деления. (Между двумя мембранами септы откла-

дывается материал клеточной стенки.) После образования споры дальнейшие этапы спорообразования уже необратимы. Между наружным и внутренним мембранными слоями споры начинается формирование кортикального слоя (кортекса). Затем поверх наружной мембраны споры синтезируются споровые покровы, состоящие из нескольких слоев, число, толщина и строение которых различны у разных видов спорообразующих бактерий. В формировании слоев споровых покровов принимает участие как наружная мембрана споры, так и протопласт материнской клетки.

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

Спорообразование сопровождается активным синтезом белка. Белки эндоспор в отличие от белков вегетативных клеток богаты цистеином и гидрофобными аминокислотами, с чем связывают устойчивость спор к действию неблагоприятных факторов. Содержание ДНК в споре несколько ниже, чем в исходной вегетативной клетке, поскольку в спору переходит лишь часть генетического материала материнской клетки. Генетический материал поступает в спору в виде полностью реплицированных молекул ДНК. Споры некоторых видов содержат по 2 или 3 копии хромосомы. Содержание РНК в спорах ниже, чем в вегетативных клетках, и РНК в значительной степени при спорообразовании синтезируется заново. Одним из характерных процессов, сопровождающих образование эндоспор, является накопление в них дипиколиновой кислоты и ионов кальция в эквимолярных количествах. Эти соединения образуют комплекс, локализованный в сердцевине споры. Помимо Ca^{2+} в эндоспорах обнаружено повышенное содержание других катионов (Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^{+}), с которыми связывают пребывание спор в состоянии покоя и их термоустойчивость.

Существенные отличия эндоспор от вегетативных клеток выявляются при изучении химического состава отдельных споровых структур. Экзоспориум состоит из липидов и белков и, вероятно, выполняет функцию дополнительного барьера, защищающего спору от внешних воздействий, а также регулирующего проникновение в нее различных веществ. Однако никаких данных, подтверждающих эти предположения, пока нет. Механическое удаление экзоспориума не приводит к какому-либо повреждению спор. Они обнаруживают такую же способность к прорастанию, как и споры с неудаленным экзоспориумом.

Споровые покровы в основном состоят из белков и в небольшом количестве — из липидов и гликолипидов. Белки покровов обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям и обеспечивают спорам защиту от действия литических ферментов, других повреждающих факторов, а также предохраняют спору от преждевременного прорастания. Оказалось, что споры мутантов, лишенные покровов, прорастают сразу же после выхода из материнской клетки, даже если условия для последующего роста неблагоприятны. Кортекс построен в основном из молекул особого типа пептидогликана. При прорастании споры из части кортекса, прилегающей к внутренней споровой мембране, формируется клеточная стенка вегетативной клетки.

В отличие от эндоспор, образующихся внутри материнской клетки

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

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

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

Для всех покоящихся форм характерна повышенная по сравнению с вегетативными клетками устойчивость к действию разнообразных повреждающих факторов. В наибольшей степени эта устойчивость проявляется у эндоспор. Факторами, вызывающими повреждение вегетативных клеток, являются высокие и низкие температуры, обезвоживание, литические ферменты, высокая кислотность среды, радиация, механические воздействия и др. Механизмы устойчивости в настоящее время мало изучены. Для эндоспор основными факторами, обеспечивающими их устойчивость к действию неблагоприятных условий среды, предположительно является нахождение споровой цитоплазмы в обезвоженном состоянии, термостойкость споровых ферментов, а также наличие дипиколиновой кислоты и большого количества двухвалентных катионов. Большой вклад в устойчивость спор вносят поверхностные структуры (мембраны, кортекс, покровы), механически защищающие содержимое споры от проникновения извне агрессивных веществ. Механизм устойчивости к неблагоприятным факторам, основанный на дегидратации клеточных структур, имеет место и у других

покоящихся форм прокариот, так как все они характеризуются пониженным содержанием воды сравнительно с вегетативными клетками.

Условия, способствующие образованию покоящихся клеток, до сих пор изучены недостаточно. К категории благоприятствующих факторов относится наличие или отсутствие определенных питательных веществ среды, температура, кислотность среды, условия аэрирования. Формированию цист у миксобактерий, например, способствует наличие в среде глицерина, аминокислот. Количество цист азотобактера возрастает при добавлении к среде β -оксимасляной кислоты и повышении концентрации двухвалентных катионов. В качестве факторов, индуцирующих формирование акинет цианобактерий, отмечена низкая температура, высушивание, отсутствие в среде связанного азота или, наоборот, увеличенное содержание глутаминовой кислоты.

Помимо факторов внешней среды, в неодинаковой степени влияющих на формирование разных типов покоящихся клеток, обнаружены специфические вещества, основная функция которых заключается в регулировании роста и развития прокариотных организмов, в частности в индуцировании процессов формирования покоящихся клеток. Такие вещества могут выделяться в культуральную среду или накапливаться внутри клетки. Они были выделены, и показана индукция ими спорообразования.

Сформированные покоящиеся клетки в течение разного времени могут находиться в жизнеспособном состоянии (табл. 10) и прора-

Таблица 10
Устойчивость покоящихся форм прокариот к экстремальным воздействиям
(по Дуде, Пронину, 1981)

Тип покоящихся клеток	Повреждающий фактор	
	высокая температура	высушивание
Микроспоры миксобактерий	гибель 90% после выдерживания при 50° в течение 20 мин	гибель 50% после хранения в течение 6 сут
Цисты азотобактера	100%-ная гибель после выдерживания при 60° в течение 15 мин	100%-ная жизнеспособность при хранении в течение 12 сут
Акинеты цианобактерий	гибель 95% после выдерживания при 40° в течение 10 мин	95%-ная жизнеспособность после хранения в течение 15 мес при 4°
Эндоспоры некоторых бактерий	гибель 90% после выдерживания при 100° в течение 11 мин	жизнеспособность сохранялась в течение приблизительно 1000 лет
Эндоспоры актиномицетов	гибель 99% после выдерживания при 75° в течение 70 мин	жизнеспособность сохранялась в течение 14 лет

стают в подходящих условиях с образованием активно метаболизирующих вегетативных клеток.

Для бактериальных эндоспор процесс прорастания состоит из нескольких этапов: активации, инициации и выростания. Как правило, эндоспоры даже в благоприятных условиях могут не прорасти. Для этого их необходимо подвергнуть активации. Наиболее общим активирующим фактором является термообработка споровой суспензии.

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

В целом прорастание — это процесс, сопровождающийся сложными физиологическими и биохимическими изменениями. Начинается он с интенсивного поглощения спорой воды и набухания. На первом этапе прорастания происходит активация ферментов (и в первую очередь, литических), резко возрастает дыхание, т. е. мобилизуется энергия, происходят изменения в химическом составе (из спор удаляется дипиколиновая кислота). За время прорастания споры теряют до $\frac{1}{3}$ первоначальной массы. Последующие этапы состоят в разрушении кортекса, разрыве споровых покровов, выходе сформировавшейся к этому времени структуры, называемой ростовой трубочкой, достраивании ею клеточной стенки и последующем делении сформированной вегетативной клетки (рис. 23).

Уровни клеточной организации

У прокариотных организмов можно проследить разные уровни клеточной организации. Подавляющее большинство прокариот — одноклеточные организмы. Для свободноживущих форм это может быть определено как способность осуществлять все функции, присущие организму, независимо от соседних клеток. В то же время для многих бактерий отмечается тенденция существовать не в виде одиночных клеток, а формировать клеточные агрегаты (см. рис. 3, 5). Для неподвижных клеток последние есть результат ряда последовательных делений, приводящих к появлению колоний. Однако образование агрегатов клеток наблюдается и у подвижных форм. Часто клетки в агрегатах удерживаются с помощью выделяемой ими слизи. Прочность и долговечность существования таких агрегатов зависят от свойств слизи и условий внешней среды. На этом этапе можно говорить лишь о случайном клеточном объединении, которое не противоречит данному выше определению одноклеточности.

Известны, однако, случаи, когда такое временное агрегирование одноклеточных организмов связано с осуществлением определенной функции. Примером может служить образование плодовых тел миксобактериями, которое делает возможным созревание цист, на что не способны в обычных условиях единичные клетки. В аэробных условиях описано образование строго анаэробными бактериями из рода *Clostridium* колоний, по внешнему виду напоминающих плодовые тела миксобактерий, в которых спорулирующие клетки и эндоспоры расположены внутри и защищены от кислорода плотным слоем слизи.

Выше было обсуждено, что у одноклеточных прокариот нередко случаи образования морфологически и функционально дифференцированных клеток (см. табл. 8).

Тенденция прокариот к механическому объединению клеток в агрегаты и дифференцировка отдельных клеток — необходимые предпосылки для возникновения простых вариантов истинной многоклеточности. Согласно существующим представлениям многоклеточность начинается с появления структурно-функциональных различий у членов исходной однородной группы клеток. Для формирования самого простого типа многоклеточного организма необходимы три условия: 1) агрегированность клеток; 2) разделение функций между ними в таком агрегате; 3) наличие между агрегированными клетками устой-

чивых и специфических контактов. Следствием же такого типа клеточной организации должно быть повышение жизнеспособности многоклеточного комплекса по сравнению с одиночной клеткой того же вида в тех же условиях.

Многоклеточные организмы встречаются в разных группах прокариот, но наиболее высокоорганизованная многоклеточность присуща двум группам: актиноциетам и цианобактериям. В пределах последней особенно хорошо прослеживаются все этапы формирования многоклеточности, вплоть до наиболее сложного ее выражения в мире прокариот.

В простейшем случае, как, например, у представителей родов *Synechococcus* и *Chamaesiphon*, клетки после деления или почкования имеют тенденцию расходиться. Для одноклеточных цианобактерий, принадлежащих к родам *Gloeobacter*, *Gloeothese* или *Gloeocapsa*, наоборот, клетки после деления остаются объединенными с помощью окружающих их чехлов (рис. 24, А). Внутри слизистого материала чехла могут формироваться довольно крупные клеточные агрегаты. В этом случае между клетками нет непосредственного контакта. Вопрос о возможности и формах осуществления межклеточных контактов через окружающие клетки чехлы остается открытым. Показано, что удаление чехла, приводящее к разобщению клеток, не отражается на их жизнеспособности.

Среди нитчатых цианобактерий прослеживаются в разной степени выраженные непосредственные контакты между соседними клетками, образующими трихом. У представителей рода *Pseudoanabaena* клетки в нити разделены глубокими перетяжками, а у *Oscillatoria* деление, происходящее путем формирования поперечной перегородки, приводит к сохранению плотных контактов между клетками на больших участках клеточной поверхности (рис. 24, А). Часто клетки в три-

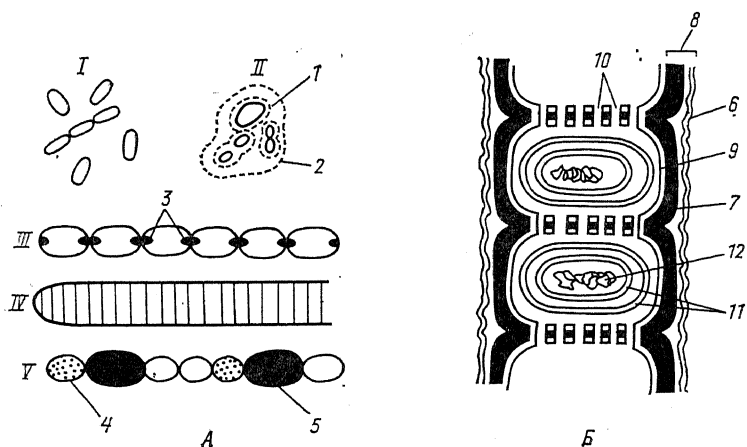


Рис. 24. Схематическое изображение межклеточных контактов у разных представителей цианобактерий (А) и микроплазмодесм у нитчатых форм (Б).

I — *Synechococcus*; II — *Gloeothese*; III — *Pseudoanabaena*; IV — *Oscillatoria*; V — *Anabaena*: 1 — чехол, окружающий каждую клетку; 2 — сохранившийся чехол материнской клетки; 3 — полярные газовые вакуоли; 4 — гетероциста; 5 — акинета; 6 — наружная мембрана; 7 — пептидогликановый слой; 8 — клеточная стенка; 9 — ЦПМ; 10 — микроплазмодесмы; 11 — тилакоиды; 12 — нуклеоид

хоме окружены общим чехлом, который может рассматриваться в качестве дополнительного фактора, удерживающего их в определенном порядке. У нитчатых цианобактерий, принадлежащих к описанному типу, с помощью электронной микроскопии между соседними вегетативными клетками обнаружены структуры, названные микроплазмами, обеспечивающие непрерывность мембранных структур и цитоплазматического содержимого в клетках трихома.

Микроплазмодесмы представляют собой каналы, окруженные мембраной, наружный диаметр которых меньше 20 нм, прорезающие поперечную перегородку между соседними клетками (рис. 24, Б). Количество их достигает 30—40. С помощью микроплазмодесм осуществляются прямые контакты между ЦПМ соседних клеток. Таким образом, имеющиеся данные указывают на существование путей, обеспечивающих возможность обмена информацией между клетками в трихоме. Обмениваемыми могут быть вещества, растворенные в цитоплазме. Это было показано при введении внутрь клетки красителей, постепенно диффундировавших в соседние клетки нити. Была установлена также передача по мембранам вдоль трихома энергии в форме электрической составляющей трансмембранного потенциала. Транспорт энергии происходил от места ее образования в освещенной части трихома к неосвещенному его концу.

Необходимость в таком обмене очевидна, если клетки, формирующие нить, находятся в разных условиях или физиологических состояниях, как это имеет место при экспериментально показанной передаче энергии. В то же время у цианобактерий родов *Pseudoanabaena* или *Oscillatoria* не обнаружено какой-либо четкой морфологической или функциональной дифференцировки. Только для концевых клеток нити можно иногда отметить несколько отличную форму, что объясняется, вероятно, нахождением их в иных условиях, чем остальных клеток в трихоме.

Дальнейшее развитие в группе цианобактерий шло по двум взаимосвязанным направлениям: по пути формирования функционально-дифференцированных клеток и развития более тесных контактов между соседними, а через них и всеми клетками трихома. Основные типы дифференцированных клеток цианобактерий — акинеты, служащие для переживания в неблагоприятных условиях, и гетероцисты, обеспечивающие фиксацию молекулярного азота в аэробных условиях (рис. 24, А). Показано, что между гетероцистой и вегетативными клетками происходит активный обмен метаболитами: из вегетативных клеток в гетероцисту поступают дисахара, продукты фотосинтетической фиксации CO_2 , а из гетероцисты — азотсодержащие вещества. Каналы, по которым осуществляется обмен метаболитами, сначала были постулированы на основании физиологических данных, а потом обнаружены при электронном микроскопировании. Это микроплазмодесмы, имеющие такое же строение, как и у безгетероцистных форм. Между соседними вегетативными клетками насчитывается от 100 до 250 таких структур, а между гетероцистой и вегетативной клеткой — около 50. У видов, имеющих функционально-дифференцированные клетки, осуществляются более тесные межклеточные контакты, создающие условия для более активного обмена метаболитами внутри трихома.

Таким образом, нитчатые цианобактерии можно считать истинно многоклеточными организмами, у которых трихом предстает как целостный организм, некая физиологическая единица, а не скопление отдельных, чисто механически объединенных клеток.

ГЛАВА 5

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТАБОЛИЗМА ПРОКАРИОТ

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

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

Метаболические пути конструктивной и энергетической направленности состоят из множества последовательных ферментативных реакций и могут быть разделены на три этапа. На начальном этапе воздействию подвергаются молекулы, служащие 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, или метаболитов, а сама цепь превращений объединяется под названием промежуточного метаболизма. 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 со-

бой. Однако у некоторых прокариотных организмов можно выделить последовательности реакций, служащих только для получения энергии или только для биосинтеза. Связь между конструктивными и энергетическими процессами прокариот осуществляется по нескольким каналам. Основной из них — энергетический. Определенные реакции поставляют энергию, необходимую для биосинтезов и других клеточных энергозависимых функций. Биосинтетические реакции кроме энергии нуждаются часто в поступлении извне восстановителя в виде водорода (электронов), источником которого служат также реакции энергетического метаболизма. И наконец, тесная связь между энергетическими и конструктивными процессами проявляется в том, что определенные промежуточные этапы или метаболиты обоих путей могут быть одинаковыми (хотя направленность потоков реакций, относящихся к каждому из путей, различна). Это создает возможности для использования общих промежуточных продуктов в каждом из метаболических путей. Промежуточные соединения такой природы предложено называть амфиболитами, а промежуточные реакции, одинаковые для обоих потоков, — амфиболическими. По предложению А. Ключивера, ключевые метаболиты, образующиеся на пересечении метаболических путей и выполняющие многообразные функции, называют центроболитами.

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

Химический состав прокариотной клетки

Любая клетка в норме содержит около 2500 различных белков, каждый из которых представлен приблизительно 400 молекулами, а также порядка 1000 видов других органических соединений. Химический состав клеток в принципе одинаков у всех организмов. Клетки прокариот содержат до 90% воды, на долю сухих веществ приходится остальные 10%, основную массу которых (более 95%) составляют белки, полисахариды, липиды и нуклеиновые кислоты (табл. 11). Несколько процентов сухого вещества клеток приходится на низкомолекулярные органические вещества и соли.

Макромолекулы, составляющие основную массу сухих веществ клетки, — полимеры, построенные из мономерных единиц. Исключением служат липиды, не являющиеся полимерами, так как составляю-

Таблица 11
Содержание основных
компонентов прокариотной
клетки
(по Stouthamer, 1973)

Вещество	Количество, % от сухих ве- ществ клетки
Белки	52
Полисахариды	17
Липиды	9
РНК	16
ДНК	3

щие их молекулы не соединены между собой ковалентными связями. Углеводные полимеры построены на основе повторяющихся единиц одного, двух или более типов, например, запасной полисахарид гликоген, построенный из остатков глюкозы, или пептидогликан клеточной стенки, образованный чередованием N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты. Полимерные молекулы белков и нуклеиновых кислот синтезируются на матрице, которая и определяет последовательность составляющих их мономеров. Возможности для синтеза разнообразных по функциям и структуре клеточных метаболитов реализуются на стадии сборки полимеров путем различных сочетаний исходных строительных блоков. В основе огромного числа видоспецифических и функционально специфических белков лежат комбинации из 20 аминокислот, а для того, чтобы зашифровать весь объем генетической информации одной клетки или многоклеточного организма, оказалось достаточным комбинации из 4 нуклеотидов.

Потребности прокариот в питательных веществах

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

Источники углерода

В конструктивном метаболизме основная роль принадлежит углероду, поскольку все соединения, из которых построены живые организмы, — это соединения углерода. В настоящее время их известно около миллиона. Не будет ошибочным или чересчур смелым утверждение, что при достаточном упорстве и желании можно найти представителя прокариотного мира, способного воздействовать на любое из известных углеродных соединений, т. е. использовать его в своем метаболизме. В зависимости от источника углерода для конструктивного метаболизма все прокариоты делятся на две группы: автотрофы, к которым принадлежат организмы, способные синтезировать все компоненты клетки из углекислоты, и гетеротрофы, источником углерода для конструктивного метаболизма которых служат органические соединения¹. Понятия авто- и гетеротрофия характеризуют, таким образом, тип конструктивного метаболизма. Если автотрофия — довольно четкое и узкое понятие, то гетеротрофия — понятие весьма широкое и объединяет организмы, резко различающиеся своими потребностями в питательных веществах.

Наибольшая степень гетеротрофности присуща прокариотам, относящимся к облигатным внутриклеточным паразитам, т. е. организмам, которые могут жить только внутри других живых клеток. К ним относятся бактерии, принадлежащие к порядку Rickett-

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

siales и Chlamydiales. Паразитический образ жизни привел к редукции некоторых метаболических путей у этих прокариот, что и обусловило полную их зависимость от метаболизма клетки хозяина. У одного из представителей рода *Chlamydia*, вызывающего заболевание, известное как пситтакоз («попугайная болезнь»), обнаружено отсутствие собственной системы генерирования АТФ, а также потребность в экзогенных органических и неорганических кофакторах. В то же время у этого организма показана способность катаболизировать глюкозу, пировиноградную и глутаминовую кислоты и выделять углекислоту. Найдены ферменты, необходимые для биосинтеза ряда клеточных компонентов, например некоторых липидов. По-видимому, зависимость этого организма от клеток хозяина определяется в первую очередь отсутствием у него собственного энергетического метаболизма.

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

Следующую крупную группу прокариот составляют так называемые сапрофиты — гетеротрофные организмы, которые непосредственно от других организмов не зависят, но нуждаются в готовых органических соединениях². Они используют продукты жизнедеятельности других организмов или разлагающиеся растительные и животные ткани. К сапрофитам относится большая часть бактерий. Степень требовательности к субстрату у сапрофитов весьма различна. В эту группу входят организмы, которые могут расти только на достаточно сложных субстратах (молоко, трупы животных, гниющие растительные остатки), т. е. им нужны в качестве обязательных элементов питания углеводы, органические формы азота в виде набора аминокислот, пептидов, белков, все или часть витаминов, нуклеотиды или готовые компоненты, необходимые для синтеза последних (азотистые основания, пятиуглеродные сахара). Чтобы удовлетворить потребность этих гетеротрофов в элементах питания, их обычно культивируют на средах, содержащих мясные гидролизаты, автолизаты дрожжей, растительные экстракты, молочную сыворотку.

Есть прокариоты, требующие для роста весьма ограниченное число готовых органических соединений в основном из числа витаминов и аминокислот, которые они не в состоянии синтезировать сами, и наконец, гетеротрофы, нуждающиеся только в одном органическом источнике углерода. Им может быть какой-либо сахар, спирт, кислота или другое углеродсодержащее соединение. Описаны бактерии из рода *Pseudomonas*, способные использовать в качестве единственного источника углерода и энергии любое из 200 различных органических соединений, и бактерии, для которых источником углерода и энергии может служить узкий круг довольно экзотических органических веществ. Например, *Bacillus fastidiosus* может использовать только мочевую кислоту и продукты ее деградации, а некоторые представители рода *Clostridium* растут только в среде, содержащей пурины. Использо-

² Термин «сапрофиты» происходит от греческих слов: *sargos* — «гнилой» и *phyton* — «растение».

вать другие органические субстраты для роста они не могут. Биосинтетические способности этих организмов развиты в такой степени, что они сами могут синтезировать все необходимые им углеродные соединения.

Особую группу прокариот, обитающих в водоемах, составляют олиготрофные бактерии³, способные расти при низких концентрациях в среде органических веществ. Если у типичных сапрофитов оптимальные условия для роста создаются при содержании в среде питательных веществ в количестве около 10 г/л, то для олиготрофных организмов — в пределах 1—15 мг углерода/л. В средах с более высоким содержанием органических веществ такие бактерии, как правило, расти не могут и погибают.

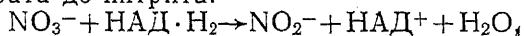
Различия между гетеротрофными прокариотами с высокими потребностями в готовых органических соединениях и теми, потребности которых минимальны и сводятся, как правило, к одному какому-нибудь органическому источнику углерода, заключаются, таким образом, в степени развития их биосинтетических способностей. Крайняя степень развития биосинтетических способностей — способность строить все клеточные компоненты из углекислоты — присуща группе автотрофных прокариот.

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

Азот

Азот (наряду с углеродом, водородом и кислородом) является одним из четырех основных элементов, из которых построены клетки. В расчете на сухие вещества его содержится около 10%. В природе азот встречается в окисленной, восстановленной форме и в виде молекулярного азота. Подавляющее большинство прокариот усваивают азот в восстановленной форме. Это соли аммония, мочевины, органические соединения (аминокислоты или продукты неполного гидролиза белка). Окисленные формы азота, главным образом нитраты, также могут потребляться многими прокариотами. Так как азот в конструктивном клеточном метаболизме используется в форме аммиака, нитраты перед включением в органические соединения должны быть восстановлены.

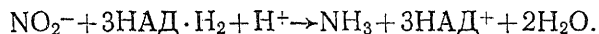
Восстановление нитратов до аммиака осуществляется посредством последовательного действия двух ферментов — нитрат- и нитритредуктазы. Нитратредуктаза катализирует НАД·Н₂-зависимое⁴ восстановление нитрата до нитрита:



³ Термин происходит от греческих слов *oligos* — «малый» и *trope* — «пища».

⁴ НАД(Ф)⁺ — окисленная, НАД(Ф)·Н₂ — восстановленная и НАД(Ф) — обобщенная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида или никотинамидадениндинуклеотидфосфата.

в результате которого осуществляется перенос на NO_3^- двух электронов. Нитритредуктаза катализирует шестиэлектронное восстановление NO_2^- до NH_3 :



До момента появления NH_3 никаких свободных промежуточных продуктов не обнаружено.

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

Потребности в источниках серы и фосфора

Сера входит в состав аминокислот (цистеин, метионин), витаминов и кофакторов (биотин, липоевая кислота, кофермент А и др.), а фосфор — необходимый компонент нуклеиновых кислот, фосфолипидов, коферментов. В природе сера находится в форме неорганических солей, главным образом сульфатов, в виде молекулярной серы или входит в состав органических соединений. Большинство прокариот для биосинтетических целей потребляют серу в виде сульфата, который при этом восстанавливается до уровня сульфида. Однако некоторые группы прокариот не способны к восстановлению сульфата и нуждаются в восстановленных соединениях серы.

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

Необходимость ионов металлов

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

Потребность в факторах роста

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

Синтез прокариотами основных клеточных компонентов

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

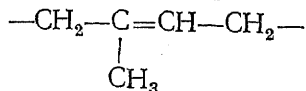
Биосинтез углеводов

Если прокариоты выращивать на средах, где источник углерода — одно-, двух- или трехуглеродные соединения, то необходимые сахара (в первую очередь, C_6) они должны синтезировать из имеющихся в среде источников углерода. У подавляющего большинства автотрофов на среде с CO_2 в качестве единственного источника углерода сахара синтезируются в реакциях цикла Кальвина. У гетеротрофов на среде с C_2 - и C_3 -соединениями для синтеза необходимых сахаров используются в значительной степени реакции, функционирующие в катаболическом потоке, например в гликолитическом пути. Однако поскольку некоторые ферментативные реакции этого пути необратимы, в клетках гетеротрофных прокариот, способных использовать двух- и трехуглеродные соединения, сформировались специальные ферментативные реакции, позволяющие обходить необратимые реакции катаболического пути.

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

Биосинтез липидов

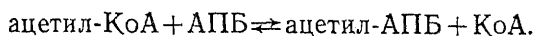
Липиды — группа, в которой объединены различные по химической природе соединения: жиры (сложные эфиры глицерина и жирных кислот), высокомолекулярные жирные кислоты, воска (сложные эфиры высших жирных кислот и спиртов). К липидам относятся также соединения, молекула которых содержит изопреновые фрагменты:



Каротиноиды построены на основе полимеризации 8 изопреновых остатков, стерины — на основе 6. Изопреновые компоненты входят в состав молекул хлорофиллов и 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 целей электронного транспорта. Ниже мы рассмотрим синтез жирных кислот и фосфолипидов, являющихся универсальным компонентом клеточных мембран.

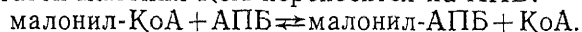
Исходным субстратом для синтеза жирных кислот с четным числом углеродных атомов служит ацетил-КоА. На первом этапе происходит перенос ацетильной группы от ацетил-КоА на молекулу особого белка, называемого ацилпереносящим белком (АПБ)⁵, которому в этом процессе принадлежит важная роль:



Ацетил-АПБ выполняет функцию затравки, к которой присоединяется С₂-фрагмент. Донором последнего служит молекула малонил-АПБ, синтезирующаяся также из ацетил-КоА в двух ферментативных реакциях. Сначала путем карбоксилирования метильной группы ацетил-КоА образуется малонил-КоА:

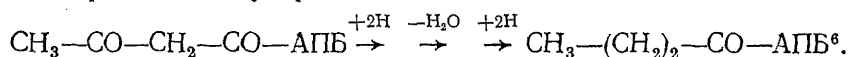


Кислотный остаток малонил-КоА переносится на АПБ:



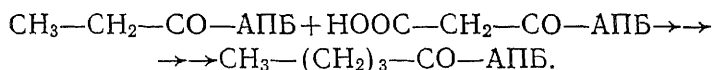
Следующий этап — перенос С₂-фрагмента от малонил-АПБ на ацетил-АПБ, приводящий к образованию ацетоацетил-АПБ, регенерации молекулы АПБ и освобождению СО₂.

Затем с помощью серии ферментативных реакций происходит восстановление окисленных углеродных атомов ацетоацетил-АПБ, приводящее к образованию бутирил-АПБ:

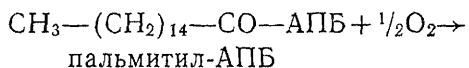


В результате конденсации бутирил-АПБ с новой молекулой малонил-АПБ и последующего восстановления продукта реакции образуется молекула С₆-жирной кислоты. Описанное выше последовательное наращивание С₂-остатков приводит к синтезу жирных кислот, содержащих обычно 16—18 углеродных атомов. О факторах, определяющих длину жирной кислоты, известно мало. Возможно, причина прекращения синтеза жирной кислоты — потеря сродства синтезируемой кислоты к АПБ или каким-либо ферментам. Показано, например, что скорость реакции присоединения малонил-АПБ к растущему ацил-АПБ-соединению понижается с увеличением длины цепи субстрата.

Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов образуются в результате начальной конденсации пропионил-АПБ с малонил-АПБ:

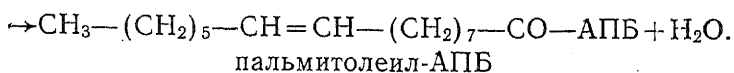


В клетках прокариот компонентами липидов являются в основном насыщенные жирные кислоты или содержащие одну двойную связь (мононенасыщенные). Полиненасыщенные жирные кислоты, содержащие две и более двойных связи, найдены до сих пор только у цианобактерий. Образование двойных связей в молекуле кислоты может происходить двумя путями. Один из них, обнаруженный у аэробных прокариот, требует участия молекулярного кислорода и специфического фермента десатуразы:



⁵ Ацил — любой кислотный остаток.

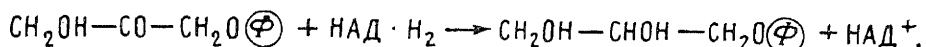
⁶ Здесь и дальше стрелки указывают, что образование продукта происходит в результате нескольких ферментативных реакций.



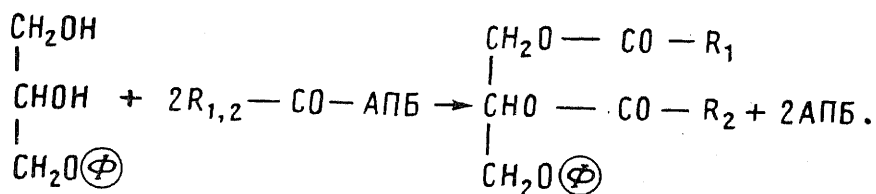
Дополнительные двойные связи могут быть введены в ту же молекулу в аналогичной реакции с участием того же фермента.

У облигатно анаэробных и некоторых аэробных прокариот функционирует иной механизм образования двойных связей. Он заключается в том, что последние вводятся в молекулу кислоты на ранней стадии ее синтеза в результате реакции дегидратации. Последовательность реакций включает образование АПБ-производного β -оксикислоты со средней длиной цепи, затем дегидратацию и последующее удлинение углеродной цепи молекулы, катализируемые ферментным комплексом. Одним из компонентов этого комплекса является дегидратаза, катализирующая этап дегидратации. Фермент проявляет высокую степень специфичности к длине цепи дегидратируемого АПБ-производного оксикислоты. У *E. coli* имеется несколько различных ацил-АПБ-дегидраз, одна из которых наиболее активна по отношению к АПБ-производному C_{10} -оксикислоты.

Пути, ведущие к синтезу фосфолипидов, состоят из нескольких этапов. Исходным субстратом служит фосфодиоксиацетон (промежуточное соединение гликолитического пути), восстановление которого приводит к образованию 3-фосфоглицерина:



К 3-фосфоглицерину затем присоединяются два остатка жирных кислот в виде комплекса с АПБ. Продуктом реакции является фосфатидная кислота:



Активирование ее с помощью ЦТФ и последующее присоединение к фосфатной группе серина, инозита, глицерина или другого соединения приводят к синтезу фосфатидилсерина, фосфатидилинозита и фосфатидилглицерина соответственно (см. рис. 14).

Биосинтез аминокислот

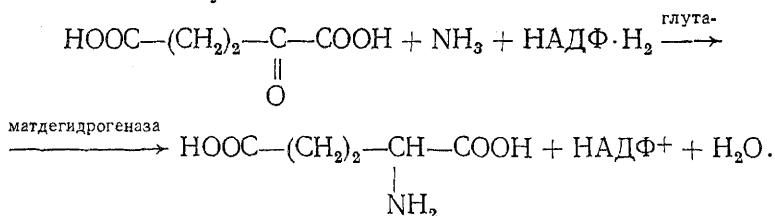
Большинство прокариот способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав клеточных белков. В качестве исходных углеродных скелетов для биосинтеза аминокислот служит небольшое число промежуточных соединений различных метаболических путей (табл. 12). Введение в молекулу некоторых из них (щавелевоуксусной, α -кетоглутаровой, пировиноградной кислот) аминного азота приводит к образованию аспарагиновой, глутаминовой кислот и аланина. Однако в большинстве случаев исходные соединения должны подвергнуться значительным перестройкам, чтобы сформировать углеродный остов молекулы будущей аминокислоты.

Особенностью биосинтеза аминокислот является использование общих биосинтетических путей. Так, 19 из 20 аминокислот, входящих

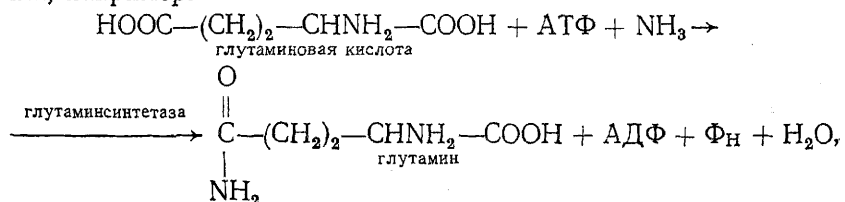
Некоторые особенности биосинтеза аминокислот

Предшественник	Метаболический путь, приводящий к образованию предшественника	Аминокислоты с общими биосинтетическими путями
Шавелевоуксусная кислота	цикл трикарбоновых кислот реакции карбоксилирования	аспарагиновая кислота аспарагин лизин метионин треонин изолейцин
α -Кетоглутаровая кислота	цикл трикарбоновых кислот	глутаминовая кислота аргинин пролин
3-Фосфоглицериновая кислота	гликолиз цикл Кальвина	серин глицин цистеин
Пировиноградная кислота	гликолиз путь Энтнера — Дудорова	аланин валин лейцин
Фосфоенолпировиноградная кислота Эритрозо-4-фосфат	гликолиз окислительный пентозофосфатный путь	триптофан тирозин фенилаланин
5-Фосфорибозил-1-пирофосфат + АТФ	окислительный пентозофосфатный путь	гистидин

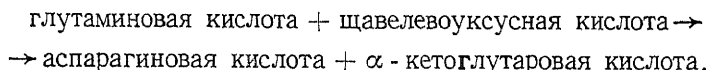
в состав белков, можно по способу их происхождения разделить на 5 групп. Только одна аминокислота (гистидин) образуется по **отдельному** биосинтетическому пути. Азот вводится в молекулу аминокислоты посредством реакций аминирования, амидирования и переаминирования. Реакция аминирования приводит к образованию из α -кетоглутаровой кислоты глутаминовой кислоты:



Две реакции амидирования ведут к образованию глутамина и аспарагина из глутаминовой и аспарагиновой кислот в реакциях следующего типа, например:

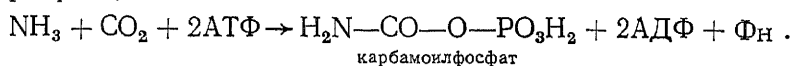


Глутаминовая кислота и глутамин прямо или косвенно служат донорами амино- и амидогрупп при синтезе практически всех аминокислот и других азотсодержащих органических соединений. Аспарагин используется только для синтеза белковых молекул. Во все остальные аминокислоты азот вводится посредством реакций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



Только две аминокислоты (треонин и лизин) имеют аминогруппы изначально, а не приобретают их в результате реакции переаминирования.

Еще одним путем включения азота аммиака в состав органических соединений является реакция, приводящая к образованию карбамоилфосфата;



Дальнейшее использование азота карбамоилфосфата происходит по двум путям: для синтеза пиримидинов и аргинина.

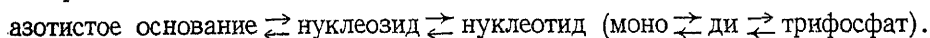
Биосинтез мононуклеотидов

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

Первым пиримидиновым нуклеотидом, синтезируемым de novo, является уридилат, декарбоксилирование которой приводит к образованию уридилатной кислоты (УМФ). Последняя служит предшественником цитидиловых нуклеотидов, но соответствующее превращение происходит только на уровне трифосфатов, поэтому сначала из УМФ образуется УТФ, аминирование которого приводит к возникновению ЦТФ.

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

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



Энергетический метаболизм прокариот

Энергетические процессы прокариот по своему объему (масштабности) значительно превосходят процессы биосинтетические, и протекание их приводит к существенным изменениям в окружающей среде. Разнообразны и необычны в этом отношении возможности прокариот, способы их энергетического существования. Все это вместе взятое сосредоточило внимание исследователей в первую очередь на изучении энергетического метаболизма прокариот. Но, прежде чем перейти к изложению материала по энергетическому метаболизму прокариотных организмов в плане его эволюционного становления, следует напомнить некоторые основные понятия биоэнергетики и дать общую характеристику энергетическим процессам прокариот.

Некоторые понятия биоэнергетики

Биоэнергетика занимается изучением превращения энергии в живых организмах, т. е. это термодинамика применительно к биологическим системам⁷. В основе термодинамики лежит несколько простых принципов (законов), приложимых к любым процессам, протекающим как в живых, так и в неживых системах. Первый закон термодинамики указывает, что общая энергия изолированной системы при любом процессе всегда остается постоянной, т. е. первый закон термодинамики — закон о сохранении энергии. Второй закон термодинамики налагает определенные ограничения на возможности самопроизвольного превращения энергии в системе и может быть сформулирован следующим образом: все процессы стремятся идти в направлении возрастания общей энтропии системы и окружающей среды.

Энтропия — мера неупорядоченного состояния внутренней энергии системы, т. е. в каждый данный момент она определяет степень хаотичности системы. Величина энтропии определяет ту часть внутренней энергии системы, которая не может быть превращена в работу. Из второго закона термодинамики следует, что можно с большой вероятностью предсказать направление протекания определенного процесса (например, химической реакции) в системе. Однако измерить изменение энтропии в системе и окружающей среде не всегда просто.

Для предсказания направления процесса удобно пользоваться измерением изменения свободной энергии системы (ΔG). Свободная энергия — это та часть общей энергии системы, которая может быть превращена в работу. В условиях, когда температура, давление и объем системы постоянны, что имеет место, например, при протекании химических реакций в разбавленных водных растворах и в живом организме, самопроизвольно будут идти те процессы, которые ведут к уменьшению свободной энергии в системе, т. е. процессы, в которых изменение свободной энергии будет отрицательным ($-\Delta G$). Такие процессы называются экзергоническими. Процессы, для которых ΔG является величиной положительной, называются эндергоническими. Эти процессы не могут происходить самопроизвольно. Для протекания эндергонических процессов в системе необходим приток энергии извне.

Для каждой химической реакции характерно определенное изменение стандартной свободной энергии ($\Delta G_0'$), т. е. изменение свобод-

⁷ Под системой в термодинамике понимают совокупность вещества, являющегося объектом изучения. Это может быть Вселенная в целом, отдельный организм или единичная клетка. Все, что находится вне изучаемой системы, называют окружающей средой.

ной энергии при стандартных значениях температуры и давления, при 1М концентрации исходных веществ и продуктов реакции и при pH 7,0. Например, $\Delta G_0'$ гидролиза АТФ до АДФ и Φ_n равняется 31,8 кДж/моль (при 1М концентрации исходных веществ и продуктов реакции, температуре 37°, pH 7,0 в присутствии избытка ионов Mg^{2+}). Для биолога важно, что по такому параметру, как изменение свободной энергии, он может осуществлять анализ биологических процессов.

Энергетические ресурсы

Для совершения работы организмы могут использовать не все виды энергии, существующей в природе. Недоступными для них являются ядерная, механическая, тепловая виды энергии. Чтобы теплота могла служить источником энергии, необходим большой перепад температур (порядка 100°, как это имеет место в современных тепловых машинах), который в живых организмах невозможен. Доступными для живых систем внешними источниками энергии (энергетическими ресурсами) являются электромагнитная (физическая) энергия (свет определенной длины волны) и химическая (восстановленные химические соединения). Способностью использовать энергию света обладает большая группа фотосинтезирующих организмов, в том числе и прокариот, имеющих фоторецепторные молекулы нескольких типов (хлорофиллы, каротиноиды, фикобилипротеиды). Для всех остальных организмов источниками энергии служат процессы окисления химических соединений.

Часто энергетическими ресурсами служат биополимеры, находящиеся в окружающей среде (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты), а также липиды. Прежде чем быть использованными, биополимеры должны быть гидролизованы до составляющих их мономерных единиц. Этот этап весьма важен по следующим причинам. Белки и нуклеиновые кислоты отличаются исключительным разнообразием. Количество видов белков исчисляется тысячами, после гидролиза же образуется только 20 аминокислот. Все разнообразие нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) после гидролиза сводится к 5 видам нуклеотидов. Таким образом, расщепление полимеров до мономерных единиц резко сокращает набор химических молекул, которые могут быть использованы организмом.

Поскольку полимеры не могут проникать через ЦПМ, они расщепляются до мономеров с помощью ферментов, синтезируемых и выделяемых прокариотами в окружающую среду (экзоферментов). Крахмал и гликоген гидролизуются амилазами, гликозидные связи целлюлозы расщепляются целлюлазой. Многие бактерии образуют пектиназу, хитиназу, агаразу и другие ферменты, гидролизующие соответствующие полисахариды и их производные. Белки расщепляются внеклеточными протеазами, воздействующими на пептидные связи. Нуклеиновые кислоты гидролизуются рибо- и дезоксирибонуклеазами. Образующиеся небольшие молекулы легко транспортируются в клетку через мембрану.

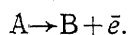
Процесс распада жирных кислот локализован в клетке и включает несколько этапов. На первом из них жирная кислота с помощью соответствующего фермента превращается в КоА-производное, которое окисляется в β -положении с последующим отщеплением ацетил-КоА. Другим продуктом реакции является КоА-производное жирной кислоты, укороченное на два углеродных атома. Ацетил-КоА по катаболическим каналам используется для получения клеткой энергии.

Процесс расщепления биополимеров не связан с образованием свободной, т. е. доступной клетке энергии. Происходящее при этом рассеивание энергии также невелико. Образовавшиеся мономеры подвергаются в клетке дальнейшим ферментативным превращениям, которые сводятся к тому, чтобы путем перестройки химической структуры получить молекулы, которые могли бы включиться на каком-либо этапе в качестве метаболитов в функционирующие клеточные катаболические системы. Таких в прокариотной клетке несколько. Основные из них: путь Эмбдена — Мейергофа — Парнаса (или гликолиз), окислительный пентозофосфатный путь, путь Энтнера — Дудорова и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК). Общее для всех катаболических путей — многоступенчатость процесса окисления исходного субстрата. На некоторых этапах окисление субстрата сопряжено с образованием энергии в определенной форме, в которой эта энергия может использоваться в самых разнообразных энергозависимых процессах.

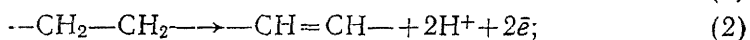
Таким образом, внешние доступные организмам источники энергии (свет, химические соединения) должны быть трансформированы в клетке в определенную форму, чтобы обеспечить внутриклеточные потребности в энергии.

Общая характеристика энергетических процессов

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



Например, $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + \bar{e};$ (1)



В первой реакции окисление иона двухвалентного железа — это потеря электрона. Во втором примере окисление углеродного субстрата можно в равной мере рассматривать как отрыв от него водорода (дегидрирование) или независимое удаление двух протонов (H^+) и электронов (\bar{e}). В биохимических процессах, как правило, перенос водорода осуществляется путем отдельного транспорта протонов и электронов: протоны выделяются в среду и при необходимости поглощаются из нее, электроны обязательно должны быть переданы на соответствующие молекулы. Поэтому все окислительно-восстановительные превращения определяются по существу «перемещениями» электронов. В последнем примере имеет место присоединение атома кислорода к молекуле субстрата. Окислительно-восстановительный характер реакции в этом случае не столь очевиден, как в предыдущих, поскольку не происходит отрыва электрона (водорода) от молекулы метана. В данном случае в результате окисления метана происходит замена связи $C-H$ на связь $C-OH$, при этом кислород оттягивает электроны от атома углерода, подвергнувшегося окислению, сам при этом восстанавливаясь. Таким образом, внутри молекулы происходит «деление» электронной пары между атомами углерода и кислорода, т. е. окислительно-восстановительные перестройки. Реакции, в которых имеется возможность отрыва электронов, могут быть использованы прокариотами для получения энергии.

Разнообразные соединения, способные окисляться, т. е. являющиеся источниками отрываемых электронов, называются донорами электронов. Поскольку электроны не могут существовать самосто-

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

У прокариот известны три способа получения энергии: разные виды брожения, дыхания и фотосинтеза. В процессах брожения в определенных окислительно-восстановительных реакциях образуются нестабильные молекулы, фосфатная группа которых содержит много свободной энергии. Эта группа с помощью соответствующего фермента переносится на молекулу АДФ, что приводит к образованию АТФ. Реакции, в которых энергия, освобождающаяся на определенных окислительных этапах брожения, запасается в молекулах АТФ, получили название субстратного фосфорилирования. Их особенностью является катализирование растворимыми ферментами и поэтому возможность протекания в растворе. В клетке реакции субстратного фосфорилирования не связаны с мембранными структурами. Образующийся в восстановительной части окислительно-восстановительных преобразований сбраживаемого субстрата восстановитель (НАД·Н₂, восстановленный ферредоксин) переносит электроны на подходящий эндогенный акцептор электрона (пируват, ацетальдегид, ацетон и др.) или освобождается в виде газообразного водорода (Н₂).

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

Многие прокариоты получают энергию в процессе дыхания. Они окисляют восстановленные вещества с относительно низким окислительно-восстановительным потенциалом (E_0), возникающие в реакциях промежуточного метаболизма или являющиеся исходными субстратами, например, НАД·Н₂, сукцинат, лактат, NH₃, H₂S и др. (табл. 13).

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

Высокая отрицательная величина стандартного окислительно-восстановительного потенциала водорода говорит о его высокой восстановительной способности, т. е. способности отдавать электроны. Чем больше отрицательная величина стандартного окислительно-восстановительного потенциала определенной окислительно-восстановительной системы, тем выше ее восстановительная способность, и наоборот. Стандартный окислительно-восстановительный потенциал системы $H_2O \rightleftharpoons 1/2O_2 + 2H^+ + 2e^-$ равен $+820$ мВ. Большая положительная величина потенциала объясняет слабую способность воды отдавать электроны и одновременно высокую способность молекулярного кислорода акцептировать электроны. Таким образом, в соответствии со значениями окислительно-восстановительных потенциалов для двух или нескольких окислительно-восстановительных систем электроны без подведения энергии извне будут перемещаться в направлении от более электроотрицательных систем к более электроположительным.

Окислительно-восстановительные потенциалы (E'_0 , мВ) веществ, участвующих в энергетических процессах у прокариот

Окислительно-восстановительная система	E'_0 , мВ
Пируват/ацетат + CO_2	-700
α -Кетоглутарат/сукцинат + CO_2	-670
Ацетат/ацетальдегид	-600
CO_2 /формиат	-432
$\text{H}^+ / \frac{1}{2}\text{H}_2$	-420
Ферредоксин окисл/восст (из <i>Clostridium pasteurianum</i>)*	-420
НАД(Ф) ⁺ /НАД(Ф)· H_2	-320
1,3-дифосфоглицериновая кислота/3-фосфоглицериновый альдегид + Φ_{H}	-290
CO_2 /ацетат	-290
S^0/HS^-	-270
CO_2/CH_4	-244
$\text{SO}_4^{2-}/\text{HS}^-$	-220
ФАД/ФАД· H_2	-220
ФМН/ФМН· H_2	-190
Менахинон окисл/восст	-74
Рубредоксин окисл/восст	-57
Фумарат/сукцинат	+30
Цитохром <i>b</i> окисл/восст	+70
Убихинон окисл/восст	+100
Цитохром <i>b</i> ₂ окисл/восст	+120
Цитохром <i>c</i> окисл/восст	+220
Цитохром <i>a</i> окисл/восст	+290
$\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$	+433
$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	+772
$\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+820

* E'_0 ферредоксинов Fe_2S_2 -типа у разных прокариот имеет значения от -225 до -455 мВ, а Fe_4S_4 -типа от +350 до -480 мВ.

Окисление происходит в результате переноса электронов через локализованную в мембране дыхательную электронтранспортную цепь, состоящую из набора переносчиков, и приводит в большинстве случаев к восстановлению молекулярного кислорода (экзогенного окислителя с высоким окислительно-восстановительным потенциалом) до H_2O . Таким образом, в процессе дыхания молекулы одних веществ окисляются, других — восстанавливаются, т. е. окислительно-восстановительные процессы в этом случае всегда межмолекулярны.

Наиболее широко распространена среди прокариот способность окислять органические субстраты. Обнаружены также весьма специализированные группы прокариот, способные окислять различные неорганические субстраты (H_2 , NH_4^+ , NO_2^- , H_2S , $S_2O_3^{2-}$, Fe^{2+} и др.) с соответствующим восстановлением O_2 . Наконец, прокариоты могут окислять органические и неорганические вещества с использованием в качестве конечного акцептора электронов не молекулярного кислорода, а целого ряда органических и неорганических соединений (фумарат, CO_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} и др.). Количество освобождающейся энергии определяется градиентом окислительно-восстановительных потенциалов при переносе электронов от донора к акцептору. Так, окисление H_2 молекулярным кислородом сопровождается освобождением значительно большего количества свободной энергии ($\Delta G_0' = -238$ кДж/моль), чем окисление НАД· H_2 фумаратом ($\Delta G_0' = -68$ кДж/моль).

У прокариот известны три типа фотосинтеза: I — зависимый от бактериохлорофилла бескислородный фотосинтез, осуществляемый несколькими группами зеленых и пурпурных бактерий; II — зависимый от хлорофилла кислородный фотосинтез, свойственный большой группе цианобактерий и недавно обнаруженный у бактерий, отнесенных к порядку Prochlorales; III — зависимый от бактериородопсина бескислородный фотосинтез, найденный у некоторых галофильных бактерий. В основе фотосинтеза I и II типа лежит поглощение солнечной энергии различными пигментами, приводящее к разделению электрических зарядов, возникновению восстановителя с низким и окислителя с высоким окислительно-восстановительным потенциалом. Перенос электронов между этими двумя компонентами приводит к выделению свободной энергии. В фотосинтезе III типа окислительно-восстановительные переносчики отсутствуют. В этом случае энергия в доступной для организма форме возникает в результате светозависимого перемещения H^+ через мембрану.

Изучение у прокариот электронтранспортных цепей, функционирующих в процессах дыхания и фотосинтеза I и II типа, выявило принципиальное сходство между ними. В обеих системах электронного транспорта есть флавопротеиды, хиноны, цитохромы и белки, содержащие негемовое железо, позволяющие переносить электроны вниз по термодинамической лестнице. Таким образом, по существу обе электронтранспортные цепи являются окислительными. Разнообразие в их организации обнаружено при более детальном изучении и выражается как в широком наборе доноров и акцепторов электронов, так и в конкретной организации самих цепей: химическом строении переносчиков, принадлежащих к одному типу, их наборе, расположении и т. д.

В процессах дыхания и фотосинтеза освобождающаяся при переносе электронов энергия запасается первоначально в форме электрохимического трансмембранного градиента ионов водорода ($\Delta \bar{\mu}_{H^+}$) т. е.

имеет место превращение химической и электромагнитной энергии в электрохимическую. Последняя затем может быть использована для синтеза АТФ. Поскольку в обоих процессах синтез АТФ обязательно связан с мембранами, реакции, приводящие к его образованию, получили название мембранного фосфорилирования. Последнее подразделяется на два вида: окислительное (АТФ образуется в процессе электронного переноса при окислении химических соединений) и фотосинтетическое (синтез АТФ связан с фотосинтетическим электронным транспортом) фосфорилирование. Следует подчеркнуть, что принципы генерации АТФ при фотосинтезе и дыхания, т. е. механизмы мембранного фосфорилирования, одинаковы. Таким образом, энергия, получаемая в процессах брожения, дыхания или фотосинтеза, запасается в определенных формах.

Существуют две универсальные формы энергии, которые могут быть использованы в клетке для выполнения разного рода работы: энергия высокоэнергетических химических соединений (химическая) и энергия трансмембранного потенциала ионов водорода (электрохимическая). Охарактеризуем несколько подробнее каждую из форм клеточной энергии.

Высокоэнергетические соединения. АТФ — универсальная форма химической энергии в клетке

У прокариот существует несколько типов богатых энергией химических соединений. Самую большую группу составляют соединения с высокоэнергетической фосфатной связью: это ацилфосфаты (ацетилфосфат, бутирилфосфат, пропионилфосфат, карбамилфосфат), фосфорные эфиры енолов (фосфоенолпируват), нуклеозидди- и трифосфаты, аденозинфосфосульфат. Другая распространенная группа — соединения с высокоэнергетической тиоэфирной связью — ацилтиоэфиры (КOA-производные жирных кислот — уксусной, пропионовой, масляной, янтарной).

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

Для ГТФ показано участие в процессе биосинтеза белков. На одном из этапов синтеза пептидогликана клеточной стенки прокариот используется УТФ. Активирование кислотных остатков, необходимое для биосинтеза длинноцепочечных жирных кислот, происходит путем образования ацил-КoA с высокоэнергетической тиоэфирной связью. Однако эти соединения с макроэнергетическими связями участвуют в ограниченном числе клеточных биосинтезов.

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

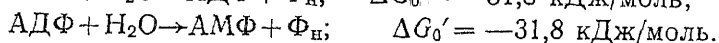
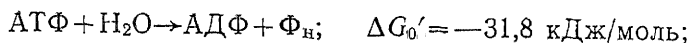
I. субстрат $\sim \Phi^s + \text{АДФ} \rightleftharpoons \text{субстрат} + \text{АТФ}$;

II. субстрат $\sim \text{X} + \text{АДФ} + \Phi_{\text{H}} \rightleftharpoons \text{субстрат} + \text{X} + \text{АТФ}$.

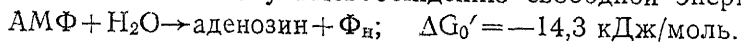
В реакциях первого типа осуществляется перенос высокоэнергетической фосфатной группы с молекулы-донора на АДФ, катализируемый соответствующими киназами. Широко распространенными реакциями такого типа являются реакции субстратного фосфорилирования на пути анаэробного превращения сахаров. У прокариот,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

АТФ образуется также за счет энергии $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ в процессе мембранного фосфорилирования. В общих чертах механизм мембранного фосфорилирования изложен в следующем разделе.

При рН 7,0 АТФ представляет собой анион с высоким зарядом, так как в его молекуле имеется четыре ОН-группы, способные к ионизации. В интактной клетке лишь небольшая часть молекул АТФ находится в виде свободных анионов; основная масса АТФ образует комплексы с ионами магния и марганца (MgATP^{2-} , MnATP^{2-}). Молекула АТФ содержит две макроэргические фосфатные связи, при гидролизе которых высвобождается значительное количество свободной энергии:



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



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

И наконец, еще одно свойство молекулы АТФ, обеспечившее ей центральное место в энергетическом метаболизме клетки. Изменение свободной энергии при гидролизе АТФ составляет $-31,8$ кДж/моль. Если сравнить эту величину с аналогичными величинами для ряда других фосфорилированных соединений, то мы получим определенную шкалу. На одном из ее полюсов будут расположены фосфорилированные соединения, гидролиз которых приводит к высвобождению значительного количества свободной энергии (высокие отрицательные значения ΔG). Это так называемые «высокоэнергетические соединения. На другом полюсе будут располагаться фосфорилированные соединения, ΔG гидролиза которых имеет невысокое отрицательное зна-

⁸ Символ « \sim », введенный американским биохимиком Ф. Липманом (F. Lipmann), служит для обозначения макроэргической связи.

чение («низкоэнергетические» соединения). Пример высокоэнергетического соединения — фосфоенолпировиноградная кислота ($\Delta G_0' = -58,2$ кДж/моль), низкоэнергетического — глицеро-1-фосфат ($\Delta G_0' = -9,2$ кДж/моль). АТФ на этой шкале занимает промежуточное положение, что и дает ему возможность наилучшим образом выполнять энергетические функции: переносить энергию от высокоэнергетических к низкоэнергетическим соединениям.

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

$\overline{\Delta\mu_{H^+}}$ — вторая универсальная форма клеточной энергии

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

Позднее были получены экспериментальные данные о существовании еще одной формы энергии, также используемой клеткой для совершения разного рода работы. Открытие этой формы энергии принадлежит английскому биохимику Питеру Митчеллу (P. Mitchell), разработавшему в 60-х гг. хемиосмотическую теорию энергетического сопряжения, объясняющую превращение (трансформацию) энергии, освобождающейся при электронном транспорте, в энергию фосфатной связи АТФ. П. Митчелл постулировал, что при переносе электронов по окислительно-восстановительной цепи, локализованной в мембранах определенного типа, называемых энергопреобразующими, или сопрягающими, происходит неравномерное распределение H^+ в пространстве по обе стороны мембраны (рис. 25). Предложенная им модель предусматривает определенное расположение переносчиков электронов в сопрягающей мембране, например ЦПМ, которые могут быть погружены в глубь мембраны или локализованы у наружной и внутренней ее поверхностей, так что образуют «петли» в цепи переноса электронов. В каждой «петле» (у прокариот электронтранспортные цепи в сопрягающих мембранах могут формировать разное число «петель») два атома водорода движутся от внутренней стороны ЦПМ к наружной с помощью переносчика водорода (например, хинона). Затем два электрона возвращаются к внутренней стороне мембраны с помощью со-

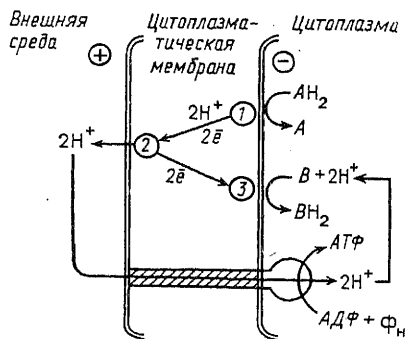


Рис. 25. Схематическое изображение переноса электронов и протонов по электронтранспортной цепи и протонной АТФ-синтазы: АН₂ и В — донор и акцептор электронов соответственно; 1, 2, 3 — компоненты электронтранспортной цепи. Объяснение см. в тексте

ответствующего электронного переносчика (например, цитохрома), а два протона освобождаются во внешнюю среду.

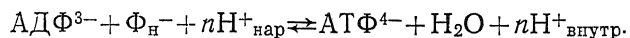
Таким образом, в каждой окислительно-восстановительной «петле» два Н⁺ переносятся из цитоплазмы клетки во внешнюю среду. Общее число протонов, перенесенных через ЦПМ и выделенных во внешнюю среду, при переносе двух электронов по электронтранспортной цепи зависит от числа образуемых ею окислительно-восстановительных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

Поскольку Н⁺ — химические частицы, несущие положительный заряд, неравномерное их накопление по обе стороны мембраны приводит к возникновению не только химического (концентрационного) градиента этих частиц, но и ориентированного поперек мембраны электрического поля (суммарный положительный заряд, где происходит накопление Н⁺, и отрицательный заряд по другую сторону мембраны). Таким образом, при переносе электронов на ЦПМ возникает трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода, обозначаемый символом $\Delta\mu_{H^+}$ и измеряемый в вольтах (В, мВ), который состоит из электрического (трансмембранная разность электрических потенциалов — $\Delta\psi$) и химического (концентрационного) компонентов (градиент концентрации Н⁺ — ΔpH). Измерения показали, что на сопрягающих мембранах прокариот при работе дыхательных и фотосинтетических электронтранспортных цепей $\Delta\mu_{H^+}$ достигает 230—290 мВ, при этом вклад каждого из компонентов непостоянен. Он зависит от физиологических особенностей организма и условий его культивирования.

Итак, в соответствии с хемиосмотической теорией П. Митчелла, энергия, освобождаемая в результате работы электронтранспортной цепи, первоначально накапливается в форме трансмембранного градиента ионов водорода. Разрядка образующегося $\Delta\mu_{H^+}$ происходит с участием локализованного в той же мембране протонного АТФ-синтетазного комплекса: Н⁺ возвращаются по градиенту $\Delta\mu_{H^+}$ через Н⁺-АТФ-синтазу, при этом без возникновения каких-либо промежуточных высокоэнергетических соединений из АДФ и неорганического фосфата образуется АТФ. (Сами сопрягающие мембраны в интактном

состоянии непроницаемы для ионов, особенно H^+ и OH^- .) Предположительно, для синтеза одной молекулы АТФ достаточен перенос двух протонов, т. е. $H^+/ATP=2$. Однако не исключено, что H^+/ATP может быть больше.

Локализованный в мембране H^+ -зависимый АТФ-синтетазный ферментный комплекс катализирует реакции синтеза (проявляет АТФ-синтетазную активность) и гидролиза (АТФ-азная активность) АТФ в соответствии со следующим уравнением:



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

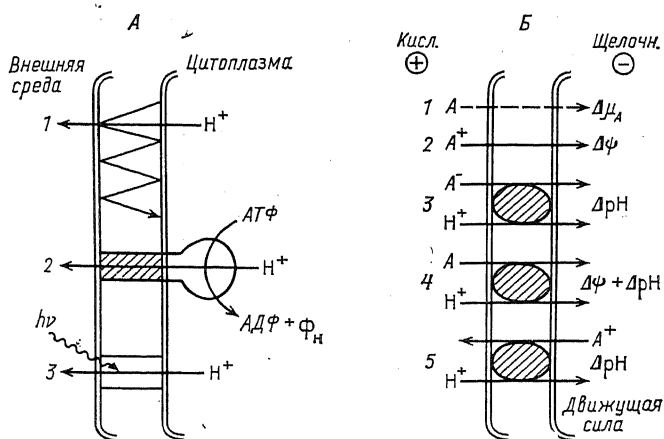
Известно несколько реакций, генерирующих $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. У разных групп прокариот от 1 до 3 из них локализованы в дыхательной цепи. На одном или двух этапах $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ генерируется в темновых реакциях переноса электронов в фотосинтетической цепи. Образование $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ происходит в H^+ -зависимой АТФазной реакции. К числу устройств, генерирующих $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ посредством трансмембранного переноса H^+ , относится бактериородопсин галофильных бактерий. У некоторых групп прокариот обнаружена локализованная в мембране неорганическая пирофосфатаза, катализирующая расщепление и синтез пирофосфата. Расщепление последнего приводит к генерированию $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. Наконец, источником $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ на ЦПМ прокариот могут быть процессы, связанные с выделением во внешнюю среду продуктов брожения, транспорт которых через мембрану происходит вместе с протонами.

Энергия в форме электрохимического градиента ионов водорода может использоваться в различных энергозависимых процессах, локализованных на мембране. Синтез АТФ за счет $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ можно рассматривать как пример химической работы. За счет энергии $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ могут осуществляться и другие виды химической работы в клетке: синтез неорганического пирофосфата, катализируемый связанным с мембраной ферментным комплексом; обратный перенос электронов, приводящий к восстановлению НАД(Ф)⁺; фиксация молекулярного азота. Недавно было показано, что энергия в форме $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ используется для поглощения ДНК в процессе генетической трансформации. Движение многих прокариот обеспечивается энергией трансмембранного электрохимического градиента ионов водорода. Важная роль принадлежит $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ или одной из его составляющих в осуществлении процессов активного транспорта молекул и ионов через ЦПМ прокариот (рис. 26).

Все известные в настоящее время системы транспорта у прокариот можно разделить на два типа: первичные и вторичные. Разобранные выше примеры трансмембранного переноса H^+ с участием окислительно-восстановительной «петли», бактериородопсина или в ре-

Рис. 26. Схематическое изображение транспортных систем в клетках прокариот.

А. Системы первичного транспорта: 1 — перенос электронов по окислительно-восстановительной цепи; 2 — протонная АТФаза; 3 — бактериородопсин. Б. Системы вторичного транспорта: 1 — пассивный транспорт нейтральных молекул; 2 — активный перенос катионов (унипорт); 3 — симпорт анионов и протонов; 4 — симпорт нейтральных молекул и H^+ ; 5 — антипорт катионов и протонов (по Koenigs, Veldkamp, 1980)



в результате гидролиза АТФ, катализируемого H^+ -АТФазой, происходящие за счет химической энергии или электромагнитной энергии света, относятся к первичным транспортным системам (рис. 26, А). В результате их функционирования на мембране генерируется энергия в форме $\Delta\mu_{H^+}$, которая в свою очередь может служить движущей силой, обеспечивающей с помощью индивидуальных белковых переносчиков поступление в клетку необходимых веществ разной химической природы и удаление из нее конечных продуктов метаболизма. Устройства, с помощью которых осуществляется трансмембранный перенос веществ по градиенту $\Delta\mu_{H^+}$ или одной из его составляющих, относятся ко вторичным транспортным системам (рис. 26, Б).

Как известно, в случае пассивной диффузии вещества движущей силой служит только градиент его концентрации ($\Delta\mu$) вне и внутри клетки. Если подобный градиент существует и в процессе активного транспорта вещества, он может вносить определенный вклад в общую движущую силу процесса, однако этот вклад не является определяющим. В большинстве случаев перенос вещества по механизму активного транспорта происходит против его концентрационного градиента.

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

Для понимания движущих сил, участвующих в активном транспорте разных типов молекул (электронейтральных, а также несущих положительный или отрицательный заряд), следует помнить, что в цитоплазме более щелочная среда и суммарный отрицательный заряд. Незаряженные молекулы такие, как глюкоза, галактоза, нейтральные аминокислоты, переносятся в клетку вместе с протонами за счет обо-

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

Все это позволяет рассматривать энергию в форме $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ (наряду с АТФ) как широко используемую внутри клетки. Преобразование энергии в клетке прокариот схематически изображено на рис. 27. Как видно из этой схемы, АТФ и $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ можно считать двумя взаимопревращаемыми «энергетическими валютами» клетки, каждая из которых способна служить источником энергии для выполнения химической, осмотической, механической работы.

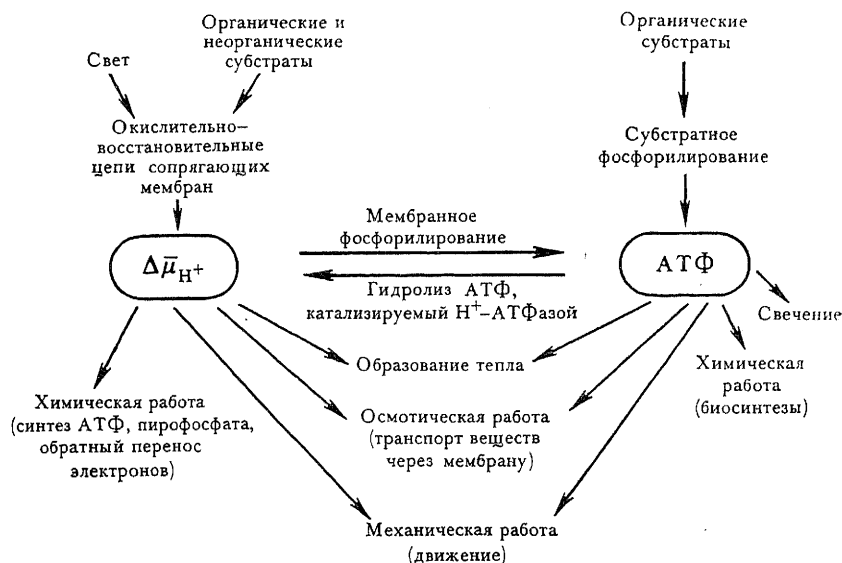


Рис. 27. Преобразование энергии в клетке прокариот (по Скулачеву)

Для чего клетке необходимы две формы энергии?

АТФ участвует в реакциях, протекающих в цитоплазме, т. е. в форме АТФ энергией обеспечиваются все процессы, протекающие в водной среде. К числу последних относится большинство биосинтетических реакций. Помимо этого, АТФ служит источником энергии для протекания ряда мембранозависимых процессов.

Энергия протонного градиента связана исключительно с мембранами, которые являются и необходимым компонентом для его образования. Поэтому энергией в форме $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ могут обеспечиваться только процессы, локализованные на мембране. Таким образом, у $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ более узкая область «приложения». В то же время использование клеточной энергии в форме $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ имеет определенные преимущества. Для

энергетического обеспечения мембранозависимых процессов нет необходимости в переводе энергии в другую форму, при котором неизбежны потери. $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ в форме его электрической составляющей — более удобная форма энергии для внутри- и межклеточной транспортировки. Скорость переноса энергии посредством диффузии АТФ в цитоплазме значительно медленнее, чем скорость передачи $\Delta\psi$ по мембранам. Диффузия АТФ может быть сильно затруднена в клетках с развитой системой внутрицитоплазматических мембран. Наконец, перенос энергии посредством диффузии АТФ совсем неэффективен, если речь идет о межклеточном транспорте энергии, что важно для многоклеточных организмов. В этом случае эффективность передачи энергии по мембранам наиболее очевидна.

Наконец, энергия в форме $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ не содержится в виде определенных порций, как это имеет место в молекуле АТФ. При гидролизе макроэргической фосфатной связи АТФ освобождается определенное количество энергии ($\Delta G_0' = -31,8$ кДж/моль). Если для сопряженного эндоэргического процесса требуется меньшее количество энергии, остальная часть рассеивается в виде тепла. При использовании энергии в форме трансмембранного потенциала потерь, обусловленных запасанием энергии в виде порций, не происходит. С этим связано и еще одно преимущество при использовании клеткой энергии в форме $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$: не существует нижнего порога для его образования. Для синтеза АТФ необходима разность окислительно-восстановительных потенциалов порядка 200 мВ. Ниже этого порогового значения АТФ не может быть синтезирован. Для образования энергии в форме трансмембранного потенциала подобных ограничений нет. Поэтому энергия трансмембранного потенциала может образовываться и потребляться клеткой в условиях, когда синтез АТФ невозможен.

Таким образом, хотя каждая из форм клеточной энергии может быть использована для осуществления химической, механической и осмотической работы, между ними существует определенное «разделение труда», например, большинство биосинтезов обеспечивается энергией АТФ, активный транспорт — энергией $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. Из этого следует, что клетке необходимо всегда иметь определенное количество энергии в той и другой легко мобилизуемой форме. Это может быть одной из причин существования в клетке двух взаимосвязанных энергетических пулов (резервуаров), между которыми при необходимости легко может осуществляться перекачка энергии (рис. 27). Емкость обоих энергетических пулов невелика. Например, величина $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ поддерживается на уровне 200—250 мВ. Внутриклеточная концентрация АТФ составляет около 2 мМ. Это также указывает на каталитическую роль АТФ в клетке. Подсчитано, что для удвоения клеточной массы каждая молекула АТФ должна около 10 000 раз участвовать в реакциях гидролиза и синтеза.

Энергетические затраты клетки

Вырабатываемая прокариотами энергия расходуется по многим каналам (рис. 27). В растущей бактериальной культуре потребление энергии в первую очередь связано с процессами биосинтеза веществ, из которых состоит клетка. Количество энергии, необходимое для биосинтетических целей, в большой степени зависит от состава среды культивирования. Теоретически рассчитано, что при выращивании

культуры бактерий в минеральной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода 1 моль АТФ затрачивается для синтеза 27 г вещества клеток. Если же единственным источником углерода служит CO_2 , тогда использование того же количества АТФ приведет к синтезу только 5 г вещества клеток.

Для *E. coli* большая часть биосинтетических реакций в настоящее время известна. Это позволило определить количество АТФ, используемого для образования основных клеточных макромолекул. Было подсчитано, что в культуре *E. coli*, растущей в минеральной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, для синтеза 1 г клеточного материала расходуется около 35 ммоль АТФ. Больше половины этого количества (около 20 ммоль) используется в реакциях полимеризации аминокислот, ведущих к синтезу белковых молекул. Следующими по энергетическим затратам биосинтетическими процессами являются ферментативные этапы включения сахара в соответствующие нуклеотиды на пути синтеза РНК и ДНК (около 3,5 ммоль АТФ), а также реакции полимеризации моносахаров (около 2 ммоль АТФ).

Помимо энергетических затрат на биосинтетические процессы, связанные с ростом, определенная часть клеточной энергии всегда тратится на процессы, не связанные непосредственно с ростом. Последние получили название процессов поддержания жизнедеятельности. К специфическим функциям поддержания жизнедеятельности относятся: обновление клеточного материала, осмотическая работа, обеспечивающая поддержание концентрационных градиентов между клеткой и внешней средой, подвижность клетки и др. Энергию, расходуемую на осуществление перечисленных выше функций, обозначают как энергию поддержания жизнедеятельности.

Когда бактерии находятся в условиях, в которых у них по каким-либо причинам отсутствует рост и, следовательно, нет надобности в энергии для биосинтезов, у них и в этом случае не прекращаются определенные метаболические процессы. Примером крайнего проявления состояния покоя служат бактериальные эндоспоры, метаболическая активность которых находится на уровне, не всегда регистрируемом современными приборами. Однако и в этом случае она не равна нулю. Метаболизм бактерий в состоянии покоя иногда называют основным обменом. Энергия, необходимая для осуществления основного обмена, и есть энергия поддержания жизнедеятельности.

Здесь необходимо остановиться на одном принципиально важном моменте. Состояние покоя живых организмов — всегда динамическое, в отличие от статического состояния неживых систем. Это означает, что в покоящихся организмах концентрации большинства молекул поддерживаются не статически, а динамически, т. е. процессы распада органических соединений и компенсирующие их биосинтетические процессы продолжают и в состоянии кажущегося покоя.

Активно обновляющимися клеточными веществами являются молекулы ферментных белков, информационной РНК, материал клеточных стенок и мембран. Динамическое состояние свойственно почти всем метаболитам и структурам клетки, различие наблюдается только в отношении скоростей процессов обновления различных клеточных компонентов. Исключение составляют молекулы ДНК и некоторых из бактериальных белков. В отношении ДНК понятно, что динамическое состояние генетического материала повышает опасность возникновения ошибок при его обновлении и связанные с этим летальные последствия для организма.

В условиях активного роста энергия, используемая в процессах обновления, составляет лишь небольшую часть общих энергетических расходов клетки. В состоянии покоя общие энергетические затраты клетки значительно понижаются и на этом фоне удельный вес расходуемой на обновление клеточных веществ энергии заметно возрастает.

Значительная часть энергии поддержания жизнедеятельности расходуется на совершение осмотической работы. В приведенном выше расчете энергетических затрат *E. coli* для процессов активного транспорта используется около 5 ммоль АТФ, т. е. $\frac{1}{7}$ расходуемого количества АТФ.

Величина энергии поддержания жизнедеятельности в значительной степени зависит от условий роста. Так, для *Azotobacter vinelandii*, фиксирующего азот при низком (0,02 атм) и высоком (0,2 атм) напряжении растворенного кислорода, она колеблется от 22 до 220 ммоль АТФ на 1 г биомассы, т. е. прямо пропорциональна концентрации растворенного O_2 . Считают, что клетка тратит много дополнительной энергии для защиты от избытка кислорода, ингибирующего ферментную систему, ответственную за фиксацию молекулярного азота. По проведенным подсчетам, энергия поддержания жизнедеятельности обычно составляет 10—20% всей энергии, расходуемой в энергозависимых процессах. Описаны, однако, условия, в которых бактерии расходуют на поддержание жизнедеятельности до 90% вырабатываемой энергии.

Консервирование энергии

Энергетический метаболизм в целом сопряжен с биосинтетическими и другими энергозависимыми процессами, происходящими в клетке, для протекания которых он поставляет энергию, восстановитель и необходимые промежуточные метаболиты. Сопряженность двух типов метаболизма не исключает некоторого изменения в их относительных масштабах в клетке в зависимости от конкретных условий. Показано, что прокариоты, обладающие наиболее совершенными системами получения энергии (дыхание, фотосинтез), способны генерировать энергию в значительно большем количестве, чем необходимо для роста и обеспечения всех энергозависимых клеточных функций.

Возможны такие условия, когда клетка запасает энергии больше, чем тратит. В этом случае она сталкивается с проблемой консервирования энергии. В молекулах АТФ энергия не хранится в течение длительного времени. По проведенным подсчетам, средняя продолжительность «жизни» молекул АТФ составляет около $\frac{1}{3}$ с. Энергия в форме $\Delta\mu_{H^+}$ также не может накапливаться. Движение H^+ против градиента возможно только до достижения определенного уровня, после которого возникшая разность концентраций и электрических зарядов будет тормозить поступление ионов водорода против градиента. Таким образом, в молекулах АТФ и в виде электрохимического трансмембранного потенциала энергия находится в мобильной форме, призванной обеспечивать все идущие в настоящий момент энергозависимые процессы.

Проблема консервирования энергии решена прокариотами путем синтеза восстановленных высокополимерных молекул, главным образом полисахаридов, реже липидов или полипептидов. Молекулы запасных веществ плотно упакованы в гранулах и часто окружены белковой оболочкой (см. табл. 7). В таком виде они находятся в осмотически неактивном состоянии, что очень важно для клетки.

Способы существования и типы жизни у прокариот

В зависимости от того, какой источник энергии могут использовать прокариоты, их делят на фототрофов (источник энергии — свет) и хемотрофов (источник энергии — окислительно-восстановительные реакции). Организмы, у которых источниками (донорами) электронов в энергетическом процессе являются неорганические вещества, предложено называть литотрофными, а те, у которых донорами электронов служат органические соединения, — органотрофными. Тогда в зависимости от источника энергии и природы донора электронов возможны четыре основных типа энергетического метаболизма: хемолитотрофия, хемоорганотрофия, фотолитотрофия и фотоорганотрофия.

У прокариот с хемотрофным типом энергетического метаболизма одно и то же соединение служит донором электронов, большая часть которых перемещается в соответствии с термодинамическим градиентом, что приводит к выделению свободной энергии, а меньшая — используется для образования восстановителя, потребляемого в конструктивном метаболизме. Это положение справедливо в отношении прокариот с энергетикой бродильного и дыхательного типа, при использовании в качестве энергетических ресурсов органических и неорганических соединений. У фототрофов использование света в качестве источника энергии требует дополнительного подключения химических соединений, служащих донорами электронов для образования восстановителя. Это связано со спецификой света как энергетического ресурса для живых систем.

Теоретически каждый тип энергетического метаболизма может осуществляться на базе различных биосинтетических способностей организма. Выше уже обсуждалось деление всех прокариот в зависимости от особенностей конструктивного метаболизма на две группы: авто- и гетеротрофов. Следовательно, можно выделить 8 сочетаний типов энергетического и конструктивного метаболизма, которые отражают возможности способов существования (питания) прокариот (табл. 14). Всем перечисленным выше способам питания соответствуют реально существующие прокариотные организмы. Однако число видов прокариот, относящихся к группам, характеризующимся разными способами питания, далеко не одинаково. Большинство прокариот сосредоточено в группе с хемоорганогетеротрофным типом питания. Такая же неравномерность в распределении по типам питания присуща и фотосинтезирующим прокариотам. Подавляющее число (все цианобактерии, большинство пурпурных и зеленых серобактерий) относится к группе с фотолитоавтотрофным способом питания. Часто для характеристики способа питания прокариот пользуются более общими понятиями, чем приведенные в табл. 14, употребляя для этого сочетания только из двух признаков: источник энергии (фото, хемо-) + источник углерода для построения веществ тела (авто-, гетеро-)⁹.

Перечисленные в табл. 14 сочетания основных видов энергетического и конструктивного метаболизма характеризуют всевозможные способы питания прокариотных организмов. Некоторые прокариоты могут существовать только на базе одного какого-нибудь способа питания. Например, одноклеточная цианобактерия *Synechococcus elonga-*

⁹ Иногда термины «хемооргано-» и «хемогетеротрофия», «фотооргано-» и «фотогетеротрофия», «хемолито-» и «хемоавтотрофия», «фотолито-» и «фотоавтотрофия» употребляются как синонимы. Из вышеизложенного становится очевидным неправомерность отождествления понятий, выраженных этими терминами.

Способы существования прокариот

Источник энергии	Донор электронов	Источник углерода	Способ существования	Представители прокариот
Окислительно-восстановительные реакции	неорганические соединения (H_2 , H_2S , NH_3 , Fe^{2+} и др.)	CO_2	хемотритоавтотрофия	нитрифицирующие, тионовые, водородные бактерии; ацидофильные железобактерии
		органические соединения	хемотритогетеротрофия	метанобразующие, водородные бактерии
	органические соединения	CO_2	хемотритоавтотрофия	факультативные метилотрофы, окисляющие муравьиную кислоту
		органические соединения	хемотритогетеротрофия	большинство прокариот*
Свет	неорганические соединения (H_2O , H_2S , S и др.)	CO_2	фотолитоавтотрофия	цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии**
		органические соединения	фотолитогетеротрофия	некоторые цианобактерии, пурпурные и зеленые бактерии
	органические соединения	CO_2	фотоорганотрофия	некоторые пурпурные бактерии
		органические соединения	фотоорганогетеротрофия	пурпурные и некоторые зеленые бактерии, галобактерии, некоторые цианобактерии

* Все животные, грибы.

** Высшие растения.

tus может использовать в качестве источника энергии только свет, а как основной источник углерода в конструктивном метаболизме — углекислоту. Характеризуя способ существования (образ жизни, тип метаболизма) этого организма, мы говорим, что он облигатный фотолитоавтотроф. Многие бактерии, относящиеся к роду *Thiobacillus*, — облигатные хемотритоавтотрофы, т. е. источником энергии для них служат процессы окисления различных соединений серы, а источником углерода для построения веществ тела — углерод углекислоты. Подавляющее большинство бактерий — облигатные хемотритогетеротрофы, использующие в качестве источника углерода и энергии органические соединения.

Приверженность к одному определенному типу питания в рамках перечисленных выше — явление, распространенное в мире прокариот. Однако исключений из него больше. Для некоторых представителей группы цианобактерий наряду с фотолитоавтотрофией показана способность к фотолито- или хемотритогетеротрофии. Ряд хемотритоавтотрофных видов *Thiobacillus* способны существовать за счет использования в качестве источников энергии и углерода органических соединений, т. е. хемотритогетеротрофно.

В приведенных выше примерах метаболические возможности указанных цианобактерий и видов *Thiobacillus* оказались гораздо шире, чем необходимо для осуществления метаболизма по одному типу. В этом случае мы говорим о том, что данные организмы — факультативные фотолитоавтотрофы или хемолитоавтотрофы, т. е. осуществление данного типа метаболизма не является для них единственным и обязательным (облигатным). Организмы, способные переходить от одного способа питания к другому или одновременно использовать два источника углерода (CO_2 + органические вещества) и/или энергии (например, энергию света + энергию окисления химического соединения), называются миксотрофами, или мезотрофами.

В рамках разобранных выше основных способов питания, определяющих возможности существования прокариотных организмов, в мире прокариот обнаружено множество типов (форм) жизни. Тип жизни — понятие, отражающее, с одной стороны, специфику процессов энергетического метаболизма, с другой — специфику процессов конструктивного метаболизма, присущую определенной группе организмов. Разберем это на примере прокариот, для которых обязательен хемоорганогетеротрофный способ существования. Энергетические процессы этих организмов различаются исходными субстратами, специфичностью промежуточных окислительно-восстановительных превращений и природой конечных акцепторов электронов; конструктивные — разной степенью развития биосинтетических способностей, т. е. различными потребностями в готовых питательных веществах.

Наиболее примитивную и древнюю группу энергетических процессов составляют процессы брожения, когда органическое вещество служит донором и конечным акцептором электронов, а молекулярный кислород в реакциях окислительной природы участия не принимает. Известны молочнокислое, спиртовое, пропионовокислое, маслянокислое и некоторые другие виды брожения, каждое из которых является специфической формой решения «энергетической проблемы» и осуществляется группой прокариот, характеризующихся определенными биосинтетическими способностями. Известны прокариотные организмы, получающие энергию за счет процессов неглубокого или полного окисления органического субстрата молекулярным кислородом.

Таким образом, на базе хемоорганогетеротрофного способа питания можно выделить несколько типов жизни, представленных определенными группами прокариот, осуществляющими конкретный тип энергетического метаболизма (разные виды брожений и окислений органического субстрата с участием O_2) в сочетании с присущими им особенностями метаболизма конструктивного.

Прокариоты и факторы внешней среды

Для прокариот как группы в целом характерна способность существовать в гораздо большем диапазоне изменений условий внешней среды, чем для эукариотных организмов.

Отношение к молекулярному кислороду

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

подавляющее большинство организмов удовлетворяет свои потребности в этом элементе, используя обе формы кислорода. При выращивании *Pseudomonas* в присутствии $^{18}\text{O}_2$ и H_2^{18}O источником приблизительно 10% кислорода, входящего в состав клеточного материала, служил газообразный кислород, 50—60% клеточного кислорода происходило из воды. Остальной кислород в клетку поставляли органические и неорганические компоненты питательной среды (глюкоза, фосфаты, нитраты, сульфаты и др.).

В мире прокариот существуют значительные различия в отношении организмов к молекулярному кислороду. По отношению к последнему все прокариотные организмы могут быть разделены на несколько физиологических групп (рис. 28). Прокариоты, для роста которых O_2

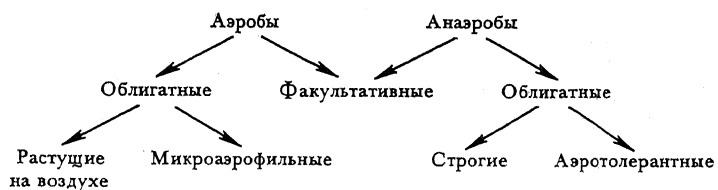


Рис. 28. Схема деления прокариот на группы в зависимости от отношения к молекулярному кислороду

необходим, называют облигатными (обязательными) аэробами. К ним относится большинство прокариотных организмов. Среди облигатных аэробов обнаружены существенные различия в отношении к уровню молекулярного кислорода в среде. Некоторые представители этой группы не способны к росту при концентрации O_2 , равной атмосферной (21%), но могут расти, если содержание O_2 в окружающей среде будет значительно ниже (порядка 2%). Такие облигатно аэробные прокариоты получили название микроаэрофилов.

Потребность прокариот в низкой концентрации O_2 в окружающей среде часто связана с их метаболическими особенностями. Многие аэробные азотфиксирующие бактерии могут расти в среде с молекулярным азотом только при концентрации O_2 ниже 2%, т. е. как микроаэрофилы, а в присутствии связанного азота, например аммонийного, — на воздухе при концентрации O_2 21%. Это объясняется ингибирующим действием молекулярного кислорода на активность нитрогеназы — ферментного комплекса, ответственного за фиксацию N_2 . Аналогичная картина обнаружена у многих водородокисляющих бактерий. На среде с органическими соединениями в качестве источника энергии они хорошо растут при атмосферном содержании O_2 . Если источником энергии является окисление молекулярного водорода, эти же бактерии для роста требуют низкой концентрации O_2 . Последнее связывают с инактивацией молекулярным кислородом гидрогеназы — фермента, катализирующего использование H_2 .

Наконец, среди облигатных аэробов существуют значительные различия в устойчивости к высоким уровням O_2 в среде. По имеющимся данным, 100%-ный молекулярный кислород подавляет рост всех облигатных аэробов. Многие аэробные бактерии могли формировать колонии на поверхности твердой питательной среды в атмосфере, содержащей 40% O_2 , но рост их прекращался, когда содержание O_2 в атмосфере доходило до 50%.

Известны прокариоты, для метаболизма которых O_2 не нужен, т. е. энергетические и конструктивные процессы у них происходят без

участия молекулярного кислорода. Такие организмы получили название облигатных анаэробов. К ним относятся метанобразующие, сульфатвосстанавливающие, маслянокислые и некоторые другие бактерии. До сравнительно недавнего времени считали, что облигатные анаэробы могут получать энергию только в процессах брожения. В настоящее время известно много облигатно анаэробных прокариот, которые произошли от аэробов в результате вторичного приспособления к анаэробным условиям, приведшего к потере способности использовать O_2 в качестве конечного акцептора электронов в процессе дыхания. Такие облигатные анаэробы получают энергию в процессах переноса электронов по цепи переносчиков на CO_2 , SO_4^{2-} , фумарат и другие акцепторы.

В ряду облигатно анаэробных прокариот, не включающих O_2 в метаболические реакции, существует широкий спектр степени устойчивости к молекулярному кислороду, находящемуся во внешней среде. Многие из облигатных анаэробов не выносят присутствия даже незначительных количеств молекулярного кислорода в среде и быстро погибают. Часто такие организмы называют строгими анаэробами. К числу строгих анаэробов относятся представители родов *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Butirivibrio*, *Methanobacterium*, *Methanosarcina* и др. Маслянокислые бактерии относятся также к группе облигатных анаэробов, но среди них есть виды, умеренно (*Clostridium tetani*, *C. carnis*, *C. tertium*, *C. sporogenes*) или достаточно высоко (*C. perfringens*, *C. acetobutylicum*) толерантные к O_2 . Наконец, молочнокислые бактерии, обладающие метаболизмом только анаэробного типа, могут расти в присутствии воздуха и выделены в отдельную группу аэротолерантных анаэробов.

Хотя облигатно анаэробные бактерии в целом очень чувствительны к O_2 , они могут в природе находиться в аэробных зонах. Широкое распространение представителей рода *Clostridium* в местах с высоким парциальным давлением O_2 объясняется наличием у них эндоспор, нечувствительных к молекулярному кислороду. Однако и многие не образующие спор строго анаэробные прокариоты обнаружены в природе в местах, где наблюдается активное развитие облигатных аэробов. Вероятно, совместное развитие с облигатными аэробами, активно потребляющими молекулярный кислород, приводящее к образованию зон с низкой концентрацией O_2 , создает возможности и для развития строго анаэробных видов.

Описаны прокариотные организмы, которые могут расти как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Изучение этого явления показало, что природа его различна. Бактерии, не нуждающиеся в O_2 (последний не участвует в осуществляемых или метаболических реакциях), но способные расти в его присутствии, являются по типу осуществляемого ими метаболизма облигатными анаэробами, устойчивыми к O_2 внешней среды. Примером таких организмов служат молочнокислые бактерии. Многие прокариоты, относящиеся к этой же группе, приспособились в зависимости от наличия или отсутствия O_2 в среде переключаться с одного метаболического пути на другой, например, с дыхания на брожение и наоборот. Такие организмы получили название факультативных анаэробов, или факультативных аэробов. Представителями этой физиологической группы прокариот являются энтеробактерии. В аэробных условиях они получают энергию в процессе дыхания. В анаэробных условиях источником энергии для них служат процессы брожения или так называемого «анаэробного дыхания», когда электроны по электрон-

транспортной цепи поступают не на молекулярный кислород, а на нитрат или fumarat.

Потребность в O_2 у аэробов определяется его участием в энергетических и конструктивных процессах. В первом случае O_2 служит обязательным конечным акцептором электронов, во втором — участвует в реакциях (или единственной реакции) на пути многоступенчатого преобразования клеточных метаболитов или экзогенных субстратов. У облигатных аэробов большая часть O_2 используется в качестве конечного акцептора электронов в реакциях, катализируемых цитохромоксидазами. Меньшая часть включается в молекулы с помощью ферментов, получивших общее название оксигеназ. В клетках факультативных анаэробов также содержатся цитохромоксидазы. У облигатных анаэробов нет ферментов, катализирующих взаимодействие с O_2 , т. е. они получают энергию и метаболизируют все вещества без участия молекулярного кислорода.

Данные о механизмах взаимодействия прокариот с молекулярным кислородом, токсических формах O_2 и способах защиты от них у прокариот изложены в гл. 11.

Влияние излучения

Все живые организмы находятся под воздействием разных видов излучения (рис. 29). Эффекты, вызываемые облучением живых орга-

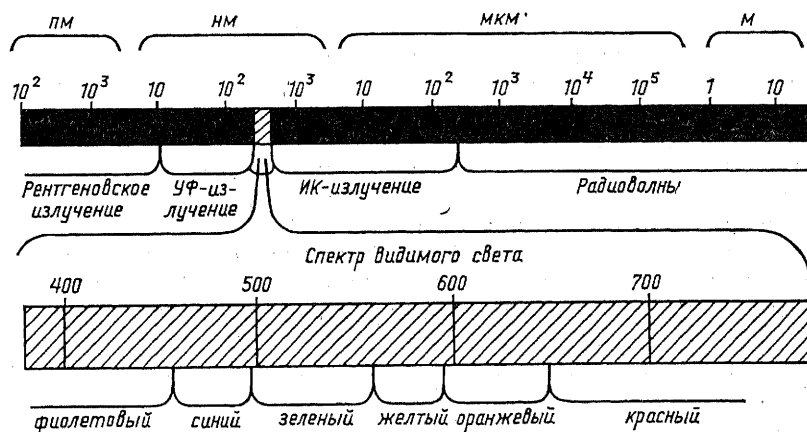


Рис. 29. Спектр электромагнитного излучения

низмов, зависят от длины волны излучения и его дозы, т. е. от энергии и количества поглощенных квантов (рис. 30). Излучение в области длин волн от 300 до 1100 нм, приходящееся в основном на видимый свет, обеспечивает возможность осуществления упорядоченных реакций при поглощении его подходящими для этого системами. В организмах излучение в этом диапазоне индуцирует такие процессы, как фотосинтез, фототаксис, фотореактивацию ДНК, синтез некоторых макромолекул. Для излучений с длиной волны больше 1100 нм к настоящему времени не зарегистрировано каких-либо биологических эффектов. Основное действие ИК-излучения — ускорение движения молекул (нагревание). Действие коротковолнового излучения на организмы приводит к возникновению мутаций или вызывает смертельный (летальный) исход из-за необычайно высокой фотохимической активности этого вида излучения, приводящего к модификации или разрушению поглотивших его органических молекул.

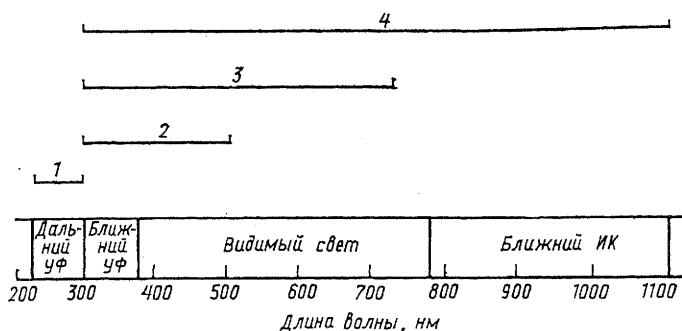


Рис. 30. Биологические эффекты, вызываемые излучением различной длины волны:
 1 — повреждения ДНК и белков; 2 — фотореактивация ДНК; 3 — фототаксис и фотосинтез эукариот; 4 — фототаксис и фотосинтез прокариот

Важнейшим источником естественного излучения является солнечная радиация. Основная масса падающей на Землю солнечной энергии (примерно 75%) приходится на долю видимых лучей, почти 20% — на ИК-область спектра и только приблизительно 5% — на УФ с длиной волны 300—380 нм. Нижний предел длин волн солнечной радиации, падающей на земную поверхность, определяется плотностью так называемого озонового экрана. Излучение с длиной волны до 220 нм вызывает ионизацию молекул кислорода верхних частей атмосферы, приводя к образованию слоя озона (O_3) с максимальной концентрацией на высоте около 25 км от поверхности Земли. Озоновый слой эффективно поглощает электромагнитное излучение с длинами волн в области 220—300 нм, выполняя функцию экрана. Таким образом, УФ с длиной волны до 220 нм полностью поглощается молекулами кислорода атмосферы, а в области 220—300 нм эффективно задерживается озоновым экраном. Важной частью солнечного спектра является область, примыкающая с обеих сторон к 300 нм. Начиная с 300 нм и дальше, излучение индуцирует фотосинтетические и фототаксические реакции, при этом у прокариот диапазон длин волн, в котором возможны оба процесса, значительно шире, чем у эукариот (рис. 30).

Фотосинтез, сопровождающийся выделением O_2 , свойственный всем эукариотным организмам и двум группам прокариот (цианобактерии и прохлорофиты), возможен в диапазоне от 300 до 750 нм. Для прокариот, способных к осуществлению бескислородного фотосинтеза, диапазон излучений, обеспечивающих фотосинтетическую активность, увеличивается в сторону более длинных волн, захватывая ближнюю ИК-область: для зеленых бактерий вплоть до 840 нм, пурпурных бактерий — до 920 нм, а для некоторых представителей этой группы — до 1100 нм. Спектры активности фототаксиса у прокариот совпадают со спектрами фотосинтетической активности.

Свет в диапазоне от дальнего УФ до дальней красной области оказывает влияние на разнообразные жизненные функции (подвижность, циклы развития, синтез каротиноидов) не только фототрофных, но и хемотрофных прокариот. Фоторецепторами, запускающими или контролирующими определенные метаболические пути, служат разные типы молекул: флавины, каротиноиды, порфирины. Солнечная радиация в диапазоне 220—300 нм, достигающая Земли, активно поглощается также молекулами белков и нуклеиновых кислот. Хотя повреж-

дение негенетического материала может приводить к отрицательным эффектам, особенно при облучении клеток высокими дозами, при облучении более низкими дозами основной причиной инактивации клеток служит повреждение ДНК.

Влияние температуры

Температурные условия в биосфере достаточно разнообразны. Свыше 80% ее принадлежит к постоянно холодным областям. Значительная часть поверхности суши, включающая и континент Антарктиду, имеет низкую температуру. Средняя температура почвы в умеренной климатической зоне составляет 12°. Примерно 75% поверхности Земли приходится на долю Мирового океана, и около 90% его объема имеет температуру ниже 5°. Таков общий температурный профиль Земли.

Но на Земле есть много мест, резко различающихся температурным режимом. На одном полюсе располагаются области, где температура постоянно низкая. Это подземные и обледенелые пещеры, в которых температура никогда не поднимается выше 10°, а порой лежит ниже точки замерзания воды. Температура воды в глубинных слоях открытого океана, как правило, не поднимается выше 5°; в Атлантическом, Индийском и Тихом океанах придонный слой воды имеет температуру между 2 и 3° на низких широтах и около 0° в Антарктике. Температура глубоких вод Арктики иногда составляет —2°.

Другой полюс составляют места с постоянно высокой температурой естественного, а также связанного с деятельностью человека происхождения. Это действующие вулканы (1000°); фумаролы (до 500°), которыми называют выходы на поверхность земли струй паров и газов из расщелин или отверстий, инкрустированных серой; кипящие или перегретые источники (от 93 до 101° в зависимости от высоты над уровнем моря); некипящие горячие источники с температурами от близких к кипению до температуры окружающей среды; воды, нагреваемые для домашних и промышленных нужд (температура до 80° и выше), а также отходы различных технологических процессов.

Помимо мест с постоянными температурными режимами, на Земле есть много областей с меняющимся температурным режимом. Это, прежде всего, поверхностные слои морей и океанов; мелкие пресные водоемы, реки; верхние слои атмосферы, большинство мест на суше в зонах с умеренным и холодным климатом. Так, во многих областях с умеренным климатом температура колеблется от нуля и ниже до 30° и выше. В условиях холодного климата температурные колебания могут быть и более значительными: от —88 до +5° и выше. В некоторых сухих долинах Антарктики температура на поверхности скал летом может достигать 30° и выше. В более теплых областях Земли температура почв, различных подстилок, скал прогревается солнцем до 60—70° и выше.

При определении влияния температуры на прокариотные организмы следует различать два момента: способность организмов к выживанию после длительного нахождения в экстремальных температурных условиях и способность их к росту в этих условиях. В первом случае речь идет о возможности сохранения организмами жизнеспособности в условиях нахождения в течение длительного времени при низких или высоких температурах, что проявляется в способности к возобновлению роста после перенесения в подходящие для этого условия. Приспособления, сформированные у прокариот для перенесения неблагоприятных условий, в том числе и температурных, — это споры,

цисты. Характеристика их устойчивости к высоким температурам приведена в табл. 9. Устойчивость вегетативных клеток и различных покоящихся форм больше в условиях воздействия низкими температурами. Так, вегетативные клетки и покоящиеся формы прокариот сохраняли жизнеспособность после длительного выдерживания при температуре, близкой к абсолютному нулю. Последнее используется в качестве одного из способов, обеспечивающих длительное хранение культур прокариот.

При изучении влияния температуры на скорость роста прокариотных организмов выделяют, прежде всего, температурный диапазон, позволяющий рост, ограниченный минимальной и максимальной температурами, т. е. температурами, при которых рост прекращается, а также область оптимальных температур с наблюдаемой максимальной скоростью роста. Положение на температурной шкале основных точек (минимальная, максимальная, оптимальная температура), а также величина температурного диапазона роста прокариот сильно различаются. На основании температурного диапазона роста и положения оптимальной области прокариоты делят на три основные группы: мезофилы, психрофилы и термофилы. Последние в свою очередь подразделяются на отдельные подгруппы (рис. 31).

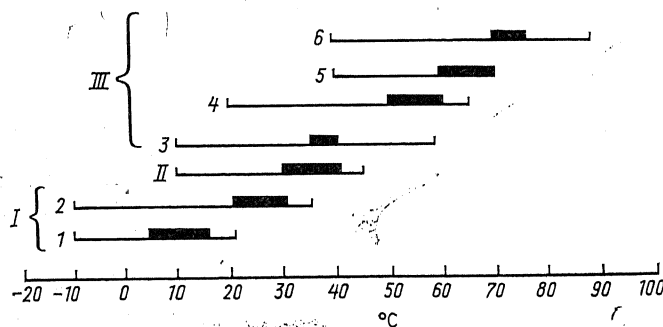


Рис. 31. Температурные границы и оптимальные зоны роста прокариот и основанная на этом их классификация. I. Психрофилы: 1 — облигатные; 2 — факультативные. II. Мезофилы. III. Термофилы: 3 — термотолерантные; 4 — факультативные; 5 — облигатные; 6 — экстремальные. Жирной линией выделены оптимальные температуры роста

Большинство известных видов прокариот относится к мезофилам, у которых оптимальные температуры роста лежат между 30 и 40°, а температурный диапазон, в котором рост возможен, находится между 10 и 45°. Типичным мезофилом является *E. coli*: нижняя граница роста 10°, верхняя 42°, оптимальная температура 37°.

Психрофилы и факторы, определяющие возможность роста при низких температурах. Область температур роста психрофилов лежит в пределах от -10 до 20° и выше. В свою очередь психрофилы делятся на облигатные и факультативные. Основное различие между подгруппами заключается в том, что облигатные психрофилы не способны к росту при температуре выше 20°, а верхняя температурная граница роста факультативных психрофилов намного выше. Таким образом, факультативные психрофилы характеризуются более широким температурным диапазоном, при котором возможен их рост. И если в области низких температур они сходны с облигатными формами по способности к росту, то в области повышенных температур обладают

способностью размножаться в значительно более высоких температурных границах. Различаются они также и оптимальными температурными зонами роста, находящимися у облигатных психрофилов значительно ниже, чем у факультативных (рис. 31). Принципиальное же сходство между ними в способности к росту при 0° и минусовых температурах.

Существование двух типов психрофилов объясняется особенностями их мест обитания. Облигатные психрофилы приспособились к устойчивым холодным условиям (глубины морей и океанов, ледяные пещеры). Напротив, психрофилы второго типа приспособились к обитанию в неустойчивых холодных условиях. В природе большинство психрофилов представлено факультативными формами. Способность психрофилов расти в условиях низких температур связывают в первую очередь с особенностями их ферментных белков и мембранных липидов. Увеличение в последних содержания ненасыщенных жирных кислот позволяет мембранам находиться в функционально активном жидкокристаллическом состоянии при низких температурах.

Термофилы и механизмы термофилии. Группу термофилов делят на 4 подгруппы:

1. Термотолерантные виды растут в пределах от 10 до 55—60°, оптимальная область лежит при 35—40°. Основное их отличие от мезофилов — способность расти при повышенных температурах, хотя оптимальные температуры роста для обеих групп находятся на одном уровне.

2. Факультативные термофилы имеют максимальную температуру роста между 50 и 65°, но способны также к размножению при комнатной температуре (20°); оптимум приходится на область температур, близких к верхней границе роста. Особенность этой группы прокариот — способность к росту в области от 20 до 40°.

3. К облигатным термофилам относят виды, обнаруживающие способность расти при температурах до 70° и не растущие ниже 40°. Оптимальная температурная область облигатных термофилов примыкает к их верхней температурной границе роста. Представители облигатных термофилов: *Bacillus acidocaldarius*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Thermoplasma acidophila*, *Synechococcus lividus* и др.

4. И наконец, недавно были обнаружены прокариоты, развивающиеся при температурах выше 70°, которых предложено выделить в отдельную подгруппу экстремальных термофилов. Для них характерны следующие температурные параметры: оптимум в области 70—75°, минимальная граница роста — 40° и выше, максимальная — от 80 до 90°. К экстремальным термофилам относятся организмы, не имеющие аналогов среди мезофилов и поэтому выделенные в отдельные таксоны главным образом в ранге родов, например роды *Thermus*, *Thermomicrobium*, *Thermothrix* и др.

Разнообразие прокариот, которые удается культивировать при высоких или относительно высоких температурах, достаточно велико. Способность расти при температурах от 50 до 70°, свойственная представителям термотолерантных, факультативных и облигатных термофилов, не связана с осуществлением ими какого-либо одного специфического типа метаболизма. Среди термофилов, относящихся к этим группам, найдены фотосинтезирующие, хемолитотрофные и хемогетеротрофные бактерии. Есть среди них облигатные аэробы и анаэробы.

Термофильные прокариоты, верхний предел роста которых ограничен 70°, в целом структурно напоминают свои мезофильные аналоги и по типам осуществляемого ими конструктивного и энергетиче-

ского метаболизма относятся к тем же группам, что и мезофильные виды. По мере повышения температуры число видов, способных к росту, быстро уменьшается. Температурный предел для фотосинтезирующих прокариот ограничен 70—73°. Это связывают с их неспособностью формировать функционально активные фотосинтетические мембраны. Температурная ниша выше 70°, занятая экстремальными термофилами, бедна представителями. Только несколько видов способны расти при температуре выше 80°. Верхний температурный предел, при котором достоверно зафиксирован рост прокариот в виде чистых культур в лаборатории, составляет к настоящему времени 92°, хотя в природных условиях было обнаружено, что некоторые бактерии способны к интенсивному росту даже в кипящей воде¹⁰.

Для всех известных экстремальных термофилов характерен метаболизм хемогетеротрофного типа. Единственное исключение составляет *Sulfolobus acidocaldarius* — наиболее термофильный факультативный автотроф, растущий при pH в области 1—5,8 за счет окисления серы. Его способность использовать CO₂ в качестве единственного источника углерода при 85—90° служит указанием на функционально активное состояние при этих температурах механизма автотрофной фиксации CO₂.

Остальные обнаруженные к настоящему времени экстремальные термофилы — хемогетеротрофы. В новый род *Thermus* выделены не образующие спор грамотрицательные бактерии, оптимальная температура роста которых между 70 и 75°, а верхняя граница — 80—85°. В горячих щелочных источниках обнаружены бактерии, названные *Thermotomicrobium roseum*, оптимальная область роста которых находится при 70—75°, а предел — до 85°.

Изучение структурных и физиолого-биохимических особенностей экстремальных термофилов привело к заключению, что большинство из них, по-видимому, не связано близким родством с нетермофильными изолятами. Выяснение механизмов, обеспечивающих активное существование при высоких температурах, препятствующих в норме росту подавляющего большинства прокариот, представляет несомненный интерес. Проведенные в этом направлении исследования привели к убеждению, что термофилия включает множество молекулярных механизмов и не может быть объяснена только каким-нибудь одним свойством организма. Предложено несколько гипотез для объяснения природы термофилии.

1. Хорошо известна роль липидов в клеточных мембранах. Установлено, что насыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов, имеют более высокую точку плавления по сравнению с ненасыщенными. Уже давно было замечено, что липиды термофилов имеют более высокие температуры плавления, чем липиды мезофилов, что достигается возрастанием содержания насыщенных жирных кислот в мембранах при повышении температуры культивирования. На основании этих данных было высказано предположение, что липиды играют оп-

¹⁰ Недавно появились сообщения об обнаружении бактерий, способных расти при температуре воды 250—300° и давления 255 атм (при этом давлении вода в жидком состоянии может находиться до 460°). Эти бактерии были выделены из проб воды, поднятых с глубины 2560 м над поверхностью Тихого океана, где предположительно они существуют в горячих струях, выбрасываемых на дне океана так называемыми «черными гейзерами». Давление воды в районе обнаружения бактерий около 250 атм, а температура воды может быть выше 350°. В связи с этим исследователи начинают переоценивать границы условий, при которых способны развиваться прокариоты. Высказывается даже предположение, что прокариоты могут существовать везде, где есть вода в жидком состоянии и достаточное количество питательных веществ.

ределенную роль в молекулярных механизмах термофилии, способствуя термостабильности мембран, и что нижняя температурная граница роста термофилов определяется температурой плавления мембранных липидов.

2. Многие исследователи считают, что основная роль в термофилии принадлежит белкам, в первую очередь ферментным. С этих позиций основные температурные точки термофилов зависят от конформации одного или нескольких ключевых ферментов: при минимальной температуре роста происходит переход от жесткой неактивной конформации белковых молекул к конформации с ограниченной гибкостью; оптимальная температура роста определяет наиболее благоприятное конформационное состояние ферментных белков; при максимальной температуре начинаются нарушения конформации белков и снижение их ферментативной активности, а выше этой температуры рост прекращается вследствие тепловой денатурации белков.

3. Одна из гипотез термофилии постулирует термостабильность структурных компонентов клетки термофилов. Оказалось, что клеточная стенка, мембраны, рибосомы термофилов значительно более термостабильны, чем соответствующие структуры мезофилов. Особенно большое внимание в этом плане привлекают клеточные мембраны.

Разобранные выше гипотезы, вероятно, вносят определенный вклад в механизм термофилии, дополняя друг друга, хотя не исключено, что молекулярные механизмы этого явления могут быть значительно шире и для их понимания необходимы дополнительные исследования. В природе нет четкого деления на группы, представленные на рис. 31. Из рисунка видно, что отмеченные на нем оптимальные температурные зоны для разных групп образуют непрерывный ряд температур, а температурные диапазоны, допускающие рост выделенных групп, значительно перекрываются.

Отношение к кислотности среды

Давно известно, что кислотность среды (концентрация водородных ионов, рН) является важным фактором, определяющим возможность существования прокариот. Концентрация ионов водорода в окружающей среде действует на организм прямо (непосредственное воздействие H^+) или косвенно: через влияние на ионное состояние и доступность многих неорганических ионов и метаболитов, стабильность макромолекул, равновесие электрических зарядов на поверхности клетки.

При низких значениях рН растворимость углекислоты, являющейся основным или даже единственным источником углерода для автотрофных прокариот, понижается, а растворимость некоторых ионов, например Cu^{2+} , Mo^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , возрастает и достигает уровней, токсичных для многих прокариот. Наоборот, при высоких значениях рН растворимость многих катионов (Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}), необходимых клетке, резко понижается, они выпадают в осадок и, таким образом, становятся недоступными для организма.

рН влияет на состояние веществ в окружающей среде. Многие нетоксичные в норме органические кислоты в кислой среде находятся в недиссоциированной форме, в которой легко проникают в клетку, становясь токсичными для нее. Концентрация H^+ внешней среды влияет и на равновесие электрических зарядов на поверхности клетки: при низких значениях рН увеличивается суммарный положительный заряд, при высоких — суммарный отрицательный заряд.

В Мировом океане и на большей части суши концентрация водородных ионов поддерживается в довольно узком диапазоне, оптимальном для роста большинства прокариот, предпочитающих нейтральные или слабощелочные условия. Довольно часто встречаются умеренно кислые природные среды, имеющие рН около 3—4. Это многие озера, кислые болота, некоторые истощенные почвы. Среда с более низким рН чрезвычайно редки; рН 3 и ниже имеют обычно терриконы угольных шахт, дренажные воды, рудничные стоки.

К наиболее кислым из природных сред, вероятно, относятся горячие кислые источники и окружающие их горячие кислые почвы, рН которых может достигать 1. Из этих мест были выделены бактерии, являющиеся одновременно термофилами и ацидофилами. Это *Sulfolobus acidocaldarius*, факультативно автотрофная серуокисляющая бактерия, растущая в области рН от 1 до 5,8 (оптимальная область рН — 2—3). Температурный оптимум выше 70°. *S. acidocaldarius* — обитатель горячих кислых источников, расположенных в разных частях земного шара. Другие обитатели таких мест — *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus coagulans*, *Thermoplasma acidophila*. Из тех же мест (области, где температура ниже 55°) выделен и *Thiobacillus thiooxidans*.

Встречающиеся в природе щелочные условия обычно связаны с почвами. Таковы почвы, обогащенные щелочными минералами, экскрементами животных, разлагающимися белками. Щелочная реакция почв может быть результатом полного окисления органического вещества в условиях повышенной аэрации и высокой температуры. В таких почвах рН может достигать 10. Обнаружены также щелочные озера и источники, рН которых 8—11. Из таких мест выделены представители в основном рода *Bacillus*, активно разлагающие белки с выделением аммиака, а также бактерии, восстанавливающие нитрат и сульфат. Цианобактерии обильно растут в природных средах с рН 7,5—10. Для некоторых из них оптимум рН лежит около 10.

В зависимости от отношения к кислотности среды прокариоты могут быть разделены на несколько групп (рис. 32). Оптимальный рН

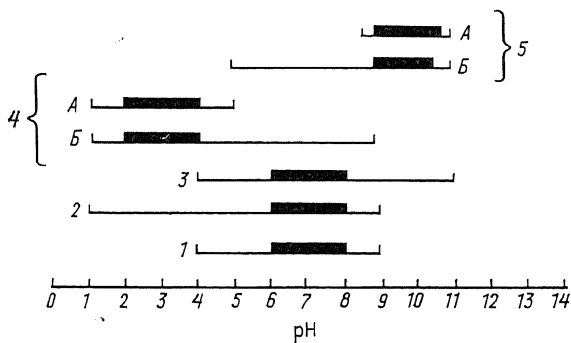


Рис. 32. Границы и оптимальные зоны роста прокариот в зависимости от рН и основанная на этом их классификация.

Нейтрофилы (1); группы кислотоустойчивых (2) и щелочеустойчивых (3) прокариот; ацидофилы (4) и алкалофилы (5). Облигатные (А) и факультативные (Б) формы. Жирной линией выделен оптимальный рН роста

для роста подавляющего большинства прокариот, называемых нейтрофилами, — область, близкая к нейтральной, а рост возможен, как правило, в диапазоне от 4 до 9, считающемся нормальным. Типичными нейтрофилами являются разные штаммы *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, *Streptococcus faecalis*. Предельные обнаруженные границы рН для роста представителей мира прокариот приблизительно от 1 до 11. Хотя многие способны расти или выживать при значениях рН, лежащих за пределами нормального диапазона, оптимум их роста

обычно находится внутри этого диапазона. Такие прокариоты считаются кислото- или щелочеустойчивыми (толерантными). К кислотоустойчивым относятся многие бактерии, продуцирующие органические кислоты, например, уксуснокислые, молочнокислые и др. Щелочетолеранты многие из энтеробактерий, устойчивые к величинам рН, близким к 9—10.

У некоторых видов адаптация к кислотности среды привела к тому, что оптимум рН для роста переместился в кислую (рН 4 и ниже) или щелочную (рН от 9 и выше) зону. Такие прокариоты названы ацидофильными или алкалофильными (кислото- или щелочелюбивыми) соответственно. Среди обеих групп выделяют облигатные формы, потерявшие способность расти в нейтральной области, и факультативные, сохранившие эту способность. Типичным представителем облигатных ацидофилов служат бактерии рода *Thiobacillus*. Из алкалофилов к облигатным можно отнести некоторых представителей рода *Bacillus*.

Естественно, что способность к росту при низких или высоких значениях рН обеспечивают организму определенные преимущества, так как в этих условиях резко ограничена конкуренция со стороны других организмов.

До настоящего времени неизвестно, каков механизм (или механизмы), обеспечивающий стабильность клеток и возможность их активного размножения при высоких и низких значениях кислотности среды. Естественно, что наиболее совершенными такие механизмы должны быть у облигатных ацидо- и алкалофилов. Для первых показано, что они не просто переносят высокие концентрации H^+ , но нуждаются в них для роста и стабильности. Например, *Thermoplasma acidophila* лизируется при рН выше 5. В то же время все измерения внутриклеточного рН, проведенные у представителей групп облигатных ацидо- и алкалофилов, не оставляют сомнений в том, что он не соответствует рН внешней среды и находится в нейтральной области. Прокариоты, растущие при экстремальных значениях рН, выработали разные механизмы для поддержания внутриклеточного рН в нейтральной области. Облигатно ацидофильная *Thermoplasma acidophila*, например, поддерживает градиент рН, составляющий 4,5 единицы, вероятно, за счет непроницаемости ЦПМ для ионов H^+ (клеточная стенка у этого организма полностью отсутствует). У других прокариот дополнительно к ЦПМ таким барьером служит клеточная стенка. У ряда ацидофилов трансмембранный градиент рН поддерживается благодаря активным метаболическим процессам, в основе которых лежат связанные с мембраной механизмы энергозависимого выталкивания ионов водорода. Аналогичные механизмы удаления ионов OH^- предполагаются у облигатно алкалофильных организмов.

Таким образом, основными барьерами на пути высоких концентраций H^+ и OH^- внешней среды у облигатных ацидо- и алкалофилов служат клеточная стенка и ЦПМ. Поиски особенностей строения и функционирования этих клеточных структур не привели пока к расшифровке конкретных механизмов их устойчивости к высоким концентрациям H^+ и OH^- . Неизвестно также, почему облигатные ацидофилы и алкалофилы потеряли способность расти в нейтральной среде, т. е. почему высокие концентрации этих ионов стали для них совершенно необходимыми.

Среди облигатных ацидофилов четко выделяются две физиологические группы. К первой относятся организмы, растущие в кислой среде при умеренных температурах (мезофильные ацидофилы); в эту

группу входят представители рода *Thiobacillus*. Вторую группу образуют термофильные ацидофилы, в первую очередь *Bacillus acidocaldarius*, *Sulfolobus acidocaldarius* и *Thermoplasma acidophila*. Изучение структуры и химического состава клеточной стенки и мембран тиобацилл показало, что они имеют тонкое строение, типичное для грам-отрицательных прокариот. У тиобацилл не обнаружено каких-либо определенных структур или химических компонентов, ответственных за ацидофилию.

Среди термофильных ацидофилов наблюдается значительное разнообразие в строении и химическом составе клеточной стенки и мембран. Например, у *Bacillus acidocaldarius* клеточная стенка построена из типичного пептидогликана, а у *Sulfolobus acidocaldarius* состоит из регулярно расположенных на клеточной поверхности белковых субъединиц, прочно связанных с ЦПМ; пептидогликана в составе клеточной стенки не обнаружено. У *Thermoplasma acidophila* вообще нет клеточной стенки.

В мембранах термофильных ацидофилов обнаружены липиды необычного химического строения. У *Bacillus acidocaldarius* — это жирные кислоты, содержащие циклические группировки; у *Sulfolobus acidocaldarius* и *Thermoplasma acidophila* — сложные липиды, в состав которых входят чрезвычайно длинные углеводородные цепи (C₄₀). Кроме того, у двух последних организмов фосфолипиды представлены исключительно в виде углеводов производных — фосфогликолипидов. Исключительный интерес в этом плане представляет *Thermoplasma acidophila*, ЦПМ которой, непосредственно контактирующая с внешней средой (горячей и кислой), отличается необычайной прочностью: не разрушается при нагревании почти до 100°, обработке неионными детергентами, некоторыми ферментами, ультразвуком. Считается, что мембрана *T. acidophila* наиболее жесткая из всех известных клеточных мембран. В мембранных белках этого организма не найдено необычных аминокислот. Отмечено только резко сниженное количество полярных групп, обуславливающее гидрофобную природу ЦПМ.

Обнаруженные у термофильных ацидофилов особенности в химическом строении мембран нельзя, однако, прямо связать со свойством ацидофильности этих организмов, так как они одновременно находятся под двойным стрессовым воздействием (температуры и кислотности среды), тем более, что их мезофильные аналоги (представители рода *Thiobacillus*) имеют довольно типичный химический состав клеточной стенки и мембран.

У облигатных алкалофилов пока также не обнаружено каких-либо особенностей в строении и химическом составе их клеточных стенок и ЦПМ, объясняющих не только устойчивость к высоким концентрациям ионов OH⁻, но и абсолютную потребность в них.

Таким образом, в настоящее время с уверенностью можно сказать, что облигатные ацидо- и алкалофилы должны удалять из клеток ионы H⁺ или OH⁻, поддерживая внутриклеточный pH в нейтральной области. В поддержании градиента между внутри- и внеклеточным pH участвуют, вероятно, как метаболические процессы (протонные или анионные насосы), так и клеточные барьеры (клеточная стенка и ЦПМ), особенности строения которых обеспечивают в конечном итоге устойчивость этих организмов к экстремальным величинам pH.

Регуляция клеточного метаболизма у прокариот

Примерно до середины 50-х гг. основные усилия биохимиков были направлены на выяснение различных компонентов клеточного метаболизма. Вопрос о том, как сочетаются между собой многочисленные метаболические реакции, привлекал мало внимания. Позднее пришло понимание того, что последовательности биохимических реакций функционально связаны между собой и взаимно регулируются. Полученные к настоящему времени данные дают ясное представление о том, что над основными метаболическими функциями клетки надстроена эффективная и сложная система регуляции.

В интактной клетке практически все протекающие метаболические процессы регулируются. Одна и та же реакция может одновременно подвергаться нескольким видам регуляторного воздействия, неравноценным по направлению и силе действия. Следствием этого является строгая координация активности отдельных метаболических процессов, приводящая к тому, что любой организм в норме представляет собой хорошо отлаженное устройство с системой развитых регуляторных связей. Эффективность клеточных регуляторных механизмов очень высока. Именно они обеспечивают максимально экономичное использование питательных веществ среды, предупреждают избыточный синтез промежуточных и конечных метаболитов, отвечают за быструю адаптацию к изменившимся условиям среды. Следовательно, клетка в зависимости от конкретных условий должна быть способна уменьшать или увеличивать скорость синтеза определенных метаболитов или скорость образования клеточной энергии.

Поскольку практически все реакции в клетке катализируются ферментами, регуляция метаболизма сводится к регуляции интенсивности ферментативных реакций. Скорость последних может регулироваться двумя основными способами: путем изменения количества ферментов и/или изменения их активности, т. е. степени использования их каталитического потенциала.

Регуляция активности ферментов

Факторы, регулирующие активность ферментов, разнообразны по своей природе (рис. 33). Физические факторы (температура, давление, свет, магнитное поле, электрические импульсы) оказывают менее специфическое действие, чем химические. В свою очередь действие последних также может быть разделено на несколько типов. Одни из химических веществ связываются с активным центром фермента, например субстраты, кофакторы, конкурентные ингибиторы, что приводит к изменению ферментативной активности. Другие — взаимодействуют со специальными участками на поверхности молекулы определенного типа ферментов, не имеющими непосредственного отношения к центрам каталитической активности, но тем не менее приводящими к ее изменению.

Наконец, активность некоторых ферментов регулируется путем химической модификации их молекулы, в основе которой лежит ковалентное обратимое связывание с ферментом определенной группировки, что приводит к изменению его ферментативной активности. У прокариот известны две ферментные системы, активность которых регулируется таким путем. Глутаминсинтетаза *E. coli*, катализирующая синтез глутамина, существует в двух формах, различающихся присутствием в одной из них остатка адениловой кислоты. Присоединение

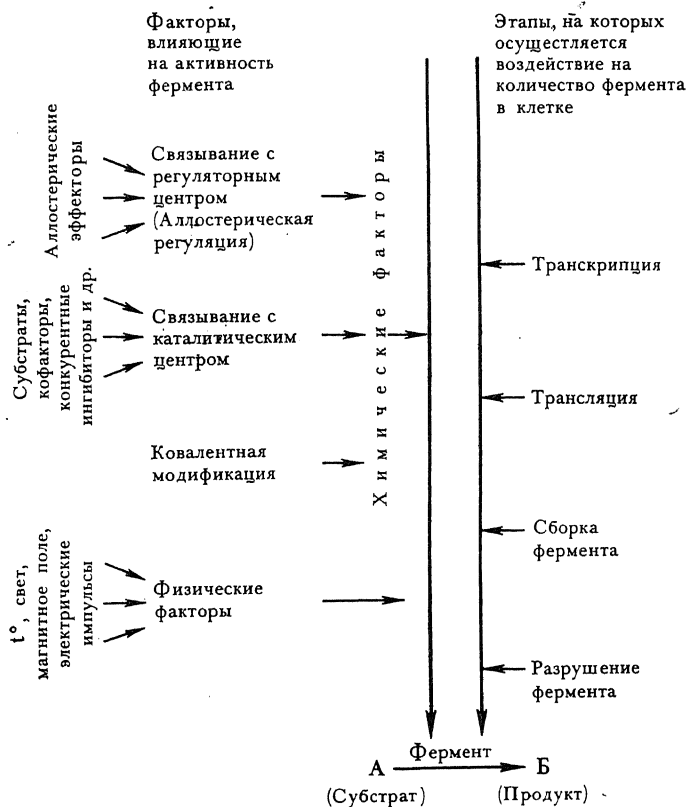
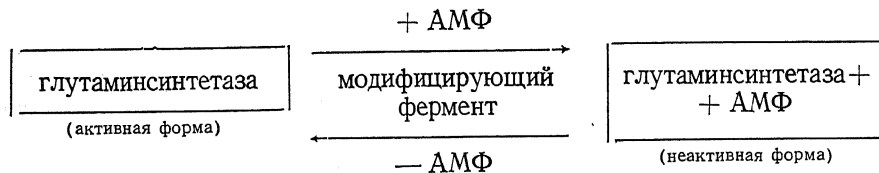


Рис. 33. Схематическое изображение регуляторных воздействий на уровень клеточных метаболитов (продуктов)

его с помощью ковалентной связи, катализируемое соответствующим модифицирующим ферментом, приводит к образованию менее активной аденилированной формы глутаминсинтетазы:



Удаление адениловой группы, ведущее к возникновению деаденилированной формы фермента, резко повышает его каталитическую активность. Аналогичный механизм регулирования активности фермента путем присоединения и удаления остатка уксусной кислоты (ацетилирование — деацетилирование) обнаружен для цитратлиазы у фотосинтезирующей бактерии *Rhodospseudomonas gelatinosa*. В этом случае активна ацетилированная форма фермента.

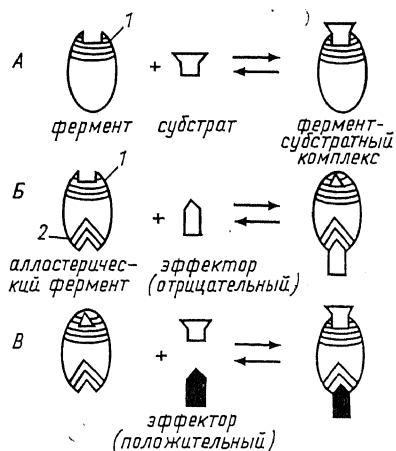
Наиболее быстрым, точным и тонким механизмом регуляции активности ферментов является регуляция, которой подвергается определенный тип ферментов, получивших название аллостерических. Эти ферменты, как правило, занимают ключевые позиции в обмене веществ, располагаясь в «стратегических» пунктах клеточного метаболизма — в начале метаболических путей или в местах разветвлений, где расходятся или сходятся несколько путей. Аллостерические фер-

менты «чувствуют» потребность клетки в конечных продуктах данного метаболического пути, и, если продукта синтезируется, например, больше, чем необходимо, он обычно ингибирует активность первого фермента своего биосинтетического пути. Термин «аллостерическое ингибирование» был введен в 1961 г. Ж. Моно и Ф. Жакобом, чтобы подчеркнуть особенность данного типа регуляции, заключающуюся в том, что ингибитор, взаимодействующий с ферментом, структурно отличается от его субстрата.

Аллостерические ферменты — белки с высокой молекулярной массой, состоящие из нескольких субъединиц одного или разного типа. В первом случае каждая субъединица содержит каталитический и регуляторный (аллостерический) центры. Во втором — одни субъединицы обладают каталитической активностью, другие выполняют регуляторную функцию. Таким образом, каталитический и регуляторный центры в молекуле аллостерического фермента пространственно разобщены, но функционально они тесно взаимосвязаны. Каталитическая активность аллостерического фермента меняется в результате связывания с его регуляторным центром определенных метаболитов, называемых эффекторами, реже модуляторами, или модификаторами. Кроме конечных продуктов данного пути, эффекторами могут быть 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.

Вещества, действующие на аллостерические ферменты в качестве эффекторов, по своим химическим свойствам часто совершенно не сходны с субстратами, продуктами или кофакторами регулируемых ими ферментативных реакций. Однако на поверхности аллостерических ферментов имеются участки, обладающие сродством к эффекторам: это аллостерические центры. Вероятно, вначале эти белки выполняли только каталитическую функцию. Способность подвергаться регуляции возникла позднее. Нетрудно представить, что это свойство намного увеличило эффективность функционирования таких ферментов.

Детально механизм аллостерического регулирования до настоящего времени не выяснен, однако известно, какие этапы ферментатив-



ной реакции особенно удобны для регулирования. Оказалось, что во всех изученных случаях регуляторное воздействие связано с начальным этапом реакции — образованием фермент-субстратного комплекса. Связывание эффектора с аллостерическим центром приводит к изменению сродства фермента к субстрату в результате какого-то конформационного изменения фермента, происходящего на уровне его третичной структуры (рис. 34).

Наиболее простой случай аллостерической регуляции — регуляция первого фермента разветвленного биосинтетического пути его конечным продуктом. Если конечный продукт накапливается в избытке, он подавляет активность первого фермента в процессе, называемом ретроингибированием, или ингибированием по принципу обратной связи. Примером такого типа регулирования является ингибирование биосинтеза L-изолейцина. Превращение L-треонина в L-изолейцин включает пять ферментативных реакций (рис. 35). Первый фермент на пути синтеза L-изолейцина L-треониндезаминаза является аллостерическим и ингибируется только L-изолейцином. На поверхности молекулы треониндезаминазы имеются два вида участков: каталитический — для связывания субстрата (L-треонина) и регуляторный — для связывания эффектора (L-изолейцина). Для разветвленных путей биосинтеза (а к таким относится большинство биосинтетических путей) механизмы регуляции по принципу ретроингибирования усложняются, так как от активности первого фермента зависит биосинтез нескольких конечных продуктов. Очевидно, что механизмы регулирования в этом случае должны быть видоизменены таким образом, чтобы перепроизводство одного конечного продукта не приводило к прекращению синтеза других связанных с ним конечных продуктов. Выработалось несколько модификаций механизмов контроля по принципу обратной связи применительно к разветвленным биосинтетическим путям. Эти модификации сводятся к тому, что в регулировании каталитической активности аллостерического фермента, связанного с несколькими биосинтетическими путями, принимают участие все конечные продукты этих путей. В том случае, если первый этап биосинтетического пути катализируется одним ферментом, на поверхности молекулы этого фермента имеются различные аллостерические центры, с каждым из которых связывается один из конечных продуктов, выполняющих функцию эффектора.

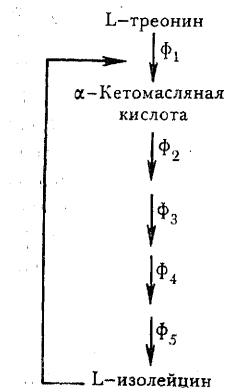


Рис. 35. Регуляция биосинтеза L-изолейцина по механизму отрицательной обратной связи:

φ₁ — треониндезаминаза; φ₂—φ₅ — ферменты, катализирующие промежуточные стадии биосинтеза L-изолейцина. Стрелкой показано ингибирование треониндезаминазы L-изолейцином

φ₁ — треониндезаминаза является аллостерическим и ингибируется только L-изолейцином. На поверхности молекулы треониндезаминазы имеются два вида участков: каталитический — для связывания субстрата (L-треонина) и регуляторный — для связывания эффектора (L-изолейцина). Для разветвленных путей биосинтеза (а к таким относится большинство биосинтетических путей) механизмы регуляции по принципу ретроингибирования усложняются, так как от активности первого фермента зависит биосинтез нескольких конечных продуктов. Очевидно, что механизмы регулирования в этом случае должны быть видоизменены таким образом, чтобы перепроизводство одного конечного продукта не приводило к прекращению синтеза других связанных с ним конечных продуктов. Выработалось несколько модификаций механизмов контроля по принципу обратной связи применительно к разветвленным биосинтетическим путям. Эти модификации сводятся к тому, что в регулировании каталитической активности аллостерического фермента, связанного с несколькими биосинтетическими путями, принимают участие все конечные продукты этих путей. В том случае, если первый этап биосинтетического пути катализируется одним ферментом, на поверхности молекулы этого фермента имеются различные аллостерические центры, с каждым из которых связывается один из конечных продуктов, выполняющих функцию эффектора.

Далее возможны следующие варианты: 1. Каждый конечный продукт (эффектор) по отдельности, связавшись со «своим» аллостерическим центром, не меняет активности фермента. Для ингибирования ферментативной активности необходимо связывание с аллостерическими центрами всех конечных продуктов. Этот вид ингибирования получил название мультивалентного ингибирования. 2. Каждый конечный продукт, связанный со «своим» аллостерическим центром, вызывает частичное ингибирование активности фермента. Одновременное присутствие всех конечных продуктов приводит к возраста-

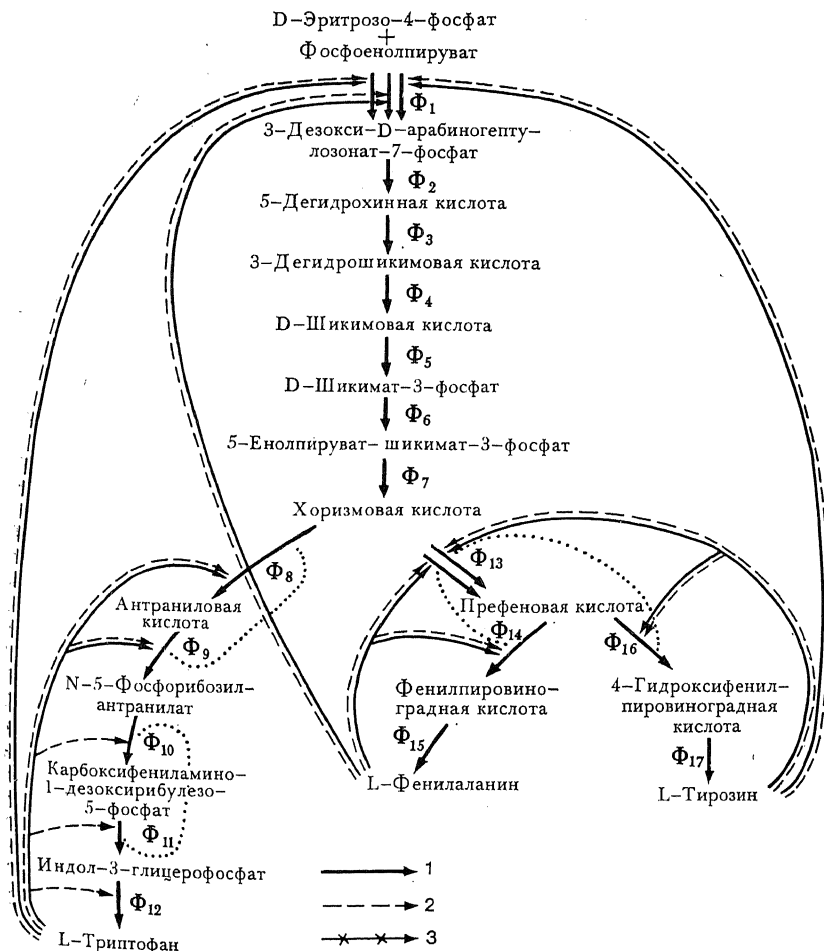
нию ингибирующего эффекта. Таким образом, конечные продукты в этом случае действуют независимо друг от друга. Такое ингибирование получило название кумулятивного, или аддитивного. В некоторых разветвленных биосинтетических путях ингибирование первого фермента осуществляется не конечными продуктами каждой из ветвей, а промежуточным продуктом, образующимся непосредственно перед разветвлением. Накопление его в свою очередь контролируется конечными продуктами. Такой вид ингибирования назвали последовательным.

Исследования последних лет выявили существование некоторых аллостерических ферментов в виде нескольких молекулярных форм (изоферментов). Изоферменты катализируют одну и ту же реакцию, т. е. являются изофункциональными, но обладают разными регуляторными свойствами. Это связано с тем, что изоферменты имеют одинаковые каталитические, но разные регуляторные центры. Каждый изофермент кодируется отдельным геном. Часто гены, детерминирующие изоферменты, локализованы в разных местах (локусах) бактериальной хромосомы. Существование изоферментов позволяет конечным продуктам независимо друг от друга ингибировать активность определенного изофермента, так как каждый изофермент индивидуально контролируется «своим» конечным продуктом. Регулирование ферментативной активности при помощи изоферментов — наиболее совершенный регуляторный механизм в разветвленных биосинтетических путях. Считается, что появление изоферментов — эволюционно более позднее приспособление механизма ретроингибирования применительно к сложно регулируемым биосинтетическим путям.

Примеры ингибирования перечисленных выше типов можно найти при изучении регуляции синтеза ароматических аминокислот (триптофана, тирозина, фенилаланина) у *E. coli* и *Bacillus subtilis* (рис. 36). Путь биосинтеза ароматических аминокислот у разных представителей мира прокариот в настоящее время изучен обстоятельно. Установлены все реакции и ферменты, их катализирующие, идентифицированы все промежуточные соединения. Это дало основание заключить, что у прокариот этот путь одинаков. Различия обнаружены в структуре ферментов, катализирующих отдельные реакции пути, и в механизмах контроля.

Общая часть пути синтеза ароматических аминокислот включает семь ферментативных реакций. Местом разветвления служит хормовая кислота, от которой отходят ветви, ведущие к синтезу ароматических аминокислот, витаминов (*para*-аминобензойная кислота, витамин К и др.) и других соединений (убихиноны). Особенности ферментов синтеза ароматических аминокислот состоят в наличии изоферментов и мультиферментных комплексов, катализирующих более чем одну реакцию.

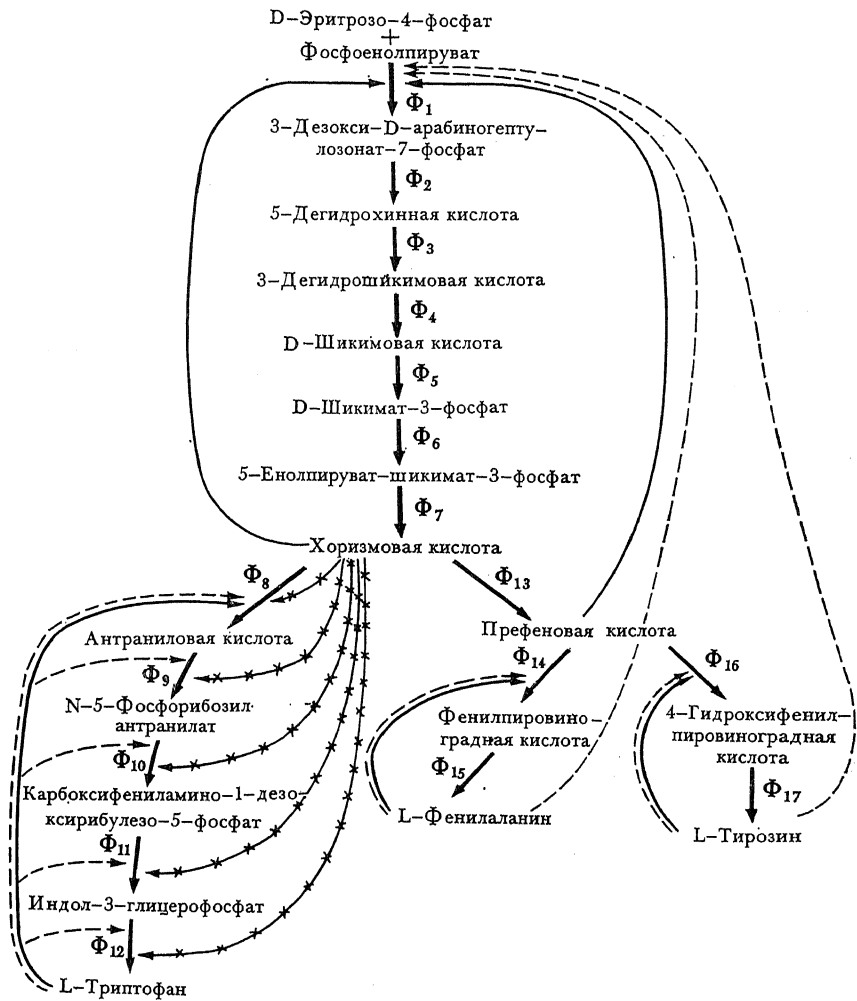
Первый фермент общего отрезка пути синтеза ароматических аминокислот — аллостерический фермент 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтетаза (ДАГФ-синтетаза), катализирующий реакцию конденсации фосфоенолпирувата и эритрозо-4-фосфата. У *E. coli* эта реакция катализируется тремя изоферментами, каждый из которых ингибируется определенной аминокислотой. У *Bac. subtilis* ДАГФ-синтетаза в клетке присутствует в одной форме и находится под эффективным ингибиторным контролем двух промежуточных метаболитов пути биосинтеза ароматических аминокислот — хормовой и префеновой кислот, действие которых на ДАГФ-синтетазу кумулятивно. Механизм ингибирования этого фермента у *Bac. subtilis* можно опре-



А

Рис. 36. Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот у *E. coli* (А) и *Bac. subtilis* (Б). Изображены только основные регуляторные связи. Ферменты биосинтеза ароматических аминокислот: Φ₁ — 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтаза (ДАГФ-синтаза); Φ₂ — дегидрохиннатсинтаза; Φ₃ — 5-дегидрохиннатдегидратаза; Φ₄ — шикиматдегидрогеназа; Φ₅ — шикиматкиназа; Φ₆ — шикимат-5-енолпируват-3-фосфатсинтаза; Φ₇ — хоризматсинтаза; Φ₈ — антранилатсинтаза; Φ₉ — фосфорибозилтрансфераза; Φ₁₀ — фосфорибозилантранилатизомераза; Φ₁₁ — индогллицерофосфатсинтаза; Φ₁₂ — триптофансинтаза; Φ₁₃ — хоризматмутаза; Φ₁₄ — префенатдегидратаза; Φ₁₅ — фенилаланинамино-трансфераза; Φ₁₆ — префенатдегидрогеназа; Φ₁₇ — тирозинаминотрансфераза. 1 — ингибирование; 2 — репрессия; 3 — индукция. Параллельными стрелками обозначены изоферменты, пунктиром — ферментные комплексы

делить как последовательное ингибирование: триптофан ингибирует антранилатсинтазу, что ведет к накоплению хоризмовой кислоты, фенилаланин и тирозин ингибируют префенатдегидратазу и префенатдегидрогеназу соответственно, в результате накапливается префеновая кислота; хоризмовая и префеновая кислоты, достигнув пороговых концентраций, подавляют активность ДАГФ-синтазы. Для ингибирования ДАГФ-синтазы у *Bac. subtilis* необходим, таким образом, высокий уровень промежуточных продуктов пути биосинтеза ароматических аминокислот.



Путь, ведущий к биосинтезу триптофана от хоризмовой кислоты, состоит из пяти ферментативных реакций (рис. 36). У *Vac. subtilis* ферменты, катализирующие эти реакции, не образуют мультиферментных комплексов, а у *E. coli* показано образование двух комплексов, состоящих из первого+второй и третьего+четвертый ферментов триптофанового пути. Аллостерический фермент триптофанового пути у *Vac. subtilis* — антранилагсинтетаза, ингибируемая триптофаном, а у *E. coli* аллостерической регуляции подвергается мультиферментный комплекс, состоящий из антранилагсинтетазы и фосфорибозилтрансферазы.

Путь биосинтеза тирозина и фенилаланина начинается от хоризмовой кислоты, из которой образуется префеновая кислота. Катализирует эту реакцию хоризматмутаза. Превращение хоризмовой кислоты в префеновую — единственный общий для синтеза тирозина и фенилаланина этап. У *E. coli* хоризматмутаза существует в виде двух изоферментов, один из которых тесно связан со следующим ферментом пути синтеза фенилаланина — префенатдегидратазой, другой — со следующим ферментом «тирозинового» пути — префенатдегидрогена-

зой. Изучение природы взаимосвязи между изоферментами хоризматмутазы и следующими ферментами, метаболизирующими префеновую кислоту, привело к заключению, что они объединены в белковые комплексы. Образующие комплекс ферменты находятся под ингибиторным контролем конечного продукта «своего» биосинтетического пути.

У *Vac. subtilis* в отличие от *E. coli* хоризматмутаза не образует комплексов со следующими ферментами. Более того, она не является аллостерическим ферментом. К регулируемым ферментам *Vac. subtilis* относятся первые ферменты индивидуальных путей биосинтеза тирозина и фенилаланина.

Итак, аллостерическими ферментами, осуществляющими контроль биосинтеза ароматических аминокислот по механизму ретроингибирования, являются ферменты, расположенные в начале общего пути биосинтеза ароматических соединений, в начале отдельных биосинтетических путей или же структурно связанные с первыми ферментами в мультиферментные комплексы.

Регуляция синтеза ферментов

Регулирование конечным продуктом активности аллостерического фермента определенного биосинтетического пути обеспечивает мгновенную реакцию, приводящую к изменению выхода этого продукта. Если последний оказывается ненужным, отпадает надобность и в ферментах, участвующих в его синтезе. Проявлением максимальной экономичности клеточного метаболизма служат выработанные клеткой механизмы, регулирующие ее ферментативный состав. Очевидна целесообразность синтеза только тех ферментов, которые необходимы в данных физиологических условиях. Показано, что у прокариот в одних условиях фермент может содержаться в количестве не более 1—2 молекул, в других — составлять несколько процентов от клеточной массы.

Количество определенного фермента в клетке может регулироваться на нескольких уровнях: на этапе транскрипции, трансляции, а также в процессе сборки и разрушения ферментного белка (см. рис. 33). В иерархии регуляторных воздействий наиболее сложный механизм, контролирующей количество ферментов в клетке, связан с процессом транскрипции. Специфические химические сигналы могут инициировать или блокировать транскрипцию определенного участка ДНК в информационную РНК (иРНК). В случае индукции образованная иРНК участвует в определенной последовательности реакций, называемой трансляцией и заканчивающейся синтезом полипептидных цепей. Регуляция белкового синтеза на уровне трансляции может осуществляться на любом из его этапов, например, на этапе инициации, элонгации и др. Не исключена также возможность изменения времени жизни иРНК под воздействием разных эффекторов, в том числе конечных продуктов метаболических путей. Хотя механизмы регуляции синтеза белка на уровне трансляции еще точно не установлены, ясно, что на этом этапе имеются широкие возможности для регуляции скорости синтеза различных белков.

Известно, что фермент может выполнять метаболическую функцию после приобретения соответствующей структуры. Скорость образования структур высшего порядка также находится под контролем определенных молекул. Таким образом, контроль на уровне сборки функционально активного фермента может играть существенную роль в метаболической регуляции. Наконец, скорость разрушения фермента

под воздействием специфических метаболических сигналов будет также определять его концентрацию в клетке.

Регуляция синтеза ферментов на этапе транскрипции основана на том, что «считывание» бактериальных генов происходит избирательно и скорость образования копий соответствующих иРНК (а отсюда и дальнейшая их трансляция в белки) находится под сложным контрольным механизмом. Скорость синтеза ферментов, определяемая этой стадией, может меняться в разной степени. По данному признаку все ферменты делятся на два класса. Ферменты, синтез которых в растущей клетке происходит с постоянной скоростью в результате постоянного транскрибирования соответствующих генов и, следовательно, они присутствуют в клетке всегда в более или менее постоянной концентрации, называются конститутивными. К ним относятся, например, гликолитические ферменты. Метаболические пути, функционирующие с участием конститутивных ферментов, контролируются посредством других регуляторных воздействий, например аллостерического ингибирования.

Кроме этого, в бактериальных клетках имеются ферменты, количества которых могут резко меняться в зависимости от состава питательных веществ среды. Это происходит в результате того, что гены, детерминирующие эти ферменты, включаются или выключаются по мере надобности. Их называют индуцибельными. При отсутствии в среде субстратов этих ферментов последние содержатся в клетке в следовых количествах. Если же в среду добавить вещество, служащее субстратом определенного фермента, происходит быстрый синтез этого фермента в клетке, т. е. имеет место индукция синтеза фермента. Если же в питательной среде в готовом виде содержится вещество, являющееся конечным продуктом какого-либо биосинтетического пути, происходит быстрое прекращение синтеза ферментов этого пути. Это явление получило название репрессии конечным продуктом. Ферменты, синтез которых подавляется конечным продуктом, могут быть дерепрессированы, т. е. скорость их синтеза превысит обычную, если концентрация конечного продукта упадет до очень низкого уровня. Дерепрессия этих ферментов аналогична явлению индукции.

Репрессия конечным продуктом. Все биосинтетические пути находятся под контролем механизма репрессии конечным продуктом. Точно так же образование большинства анаболических ферментов регулируется путем репрессии их синтеза. Репрессия осуществляется особыми присутствующими в клетке веществами — репрессорами. Факторами, модифицирующими активность репрессоров, могут быть конечные продукты биосинтетических путей, а также промежуточные продукты некоторых катаболических или амфиболических путей.

Репрессия может быть координированной, т. е. синтез каждого фермента данного пути в одинаковой степени подавляется конечным продуктом. Часто синтез ферментов одного пути репрессируется в разной степени. В разветвленных биосинтетических путях механизмы репрессии могут быть модифицированы (так же, как и механизмы ингибирования) для того, чтобы лучше обеспечить регуляцию нескольких конечных продуктов из общего исходного субстрата. Синтез многих ферментов в таких путях репрессируется только при совместном действии всех конечных продуктов. Такой вид репрессии называется мультивалентным. Если реакция на общем участке разветвленного пути катализируется изоферментами, синтез каждого из них находится под контролем «своего» конечного продукта.

Вернемся к рассмотрению регуляции пути биосинтеза ароматических аминокислот у *E. coli* и *Bac. subtilis* (см. рис. 36). ДАГФ-синтетазы, которая у *E. coli* присутствует в виде трех аллостерических изоферментов, кроме ретроингибирования находится также под репрессорным контролем. Синтез трех изоферментов ДАГФ-синтетазы у *E. coli* контролируется некоординированно, т. е. максимальные репрессуемые и дерепрессуемые уровни каталитической активности для трех изоформ различны. Такое отсутствие координации вполне объяснимо, поскольку известно, что гены, кодирующие изоферменты ДАГФ-синтетазы, разбросаны по хромосоме и каждый ген находится под своим регуляторным контролем. В результате общая активность фермента есть сумма активностей трех изоферментов, каждый из которых находится под двойным контролем (ингибирование+репрессия) определенной аминокислоты. Репрессии других ферментов общего ароматического пути у *E. coli* не обнаружено. У *Bac. subtilis* единственная ДАГФ-синтетаза значительно репрессуется тирозином, но максимальная репрессия наблюдается в присутствии фенилаланина+тирозин. У *Bac. subtilis*, *E. coli* и других бактерий гены, детерминирующие синтез триптофановых ферментов, образуют оперон и поэтому ферменты триптофанового пути у этих организмов координированно репрессуются триптофаном. У *Bac. subtilis* хориновая кислота индуцирует синтез антранилатсинтетазы, фосфорибозилтрансферазы, а также, возможно, синтез всех остальных ферментов триптофанового пути. Синтез изоферментов хоризматмутазы и промежуточных ферментов тирозинового и фенилаланинового пути *E. coli* репрессуется конечными продуктами каждого пути. У *Bac. subtilis* на ингибирование первых ферментов индивидуальных путей биосинтеза тирозина и фенилаланина накладывается также репрессия этих ферментов.

Механизм репрессии конечным продуктом на уровне транскрипции стал проясняться с 50-х гг. Большой вклад в это внесли работы Ф. Жакоба и Ж. Моно. Было показано, что наряду со структурными генами, кодирующими синтез ферментов, в бактериальном геноме существуют специальные регуляторные гены. Один из них — ген-регулятор (ген R), функция которого заключается в регуляции процесса транскрипции структурного гена (или генов). Ген-регулятор кодирует синтез специфического белка — репрессора. Репрессор — аллостерический белок, имеющий два центра связывания: один центр узнает определенную последовательность нуклеотидов на участке ДНК, называемом оператором (ген O), другой — взаимодействует с эффектором. Ген-оператор расположен рядом со структурным геном (генами) и служит местом связывания репрессора. В отличие от операторных генов гены-регуляторы расположены на некотором расстоянии от структурных генов (продукты регуляторных генов — репрессоры являются свободно диффундирующими белковыми молекулами).

Часто структурные гены, относящиеся к одному биохимическому пути, объединены в группу, составляющую вместе с оператором единицу транскрипции и регуляции — оперон. Все структурные гены, объединенные в оперон, имеют один операторный участок, локализованный на краю оперона, и координированно регулируются одним репрессором. Оперон представляет собой весьма рациональную и эффективную систему регуляции метаболического пути.

Процесс транскрипции начинается с прикрепления РНК-полимеразы, катализирующей синтез иРНК, к определенному участку ДНК, называемому промотором (P). Когда молекула репрессора «садится» на операторный участок, она «закрывает» промотор, тем самым пре-

пятствуя связыванию с ним РНК-полимеразы и началу транскрипции. У прокариот пять генов, кодирующих синтез ферментов триптофанового пути, образуют оперон (рис. 37). Ген-регулятор обеспечивает синтез аллостерического белка — триптофанового репрессора, неактивного в свободном состоянии. Последний в таком виде не связывается с операторным участком и не может, таким образом, препятствовать

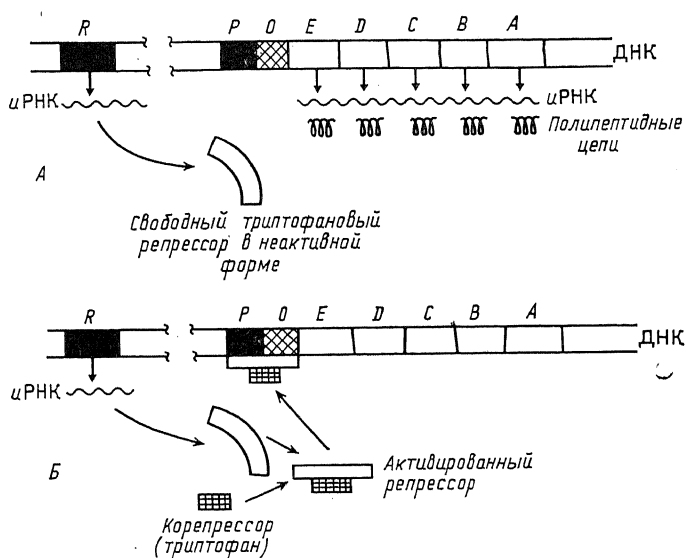


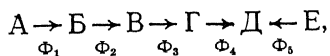
Рис. 37. Схематическое изображение триптофанового оперона *E. coli* и механизма репрессии конечным продуктом. А. — Продукт гена-регулятора (R) — неактивная форма репрессора, неспособная связываться с оператором (O); промоторный участок (P) открыт: происходит транскрипция структурных генов (E, D, C, B, A). Б. В присутствии корепрессора образуется активный комплекс корепрессор—репрессор, связывающийся с оператором и закрывающий промотор; транскрипции не происходит (по Lehninger, 1974)

началу транскрипции. Когда конечный продукт метаболического пути — триптофан накапливается выше определенного уровня, он взаимодействует с репрессором и активирует его. Активированный репрессор присоединяется к операторному участку и подавляет транскрипцию триптофанового оперона. Таким образом, триптофан является корепрессором. Гены, кодирующие синтез структурных ферментов одного метаболического пути, могут быть локализованы в разных местах бактериальной хромосомы. В этом случае синтез этих ферментов может регулироваться разными репрессорами, т. е. у каждого структурного гена будет «свой» ген-регулятор, продукт которого и будет взаимодействовать с продуктом метаболического пути, служащим корепрессором. Возможно также, что, несмотря на «разбросанность» по хромосоме структурных генов, кодирующих ферменты одного метаболического пути, эти гены регулируются одним репрессором. Для обозначения такого типа организации генов предложен термин «регулон». Примером могут служить гены, кодирующие у *E. coli* ферменты биосинтеза аргинина. Хотя они локализованы в разных местах хромосомы, их репрессия осуществляется одним и тем же репрессором, активируемым аргинином.

Индукция синтеза ферментов. Уже при изучении регуляции био-

синтеза ароматических аминокислот у *Bac. subtilis* был отмечен индуцирующий эффект хоризмовой кислоты на синтез ферментов триптофанового пути (см. рис. 36, Б). Однако в большинстве случаев регуляция путем индукции характерна для катаболических путей, где в качестве индукторов выступают обычно субстраты этих путей. Классический пример индуцибельного фермента — β -галактозидаза *E. coli*. Оказалось, что если клетки *E. coli* выращивать в среде, содержащей глюкозу, то они не могут использовать лактозу. Если такие клетки поместить в среду, где лактоза — единственный источник углерода, после некоторого периода в них происходит интенсивный синтез фермента β -галактозидазы, катализирующего гидролиз лактозы на D-глюкозу и D-галактозу. С помощью этого фермента *E. coli* может теперь использовать лактозу в качестве единственного источника углерода. Если затем клетки, растущие на среде с лактозой, перенести на среду с глюкозой, синтез β -галактозидазы прекращается.

Изучение индукции β -галактозидазы у *E. coli* позволило установить, что рост клеток на среде с лактозой происходит не в результате отбора мутантов, у которых способность использовать лактозу есть следствие мутации. Способностью синтезировать этот фермент обладают все клетки. Было также показано, что в процессе индукции происходит не активирование уже имевшегося в клетках фермента β -галактозидазы, а его синтез de novo из аминокислот. Описано несколько типов индукции. Использование субстрата идет через серию ферментативных реакций, которые можно представить схематически следующим образом:



где B, V, Γ , D — промежуточные продукты пути превращения исходного субстрата A в конечный продукт E; Φ_1 — Φ_5 — ферменты, катализирующие отдельные этапы катаболизма исходного субстрата.

1. Исходный субстрат A служит индуктором всех ферментов данного пути, следствием чего будет одновременное и координированное увеличение скорости их синтеза. Такой механизм индукции называется координированной индукцией.

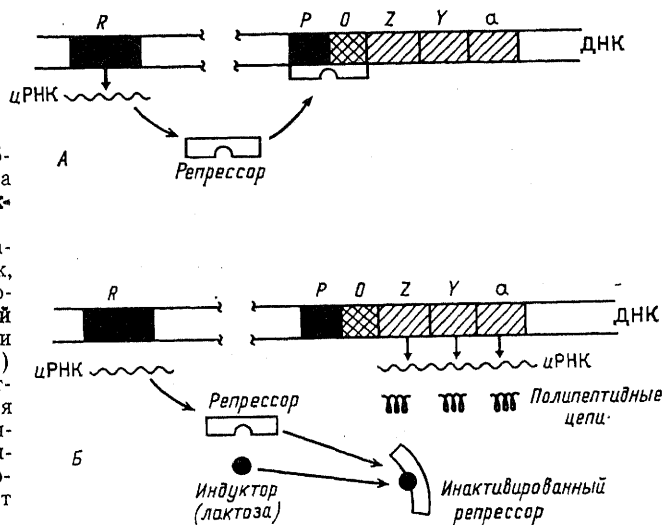
2. Индуктор (субстрат A) вызывает индукцию первого фермента (Φ_1), и как результат этого происходит быстрое накопление продукта первой реакции (вещества B). Промежуточный метаболит B индуцирует синтез фермента Φ_2 , что приводит к накоплению вещества V и последующей индукции фермента Φ_3 . В этом случае имеет место последовательное индуцирование синтеза ферментов метаболического пути продуктом предшествующей реакции. Подобный механизм индукции называется последовательной индукцией. Таким образом, синтез всех ферментов метаболического пути при координированной индукции находится под контролем одного индуктора; в последовательной индукции участвует несколько индукторов.

3. Существует и смешанный механизм индукции, при котором часть ферментов определенного пути индуцируется координированно субстратом-индуктором, а индукция других ферментов осуществляется промежуточными продуктами метаболического пути, т. е. последовательно. Примером катаболического пути, ферменты которого индуцируются координированно и последовательно, может служить путь использования экзогенной лактозы. Лактоза индуцирует координированно синтез трех ферментов: галактозидпермеазы, катализирующей транспорт лактозы в клетку, β -галактозидазы, осуществляющей расщепление лак-

тозы до моносахаров — глюкозы и галактозы, и трансацетилазы, функции которой не известны. Накапливающаяся галактоза в свою очередь индуцирует синтез следующих трех ферментов собственного катаболизма.

Интересно отметить, что индуцированный синтез ферментов у микроорганизмов описан в 30-х гг., но механизм этого процесса долгое время был непонятен. Индуцированный синтез ферментов лежит в основе широкоизвестного явления адаптации организмов к различным условиям. Успехи, достигнутые в расшифровке механизмов регуляции клеточного метаболизма, позволили объяснить природу этого явления, его механизм и роль в клетке.

Лактозный оперон *E. coli*, состоящий из трех структурных генов, промотора и оператора, был первой ферментной системой, на которой Ж. Моно и Ф. Жакоб изучали механизм индукции синтеза ферментов (рис. 38). В отсутствие лактозы молекула репрессора, активная в сво-



бодном состоянии, связывается с оператором и подавляет транскрипцию структурных генов. Когда в клетку попадает лактоза, она связывается с репрессором, в результате образуется неактивный комплекс репрессора с индуктором, который не может взаимодействовать с оператором и, следовательно, препятствовать транскрипции структурных генов. В результате индуцируется синтез 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.

В основе индукции синтеза ферментов лактозного оперона лежит механизм негативной регуляции: исходно репрессор «запрещает» транскрипцию генов лактозного оперона; индукция заключается в инактивировании репрессора аллостерическим эффектором — индуктором. Таким образом, и в случае индукции путем негативной регуляции, и в случае репрессии синтеза ферментов 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 последнего к оператору, а в случае репрессии эффектор (корепрессор) повышает это сродство.

Катаболитная репрессия. Кроме репрессии конечным продуктом, характерной для анаболических путей, описан тип репрессии, называемой каталитической и заключающейся в том, что быстро используемые клеткой источники энергии способны подавлять синтез ферментов других путей катаболизма, участвующих в метаболизировании сравнительно медленно используемых источников энергии. Катаболитную репрессию можно рассматривать как приспособление клетки к использованию в первую очередь наиболее легко доступных источников энергии. В присутствии такого источника энергии потребление других субстратов, менее «удобных» для клетки, временно приостанавливается, и пути катаболизирования этих субстратов временно выключаются.

Выше отмечалось уже, что, если в среде для выращивания *E. coli* одновременно содержатся глюкоза и лактоза, сначала используется глюкоза. Несмотря на присутствие индуктора лактозного оперона, ферменты, участвующие в катаболизме лактозы, не синтезируются¹¹. Транскрипция генов лактозного оперона начинается, когда концентрация глюкозы в среде становится низкой. Таким образом, глюкоза препятствует синтезу ферментов лактозного оперона.

Как это осуществляется? Изучение механизма катаболитной репрессии (рис. 39) обнаружило, что этот тип регуляции тесно связан с внутриклеточным уровнем циклического АМФ, который в этом процессе функционирует в качестве эффектора. Он образует комплекс с аллостерическим белком — катаболитным активатором, неактивным в сво-

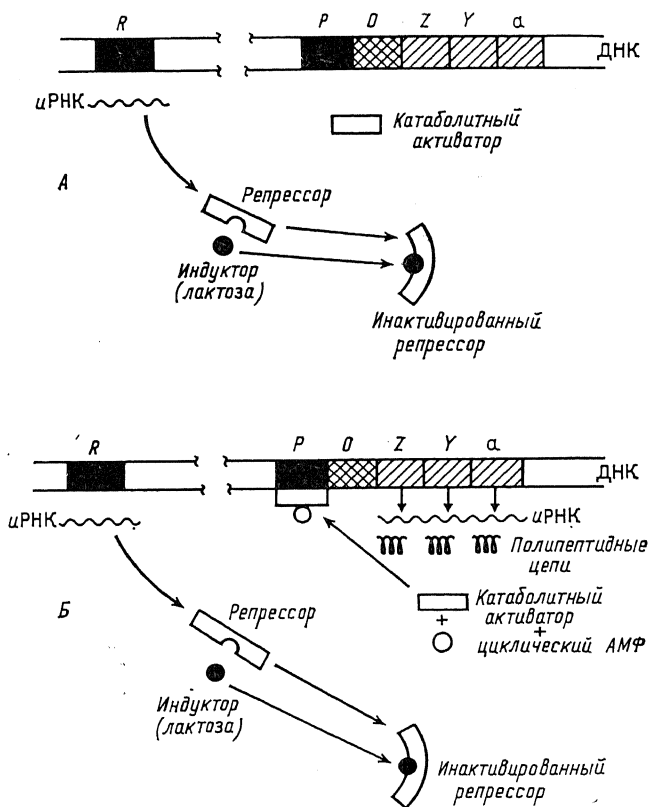
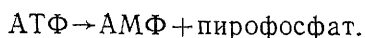


Рис. 39. Схематическое изображение индукции синтеза ферментов катаболизма лактозы у *E. coli*.

А. В присутствии глюкозы и инактивированного индуктора репрессора не происходит транскрипции структурных генов лактозного оперона; катаболитный активатор находится в неактивном свободном состоянии. Б. Циклический АМФ образует с катаболитным активатором комплекс, связывающийся с промотором и создающий условия для прикрепления к нему РНК-полимеразы и инициации транскрипции. Обозначения см. рис. 38

¹¹ По этой причине индукция ферментов катаболизма лактозы, изображенная схематически на рис. 38, Б, недостаточно полна.

бодном состоянии. Этот комплекс, в свою очередь присоединившись к определенному участку на промоторе, обеспечивает возможность связывания РНК-полимеразы с промотором и инициацию транскрипции. Количество образующегося комплекса катаболитного активатора с циклическим АМФ определяется концентрацией последнего, которая уменьшается при увеличении содержания глюкозы в среде. Таким образом, глюкоза вызывает изменение внутриклеточной концентрации циклического АМФ. Это соединение обнаружено в клетках всех прокариот. Его единственная функция у них — регуляторная. Циклический АМФ образуется из АТФ в реакции, катализируемой аденилатциклазой, связанной с ЦПМ:



Аденилатциклаза обладает высокой активностью, если компоненты системы транспорта глюкозы в клетку фосфорилированы (с. 44). Это происходит в отсутствие глюкозы, которую необходимо транспортировать. Таким образом, активность аденилатциклазы возрастает при уменьшении концентрации глюкозы в среде. Это приводит к повышению образования циклического АМФ и в конечном итоге к индукции синтеза ферментов катаболизма лактозы. Наоборот, при высокой концентрации глюкозы в среде система ее транспорта находится в дефосфорилированном состоянии, следствием чего является уменьшение активности аденилатциклазы и соответственно количества циклического АМФ. Становится понятным, как глюкоза через систему своего транспорта регулирует концентрацию циклического АМФ в клетке. Поскольку катаболизм глюкозы связан с образованием метаболической энергии и запасанием ее в молекулах АТФ, через глюкозу в клетке связаны пути АТФ и циклического АМФ: при увеличении количества АТФ уменьшается количество циклического АМФ и наоборот.

Особенностью всех ферментных систем, находящихся под контролем катаболитной репрессии, является участие в их индукции универсального комплекса, состоящего из белкового катаболитного активатора и циклического АМФ.

Регуляция различных метаболических путей

Биосинтетические пути регулируются преимущественно путем аллостерического ингибирования первого фермента и репрессии синтеза ферментов этого пути конечным продуктом. Регулирование разветвленных биосинтетических путей осуществляется с помощью усложненных вариантов этих же механизмов.

Основные механизмы, регулирующие катаболические пути, — индукция синтеза ферментов и катаболитная репрессия. Катаболические пути, в которых функционируют конститутивные ферменты, регулируются большей частью посредством аллостерических воздействий на активность ферментов. Одна из задач катаболических путей — обеспечение клетки энергией. У большинства прокариот возможности генерации энергии намного превышают потребности в ней клетки. Количество АТФ, которое можно синтезировать с помощью имеющихся в клетках аэробных прокариот ферментов гликолитического и дыхательного путей, значительно больше количества АТФ, необходимого для процессов биосинтеза и поддержания жизнедеятельности. Поэтому клетки должны обладать способностью контролировать потребление энергодающих субстратов и, следовательно, выработку клеточной энергии. Основной принцип контроля прост: АТФ синтезируется только

тогда, когда он необходим. Иными словами, интенсивность энергетических процессов у прокариот регулируется внутриклеточным содержанием АТФ.

Адениловые нуклеотиды относятся к числу важнейших эффекторов. АМФ и АДФ действуют как положительные эффекторы, стимулирующие скорость энергетических процессов и, следовательно, повышающие выход АТФ. Наоборот, АТФ служит отрицательным эффектором, сигнализирующим о превышении процессов образования АТФ над его потреблением. В результате регуляции процессов синтеза и распада АТФ в клетке поддерживается стационарное энергетическое состояние, характеризующееся так называемым энергетическим зарядом клетки:

$$\frac{[\text{АТФ}] + [1/2 \text{АДФ}]}{[\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]}$$

Величина энергетического заряда теоретически может колебаться от 1 (в клетке все адениновые нуклеотиды только в виде АТФ) до 0 (в клетке содержится только АМФ). В растущей культуре величина энергетического заряда клетки равна примерно 0,8. Уменьшение его свидетельствует об ухудшении энергообеспечения организма. Когда эта величина становится ниже 0,5, клетки погибают.

Регуляция процессов активного транспорта, обеспечивающего поступление подавляющего большинства необходимых прокариотам веществ, происходит на уровне синтеза переносчика и его функционирования. Биосинтез белковых компонентов многих транспортных систем регулируется по типу индукции. Глюкоза, транспортная система которой у большинства прокариот конститутивна, подавляет образование транспортных систем других сахаров и ряда органических кислот путем катаболитной репрессии. Исключение составляют некоторые облигатно аэробные прокариоты, у которых транспорт органических кислот конститутивен, а индуцируемой является транспортная система глюкозы. Избыток субстрата в среде может репрессировать синтез соответствующей транспортной системы. Это особенно характерно для аминокислот. В этом случае регуляция транспорта координирована с регуляцией их последующего метаболизма.

Обнаружена также регуляция транспорта по типу отрицательной обратной связи, когда субстрат, накопленный внутри клетки, подавляет собственный транспорт из внешней среды. Таким образом, процессы клеточного транспорта находятся под контролем тех же механизмов, что и внутриклеточные анаболические и катаболические процессы.

ГЛАВА 6

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЭВОЛЮЦИИ ПРОКАРИОТ

Вся информация о признаках, присущих данному организму, сосредоточена в его генетическом аппарате. Он обеспечивает сохранение и точное воспроизведение этих признаков в процессе размножения организма, так как возникающие дочерние особи обнаруживают в большинстве случаев полное сходство с родительскими формами. Это говорит о том, что генетический аппарат обладает высокой стабильностью и точностью механизмов, обеспечивающих его функционирование. Однако стабильность генетического аппарата не абсолютна, так как это исключало бы всякую возможность его изменений и, следовательно, эволюционных преобразований, приведших в конечном итоге к возникновению разнообразных форм жизни, свидетелями (и представителями) которых мы являемся. Таким образом, генетический аппарат должен быть организован так, чтобы, с одной стороны, обеспечивать свою стабильность, с другой — быть достаточно пластичным, т. е. обладать способностью к изменчивости.

В этой главе мы обсудим применительно к прокариотам вопросы, касающиеся организации и функционирования генетического аппарата, определяющего свойства наследственности и изменчивости, а также изменения в генетическом материале и процессы, приводящие к этим изменениям. Постараемся также оценить вклад каждого из процессов в эволюцию прокариотных организмов.

Генетический аппарат прокариот

Как это ни кажется в настоящее время парадоксальным, но до 40-х гг. нашего столетия немногие микробиологи думали, что бактерии обладают наследственностью, основанной на тех же принципах, которые установлены для высших организмов. Прокариоты не имеют ни оформленного ядра, ни хромосом, аналогичных таковым эукариотных клеток, поэтому считали, что бактерии в генетическом отношении представляют собой анархическую форму жизни. Одним из первых к пониманию того, что бактерии и высшие организмы подчиняются общим генетическим законам, подошел М. Бейеринк, описавший у прокариот стабильные, легко распознаваемые и наследуемые изменения.

Генетический материал любой клетки представлен ДНК, информационные свойства которой определяются специфической последовательностью четырех нуклеотидов в полинуклеотидной цепи. Полуконсервативный механизм репликации ДНК, в результате которого из одной родительской двухцепочечной молекулы образуются две дочерние молекулы, содержащие по одной родительской и одной вновь синтезированной комплементарной полинуклеотидной цепи, наилучшим образом обеспечивает идентичность исходной и синтезированных молекул и, следовательно, сохранность видоспецифической наследственной ин-

формации в ряду поколений клеток и организмов. Реализация этой информации в процессе жизненного цикла (онтогенеза) организма — двухступенчатый процесс. Сначала с определенных участков ДНК информация переписывается (транскрибируется) в виде комплементарных нуклеотидных последовательностей молекул иРНК, которая перемещается в цитоплазму, связывается с рибосомами и в рибосоме с иРНК осуществляется перевод (трансляция) генетической информации в определенную последовательность аминокислотных остатков молекулы белка.

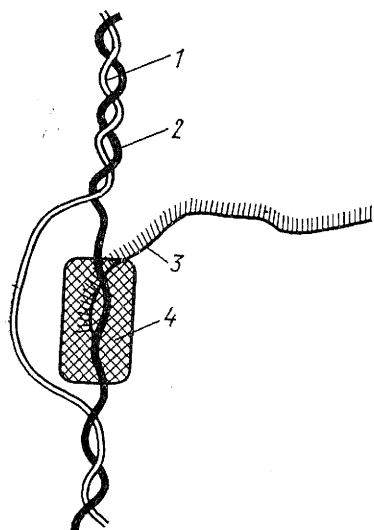


Рис. 40. Схематическое изображение процесса транскрипции:
1 — двухцепочечная молекула ДНК; 2 — полинуклеотидная цепь ДНК, функционирующая в качестве матрицы; 3 — синтезирующаяся молекула иРНК; 4 — РНК-полимераза (по Stent, 1974; Schlegel, 1972)

Процесс транскрипции (рис. 40) находится в клетке под строгим контролем, поэтому имеет место как неодинаковое транскрибирование во времени разных участков ДНК (генов), так и неодинаковая скорость, с которой гены могут транскрибироваться. В результате, количество молекул иРНК в клетке, комплементарных разным генам, сильно различается. Хотя в целом механизмы синтеза ДНК и РНК сходны, процесс транскрипции не обладает той степенью точности, которая характерна для репликации ДНК. Однако, поскольку иРНК не способна к самовоспроизведению, возникающие при ее синтезе ошибки в последующих клеточных генерациях не воспроизводятся и, следовательно, не могут наследоваться.

Информационные РНК служат матрицами для синтеза различных белковых молекул. Перевод генетической информации с «языка» нуклеотидов на «язык» аминокислот — сложный многостадийный процесс, включающий активацию аминокислот, образование ими комплексов с особым видом РНК (транспортными РНК, или тРНК), взаимодействие этих комплексов с иРНК, связанной с рибосомой, приводящее в конечном итоге, к формированию полипептидной цепи, аминокислотный состав которой изначально запрограммирован в определенном участке ДНК. В осуществлении каждой из стадий, ведущих к синтезу молекулы белка, участвует несколько различных ферментов.

Хотя механизм трансляции отличается высокой точностью, вероятность ошибки в целом выше, чем в случае синтеза молекул ДНК и РНК. Наиболее уязвимый этап — «узнавание» с помощью фермента аминокислоты соответствующей молекулой тРНК. По имеющимся данным, частота возникновения ошибок на этом этапе порядка 10^{-4} , что и определяет, возможно, уровень точности процесса синтеза белка в целом. Однако, как и в случае синтеза РНК, ошибки в процессе трансляции, приводящие к синтезу измененной молекулы белка, не воспроизводятся, если они не закодированы исходно в генетическом материале.

Таким образом, процессы транскрипции и трансляции, служащие для выражения в онтогенезе генетической информации, не приводят к наследованию изменений, возникающих при их функционировании. Только изменения, происходящие в молекулах ДНК, могут сохраняться

в ряду поколений, поскольку они воспроизводятся в процессе репликации. Следовательно, в основе эволюции прокариот лежит способность к изменению только их генетического материала. У прокариот весь генетический материал, необходимый для жизнедеятельности, представлен одной хромосомой, т. е. бактериальная клетка гаплоидна. В определенных условиях в клетках бактерий может содержаться по несколько копий хромосомы.

У многих бактерий обнаружены внехромосомные генетические элементы — плазмиды. Это кольцевые ковалентно замкнутые молекулы ДНК, содержащие от 1500 до 40 000 пар нуклеотидов, реплицирующиеся автономно как единое целое. К настоящему времени плазмиды описаны у 135 видов, принадлежащих более чем к 40 родам, располагающимся в разных группах Определителя бактерий Берги. Обычно о присутствии плазмид в бактериальной клетке судят по проявлению определенных признаков, которые присущи этим структурам, т. е. кодируются их генетическим материалом. К таким признакам относится устойчивость к некоторым лекарственным препаратам, способность к переносу генов при конъюгации, синтез веществ антибиотической природы, способность использовать некоторые сахара или обеспечивать деградацию ряда веществ. Большую группу составляют плазмиды с нерасшифрованными функциями; такие плазмиды выявляют с использованием физико-химических методов.

Изменение генетического материала у прокариот

Первое, что поразило исследователей, когда они поближе познакомились с миром прокариот, — огромное разнообразие присущих им признаков. Это послужило в свое время основанием для дискуссии о том, существуют ли у прокариот реально очерченные виды, между которыми нет переходов, или же имеет место почти бесконечная варибельность одного вида, так что в конечном итоге само понятие «вид» применительно к этим организмам теряет тот смысл, который в него вкладывается. Спор был разрешен после разработки Р. Кохом метода чистых культур. Было доказано, что и у бактерий вид — это реальность. Представления о простоте переходов между родами и видами оказались неверными.

В процессе экспериментальной работы с прокариотами исследователи часто наблюдали, что популяция одного вида при культивировании в течение длительного времени или в разных условиях подвержена изменениям. Накопилось огромное количество фактов, иллюстрирующих эти изменения, однако механизмы, лежащие в основе наблюдаемых явлений, были непонятны. И только успехи, достигнутые за последние десятилетия в области изучения строения и функционирования генетического аппарата прокариот, позволили разобраться в этом вопросе.

Прежде чем переходить к дальнейшему изложению материала, целесообразно ввести некоторые понятия. Генотипом, или геномом, называют совокупность всех генов, присущих данному организму, т. е. его генетическую конституцию. Под фенотипом понимают совокупность признаков, присущих данному организму. Оказалось, что все наблюдаемые изменения можно разделить на два типа. К первому относят те из них, которые, как правило, проявляются у большинства особей в популяции при изменении внешних условий. Они характеризуются адекватностью, т. е. имеют приспособительный характер, и наблюдаются только в условиях, когда действует фактор, вызвавший эти

изменения. Такой тип изменчивости получил название адаптивного, а само явление было названо адаптацией. Ко второму типу относятся изменения признаков, которые первоначально возникают как редкие события в популяции особей (с частотой 1 на 10^4 — 10^{11} клеток). Если измененные особи имеют некоторое преимущество перед неизмененными, выражающееся в повышенной скорости роста или жизнеспособности, они постепенно накапливаются в популяции и вытесняют исходные особи. Изучение особенностей второго типа изменений привело к заключению, что последние возникают случайно, т. е. являются ненаправленными, неадекватными изменениями внешней среды. И наконец, эти изменения постоянны, т. е. передаются из поколения в поколение при размножении организма. Такой тип изменений был назван мутациями. Мутации, приводящие к изменению в генетическом материале клетки, которое делает ее нежизнеспособной в конкретных условиях существования, называют летальными.

Долгое время не было ясно, каков механизм адаптивных изменений, могут ли они наследоваться и какова их роль в эволюции организмов. В настоящее время показано, что адаптация — изменение, происходящее на уровне фенотипа и не затрагивающее клеточный генотип. Все признаки клетки определяются ее генотипом, но в определенных условиях она пользуется не всей заложенной в ней генетической информацией, количество которой гораздо больше, чем необходимо клетке для существования в конкретных условиях. Реакция клетки на изменение внешних условий приводит к проявлению каких-то новых признаков, свойств, которые не обнаруживались в исходной культуре. Однако информация, необходимая для проявления этих признаков, обязательно содержится в клеточном геноме. Адаптация есть результат пластичности клеточного метаболизма, обусловленного регуляторными механизмами клетки. Таким образом, адаптивные изменения относятся к категории явлений, связанных с регуляцией клеточного метаболизма, и имеют место в рамках неизмененного генотипа клетки. Отсюда с очевидностью следует, что адаптивная изменчивость не затрагивает генетической конституции организма, она не является наследственной и, следовательно, никакого вклада в эволюцию организмов не вносит.

Наследственные изменения можно подразделить на изменения, возникающие в результате мутаций и рекомбинаций генетического материала.

Мутации. Скачкообразные изменения в генетическом материале клетки, приводящие к появлению новых признаков, получили название мутаций. Мутации возникают в популяции особей всегда, часто без видимых воздействий на популяцию. Такие мутации, причины возникновения которых нам не известны, называются спонтанными. Повышать частоту мутаций по сравнению со спонтанным фоном, т. е. индуцировать их, могут многие физические и химические факторы, действующие на генетический материал клетки. Физические факторы — это прежде всего коротковолновое излучение (ультрафиолетовые и рентгеновские лучи). К химическим мутагенам относятся аналоги оснований, производные акридина, алкилирующие и дезаминирующие агенты.

Мутации, независимо от того, имеют ли они спонтанное происхождение или индуцированы каким-либо мутагеном, по характеру перестроек, происшедших в ДНК, можно разделить на мутации, состоящие в изменении одного нуклеотидного остатка молекулы ДНК, так называемые точковые мутации, и мутации, при которых происходит изменение участка молекулы ДНК размером больше одного нуклеотида. Точковые мутации в свою очередь могут быть разделены на несколько

классов в зависимости от того, какие конкретно химические перестройки происходят в молекуле ДНК в рамках одного нуклеотидного остатка: замена, вставка или выпадение. К мутациям, затрагивающим сегмент бактериальной хромосомы, ведут нарушения последовательности и количества генов.

Частым типом структурных повреждений ДНК, вызываемых УФ-излучением, является образование пиримидиновых димеров в результате ковалентного связывания соседних пиримидиновых оснований. Реже УФ вызывает разрыв водородных связей, образование межцепочечных поперечных сшивок и поперечных сшивок между ДНК и белком. Ионизирующие излучения всех видов вызывают главным образом одноцепочечные разрывы в ДНК; разрывов, поражающих обе цепи, обычно на порядок меньше. Различные химические мутагены индуцируют образование внутрицепочечных и межцепочечных поперечных сшивок и одноцепочечные разрывы ДНК.

В процессе эволюции прокариоты выработали способы защиты генетического материала от повреждающего воздействия облучения и различных химических факторов. В клетках прокариот обнаружены эффективные системы репарации мутационных повреждений.

Наиболее изученными механизмами восстановления повреждений ДНК являются фотореактивация, вырезание повреждений и пострепликационное, или рекомбинационное, восстановление. Фотореактивация — наиболее простой механизм, восстанавливающий лишь индуцированные УФ-излучением повреждения ДНК, сопровождающиеся образованием пиримидиновых димеров. Особенность фотореактивации заключается в том, что ее действие распространяется только на одну цепь ДНК и не зависит от того, является ли молекула ДНК одно- или двухцепочечной. Осуществляется фотореак-

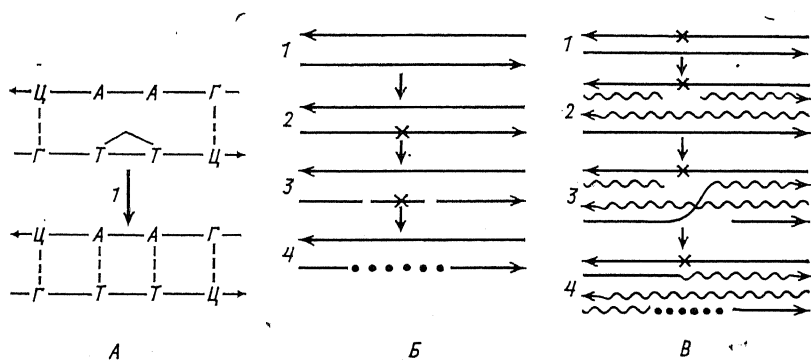


Рис. 41. Механизмы восстановления повреждений ДНК. А — фотореактивация пиримидиновых димеров: 1 — фотореактивирующий фермент + видимый свет.

Б — Вырезание одноцепочечных повреждений: 1 — сегмент интактной ДНК; 2 — повреждение в одной из цепей ДНК; 3 — вырезание короткого сегмента, содержащего поврежденный участок; 4 — заполнение образовавшейся брешки нуклеотидами, комплементарными к интактной цепи, функционирующей в качестве матрицы; сшивание их с помощью ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы.

В — Пострепликационное восстановление ДНК: 1 — сегмент двухцепочечной молекулы ДНК, содержащей повреждение; 2 — репликация молекулы, приводящая к образованию двух молекул, одна из которых содержит повреждение и брешь в разных цепях; 3 — обмен генетическим материалом между идентичными цепями сестринских молекул; 4 — образование молекул, каждая из которых содержит одну интактную цепь, а в другой — повреждение или брешь.

Крестиком обозначено повреждение; точками — восстановительный синтез; волнистой линией — синтезированные цепи дочерних молекул ДНК

тивация светозависимым фотореактивирующим ферментом, обеспечивающим специфическое расщепление пиримидиновых димеров (рис. 41, А).

Вырезание повреждений — основной темновой механизм восстановления различных одноцепочечных повреждений ДНК, в том числе и пиримидиновых димеров. Особенность этого механизма репарации в том, что восстановление одноцепочечных повреждений происходит только тогда, когда не повреждена комплементарная цепь молекулы ДНК. В процессе темновой репарации происходит вырезание в одной из цепей молекулы ДНК коротких сегментов (длиной около 30 нуклеотидов), содержащих поврежденный участок, и последующее заполнение образовавшейся брешки комплементарными нуклеотидами с использованием неповрежденной цепи ДНК в качестве матрицы (рис. 41, Б).

Механизмы, обеспечивающие восстановление повреждений в обеих цепях молекулы ДНК, зависят от характера повреждений. Принципиальная схема заключается в следующем (рис. 41, В). ДНК-полимераза, катализирующая репликацию ДНК, «встретив» на своем пути повреждение, «перескакивает» через него, и процесс репликации продолжается. Образуются две дочерние молекулы, одна из которых содержит в одной цепи первичное повреждение, в другой — брешь, возникшую при репликации и располагающуюся напротив повреждения.

Задельвание брешки происходит путем генетического обмена между идентичными цепями сестринских двухцепочечных молекул. В результате каждая из них имеет теперь по одной неповрежденной цепи, которая может служить матрицей в процессе репарации повреждений разного типа, как это изображено на схеме В того же рисунка.

Фенотипическое проявление мутаций. Поскольку мутация — это стабильное изменение наследственного материала клетки, она реализуется по тем же каналам, как любая другая генетическая информация. На этом пути судьба мутаций различна. Некоторые из них не влияют на признаки организма, оставаясь «молчащими». Такие мутации могут не проявляться в процессе трансляции, т. е. не приводят к изменению аминокислотной последовательности синтезируемого белка. В другом случае изменение может происходить вдали от активного центра фермента и потому не сказываться на его функции. Если же мутация приводит к изменению в активном центре или резко влияет на его структуру, это сразу сказывается на функциях фермента. Диапазон изменения функциональной активности фермента в этом случае велик: от незначительного понижения активности до полной ее потери. В последнем случае это часто приводит к гибели организма.

Для проявления мутации необходимо, чтобы прошел по крайней мере один цикл репликации ДНК, в которой исходно произошло изменение нуклеотидной последовательности (премутация). Только если это исходное изменение закрепится после репликации в дочерней молекуле ДНК, оно становится стабильным, а отсюда и наследственным. Для выражения мутации в фенотипе необходимо прохождение этапов транскрипции и трансляции. Иногда для проявления мутационно измененного признака, т. е. фенотипического выражения мутации, необходимо несколько клеточных делений. Так, если мутация привела к нарушению способности синтезировать какой-либо витамин, например тиамин, то в течение нескольких генераций потребность в тиамине у мутантных клеток не обнаруживается. В этот период мутантные клетки используют тиамин, содержащийся в исходной немутантной клетке. Когда же запасы витамина иссякнут, мутанты смогут размножаться только при добавлении экзогенного тиамина.

На проявление мутантных признаков влияет также количество копий хромосомы, содержащихся в прокариотной клетке. Все прокариоты гаплоидны, имеют набор генов, локализованных в одной хромосоме. В определенных условиях в клетке можно обнаружить несколько копий одной хромосомы. Если в такой клетке произошла мутация, приводящая к нарушению синтеза определенного метаболита, то она сразу (после одного цикла репликации → транскрипции → трансляции) не про-

явится, поскольку синтез необходимого клетке метаболита будет осуществляться в результате функционирования неповрежденных генов, содержащихся в остальных хромосомах. Для фенотипического выражения мутантного гена необходимо, чтобы он содержался в клетке в «чистом» виде, т. е. клетка имела одну хромосому с мутантным геном, или чтобы все хромосомы в клетке имели одинаковый генотип. Это происходит через несколько клеточных делений (рис. 42).

Рекомбинации. Ко второму типу наследственной изменчивости относятся изменения, возникающие у прокариот в результате рекомбинации генетического материала, при котором происходит частичное объединение геномов двух клеток. Известны три основных типа процессов, приводящих к рекомбинации генетического материала прокариот: конъюгация, трансформация и трансдукция. При конъюгации бактерий, для которой необходим непосредственный контакт между ними, осуществляется направленный перенос генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент.

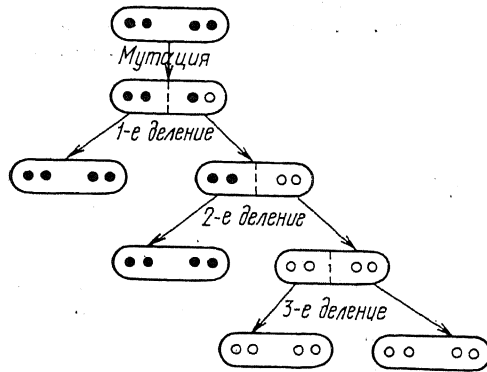


Рис. 42. Проявление мутаций в прокариотной клетке, имеющей четыре копии хромосомы (по Schlegel, 1972)

Как правило, в клетку-реципиент переносится только часть генетического материала клетки-донора, в результате чего образуется неполная зигота, или мерозигота, содержащая часть генома донора и полный геном клетки-реципиента. Участки перенесенной от донора ДНК находят гомологичные участки в молекуле ДНК реципиента, между которыми происходит генетический обмен (рис. 43). В результате часть донорной ДНК встраивается (интегрируется) в геном реципиента, а соответствующая часть реципиентной ДНК из него исключается. Эффективность интеграции очень высока: если донорный ген перенесен в реципиентную клетку, то вероятность его включения в геном последней равна примерно 0,5.

Трансформация заключается в изменении свойств одних бактериальных клеток под влиянием ДНК, выделенной из других бактериальных клеток. Для трансформации не требуется непосредственного контакта между двумя клетками. Способность ДНК проникать в клетку-реципиент зависит как от природы самой ДНК, так и от физиологического состояния клетки-реципиента. Трансформирующей ДНК могут быть только высокомолекулярные двухцепочечные фрагменты, при этом проникать в бактериальную клетку может ДНК, выделенная из разных биологических источников, но включаться в геном — только ДНК с определенной степенью гомологичности. После того как экзогенный фрагмент ДНК, проникший в клетку, нашел гомологичный фрагмент ДНК клетки-реципиента, между ними происходит генетический обмен аналогично тому, как это имеет место на последнем этапе конъюгации (рис. 43). Проникший в реципиентную клетку фрагмент близкородственной ДНК способен вызывать трансформацию с достаточно высокой частотой — порядка 0,2—0,3.

Конъюгация и трансформация — не единственные способы передачи генетического материала. Гены могут переноситься из одной бактериальной клетки в другую с помощью фагов. Такой перенос бактери-

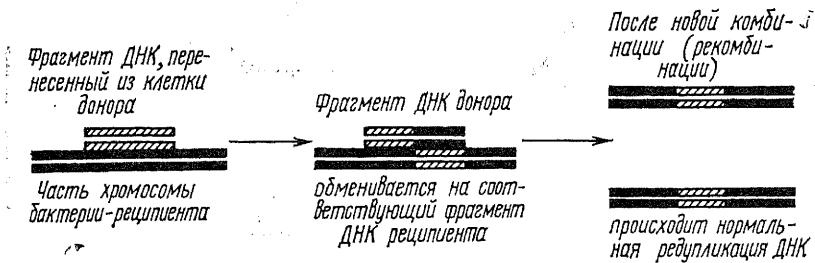


Рис. 43. Схематическое изображение обмена между фрагментом ДНК клетки донора и хромосомой клетки реципиента (по Schlegel, 1972)

альных генов получил название трансдукции. Трансдукция оказывается возможной, если в процессе размножения фага одна из частиц случайно захватит какой-либо фрагмент бактериальной хромосомы, как правило, содержащий очень небольшое число генов. Когда такая фаговая частица заражает бактерию-реципиент, бактериальная ДНК проникает в клетку таким же путем, как фаговая. Между трансдуцированной бактериальной ДНК и гомологичным участком бактериальной хромосомы может произойти обмен, и как следствие его возникают рекомбинанты, несущие небольшую часть генетического материала клетки-донора. Передача признаков с помощью фагов показана для бактерий, принадлежащих к разным родам.

Наконец, еще один путь переноса генетического материала у прокариот осуществляется с помощью плазмид. Для некоторых из них также показана способность преодолевать межвидовые и межродовые барьеры.

Вклад отдельных генетических механизмов в эволюцию прокариот

Выше мы рассмотрели организацию генетического аппарата прокариот, осуществляющего передачу генетической информации от одного поколения к следующему, т. е. по «вертикали», обратив внимание на такие его черты, как стабильность и точность функционирования, а также отметили наличие в клетке эффективных систем защиты, направленных на поддержание этой стабильности. Однако стабильность генетического аппарата не абсолютна и при всей надежности изменения являются его неотъемлемым свойством. Для всех прокариот характерна большая способность к генетическим изменениям, являющимся результатом мутаций, а также развития путей «горизонтального» переноса генов между бактериальными клетками, таких, как конъюгация, трансформация, трансдукция.

Закономерности и вклад различных генетических процессов в эволюцию прокариот проще представить, если рассматривать их применительно к некой достаточно генетически однородной популяции организмов. Генетический состав такой популяции называется генофондом и по отношению к ней эволюцию можно определить как изменения в генофонде, происходящие в результате действия определенных генетических механизмов и отбора.

Новые наследственные признаки возникают в генофонде в результате генных мутаций. Последние создают фонд наследственных изменений, служащих исходным материалом (сырьем) для эволюции. Вероятно, мутации являются и самым первым видом наследственной из-

менчивости, возникшим одновременно с началом функционирования ДНК как информационной молекулы, поскольку для них не нужно никаких дополнительных структур и механизмов. Способность к мутированию заложена в химическом строении молекулы ДНК, а проявление мутационных изменений идет по тем же каналам, что и обычная генетическая информация клетки. Возможно, на начальном этапе эволюции мутационные изменения были единственной формой изменчивости. На протяжении миллионов лет мутации в сочетании с естественным отбором сыграли решающую роль в появлении тех видов бактерий, которые известны сейчас.

Скорость эволюции определялась частотой возникновения мутаций. Можно только предполагать, что в начале биологической эволюции частота мутаций была значительно выше, чем в настоящее время, а соотношение «полезных» для организма мутаций к «вредным» сдвинуто в сторону первых. В пользу повышенной частоты мутирования на начальном этапе эволюции говорит тот факт, что в тот период значительно интенсивнее было действие на прокариотную клетку коротковолнового излучения при отсутствии у нее защитных приспособлений в виде соответствующих репарационных механизмов.

Следующее важное приобретение — сформирование процессов генетической рекомбинации, т. е. процессов обмена генетическим материалом, принадлежащим разным особям, и возникновение на базе этого особой с рекомбинантным геномом. При генетических рекомбинациях никаких новых генов в генофонде не появляется. В этом их принципиальное отличие от мутаций. Значение генетических рекомбинаций в том, что в результате этого обеспечивается возможность объединения разных генов и создание разных вариантов генных сочетаний в геноме прокариотной клетки. Поскольку отбор действует на геном в целом и, следовательно, на всю совокупность признаков организма, генетическая рекомбинация предоставляет дополнительный материал для действия отбора, ускоряя таким образом процесс эволюции.

Из трех основных процессов, приводящих у прокариот к генетической рекомбинации (конъюгация, трансформация, трансдукция), наиболее совершенным является процесс конъюгации, так как он обеспечивает возможность более полного обмена генетическим материалом двух клеток. (При благоприятных условиях возможно вхождение в реципиентную клетку всей донорной ДНК). Однако эффективность механизмов генетической рекомбинации высока для достаточно близкородственных прокариотных организмов. Поэтому не лишена оснований точка зрения, что исключительного значения в процессах изменчивости бактерий межвидовая передача генетической информации не имеет. Это соображение подкрепляется и обнаруженными в последнее время в клетках прокариот «барьерами» на пути выражения чужеродного генетического материала.

Механизмом, предотвращающим смешивание генетического материала прокариот разных видов, служат процессы рестрикции и модификации ДНК, осуществляемые соответствующими ферментами. Рестрикционные эндонуклеазы (рестриктазы) расщепляют проникшую в клетку чужеродную ДНК. Они распознают специфические нуклеотидные последовательности и разрезают по ним или рядом с ними двухцепочечные молекулы ДНК. Модифицирующие метилазы клетки обеспечивают метилирование оснований «своей» ДНК в участках, чувствительных к рестриктазам. Модифицированные таким путем участки становятся устойчивыми к действию рестриктаз. (В противном случае молекула ДНК расщеплялась бы собственными рестриктазами.) Таким образом, процессы модификации и рестрикции обеспечивают защиту «собственной» ДНК от проникшего в клетку чужеродного генетического материала.

Барьерами для выражения чужеродных генов служат различия в аппаратах

транскрипции и трансляции, обнаруженные у разных групп прокариот. Разный состав пептидов РНК-полимеразы грамположительных и грамотрицательных бактерий может определять ее способность или неспособность узнавать соответствующие промоторы в чужеродных генах. Трансляционные барьеры связаны со специфичностью строения 30S-рибосомной субъединицы, определенные различия в строении которой у *E. coli* и *Bacillus subtilis*, возможно, объясняют, почему гены *E. coli* не выражаются у *B. subtilis*.

С учетом изложенного выше кажется вероятным, что обмен генетическим материалом «по горизонтали» обеспечивает одновременную передачу довольно ограниченного числа генов и наиболее эффективен между близкородственными организмами. Основные направления эволюции прокариот определяются мутационной изменчивостью в сочетании с обычной передачей признаков «по вертикали».

ГЛАВА 7

СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТ. ГРУППЫ ПРОКАРИОТНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Если классификация высших организмов отражает в определенной мере их эволюционные связи, то создание на этой же основе классификации внутри царства прокариот значительно сложнее. Прежде чем переходить к краткому изложению этого вопроса, целесообразно дать определение терминов, которые используются при дальнейшем изложении материала: **систематика** — теория многообразия организмов, изучающая отношение между их группами (таксонами); **классификация** — распределение множества организмов по группам (таксонам); **таксономия** — наименование групп организмов (таксонов), установление их границ и отношения подчинения; **таксон** — группа организмов, обладающих заданной степенью однородности.

Основной таксономической категорией является вид. По современным представлениям, вид — это группа близких между собой организмов, имеющих общий корень происхождения и на данном этапе эволюции характеризующихся определенными морфологическими, биохимическими и физиологическими признаками, обособленных отбором от других видов и приспособленных к определенной среде обитания. К этому следует добавить, что внутри вида может происходить обмен генетическим материалом. Виды объединяют в роды, роды — в семейства, затем следуют порядки, классы, отделы, царства. Иногда роды группируют в трибы, которые в свою очередь объединяют в семейства. Для высших таксономических категорий пока нет удовлетворительного определения. Все таксономические категории описывают с помощью признаков. Признаки могут быть морфологическими, цитологическими, культуральными, физиолого-биохимическими, иммунологическими и др., но они должны давать возможность четкого распределения организмов по таксономическим группам.

О систематике прокариот

Классификация живых организмов отражает уровень наших знаний в этой области и имеет обобщающее значение. В XX в. проблема классификации бактерий стала настоящей в связи со стремительно увеличивавшимся как вширь (описание новых видов), так и вглубь (более детальное разностороннее изучение уже описанных видов) объемом знаний об этих организмах.

Первые системы классификации бактерий в XX в. основывались на тех же принципах, которые использовали ботаники при построении системы классификации высших растений. Основное внимание уделялось морфологическим признакам бактерий. Однако вскоре стало ясно, что морфологические признаки недостаточны для удовлетворительного распределения бактерий по таксономическим группам. Необходимость ис-

пользования для классификации бактерий наряду с морфологическими физиологическими признаками была обоснована С. Н. Виноградским и М. Бейеринком.

Сейчас в классификации прокариот просматриваются два основных направления. В основе первого лежит идея создания филогенетической системы прокариот, т. е. построения единой системы, объективно отражающей родственные отношения между разными группами прокариот и историю их эволюционного развития. Другое направление преследует в первую очередь практические цели, заключающиеся в том, чтобы классификация прокариот служила наилучшим образом целям их быстрой идентификации, т. е. установлению принадлежности организма к определенному таксону. Наиболее четко эта тенденция получила свое выражение в Определителях бактерий Берги, выпускаемых периодически Обществом американских бактериологов с привлечением крупных специалистов в области изучения тех или иных групп бактерий. Первое издание Определителя было выпущено в 1923 г. группой американских бактериологов под руководством Д. Х. Берги (D. H. Bergey, 1860—1937); восьмое издание вышло в 1974 г.

В восьмом издании Определителя Берги все обнаруженные бактерии, отнесенные в отдел *Bacteria*, один из двух отделов царства *Prokaryotae*, разделены на 19 групп¹. Признаки, по которым осуществляется разделение на группы, относятся к категории легко определяемых и вынесены в названия групп, например, бактерии, образующие слизистую оболочку (группа 3), спиральные и изогнутые бактерии (группа 6), грамотрицательные аэробные палочки и кокки (группа 7), палочки и кокки, образующие эндоспоры (группа 15). При этом даже очевидные эволюционные связи между представителями разных групп в большинстве случаев не учитываются, т. е. основная идея классификации «по Берги» — легкость идентификации бактерий. Для идентификации бактерий используют совокупность признаков: морфологических (форма тела; наличие или отсутствие жгутиков; капсулы; способность к спорообразованию; особенности внутриклеточного строения; окрашивание по Граму), культуральных (признаки, выявляемые при культивировании в лаборатории чистой культуры), физиолого-биохимических (способы получения энергии; потребности в питательных веществах; отношение к факторам внешней среды; нуклеотидный состав и последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК; наличие и характер минорных оснований в ДНК; нуклеотидный состав рибосомальной РНК; последовательность аминокислот в ферментных белках с аналогичными функциями).

Для восьмого издания Определителя бактерий Берги характерен отказ от построения классической иерархической системы классификации. Она заменена списком упомянутых выше групп и сохранилась только фрагментарно. Ценность Определителя в том, что он представляет собой наиболее полную сводку известных бактериальных форм и самое современное пособие для идентификации бактерий. После выхода из печати восьмого издания Определителя Берги работа по созданию иерархической системы прокариот продолжается. В 1978 г. предложено все известные прокариоты (включая и цианобактерии) разделить на 4 отдела, названия и краткая характеристика которых представлены в табл. 15. Однако филогенетические связи между ними не разбираются, хотя выделение отделов *Gracilicutes* (грамотрицательные про-

¹ Цианобактерии, образующие второй отдел царства *Prokaryotae*, в этом определителе не рассматриваются, если не считать их краткой общей характеристики.

Деление царства Prokaryotae на отделы
(по Gibbons, Murray, 1978)

Gracilicutes*	Firmacutes	Mollicutes	Mendocutes
<p>Включает фототрофные и нефототрофные организмы с различной морфологией, имеющие грамотрицательную клеточную стенку. Размножение в основном бинарным делением, в некоторых группах — почкованием. Спор не образуют. Многие подвижны: с помощью жгутиков или скольжением. Аэробные, анаэробные и факультативно анаэробные формы. Отдел подразделяется на два класса (Photobacteria и Scotobacteria), объединяющих фотосинтезирующие и нефотосинтезирующие организмы соответственно</p>	<p>Входят организмы с грамположительной клеточной стенкой. Размножаются в основном бинарным делением. Клетки разной формы: сферы, палочки, нити. Нити ветвящиеся или неветвящиеся. Некоторые образуют эндоспоры. У других споры на гифах или в спорангиях. Перемещаются с помощью жгутиков. Большинство неподвижны. В состав отдела входят аэробные, анаэробные, факультативно анаэробные формы</p>	<p>Относятся прокариоты, у которых отсутствует клеточная стенка и не синтезируются предшественники пептидогликана. Клетки окружены ЦПМ, чрезвычайно плеоморфны. Размножение бинарным делением, почкованием, освобождением «элементарных тел». Окрашивание по Граму отрицательное. Характерно образование мелких, вступающих в агар колоний. Могут быть сапрофитами, паразитами или патогенами</p>	<p>Авторы рассматривают целесообразность выделения четвертого отдела, включающего прокариоты, имеющие ригидную клеточную стенку, но не содержащие в ее составе пептидогликана</p>

* Термины образованы от следующих латинских слов: cutes — кожа, gracilus — тонкий, стройный; firmus — крепкий, прочный; mollis — мягкий; mendosus — ошибочный.

кариоты) и Firmacutes (грамположительные прокариоты) отражает представление о грамположительных и грамотрицательных бактериях как о двух крупных эволюционных ветвях царства Prokaryotae.

Стремление создать филогенетическую систему прокариот, построить эволюционное древо, аналогичное имеющемуся в филогенетических системах высших растений и животных, породило разные подходы к решению этой задачи. Хронологически первой была попытка использовать для этого накопленные сведения о фенотипических признаках бактерий. В основу создания системы был положен и традиционный принцип. Все используемые признаки мысленно распределяли по степени их значимости, результатом чего являлось субъективное (основанное только на опыте и интуиции исследователя) создание иерархической системы признаков. Затем в зависимости от важности признаков объекты разбивали на таксономические группы. От того, в какой последовательности при классификации учитываются признаки, зависит путь, по которому осуществляют разделение организмов и в конечном счете полученные таксономические группы. Легко видеть, что структура иерархической системы определяется порядком, в котором располагаются признаки, а последний выбирается произвольно.

Уязвимость этого положения привела группу систематиков бактерий к использованию другого подхода для определения степени их родства. Этот подход получил название нумерической систематики. В основе ее лежат идеи, сформулированные в середине XVIII в. французским ботаником М. Адансоном (M. Adanson, 1727—1806): все признаки объекта считаются равноценными; при описании исследуемого объекта

используется максимальное количество признаков, которые могут быть изучены и определены; степень сходства устанавливается на основании количества совпадающих признаков, т. е. является функцией числа совпадающих признаков. Классификация, построенная на принципах М. Адансона, — трудоемкий процесс, поэтому свое развитие и практическое применение она получила лишь в последнее время в связи с успехами в области вычислительной техники. Преимущества ее заключаются в формальном устранении элемента субъективности, поскольку все признаки объекта принимаются равноценными. Однако очевидны и ее слабые стороны. Как правило, для оценки сходства прокариот используют порядка 100 признаков, что составляет приблизительно 10% от количества признаков, определяющих бактериальный фенотип. Следовательно, учитывается только незначительная часть признаков классифицируемого объекта. К настоящему времени нумерическая систематика не внесла ничего принципиально нового в классификацию бактерий.

Наконец, еще один подход к классификации прокариот для установления степени их родства связан с развитием молекулярной биологии и основан на сравнительном изучении и сопоставлении первичной структуры макромолекул, участвующих в осуществлении важнейших клеточных функций. К таким макромолекулам относятся ДНК, РНК, ферментные белки. Известно, что генетическая информация записана в молекуле ДНК в виде различных сочетаний трех из четырех азотистых оснований. Согласно законам генетического кодирования разная информация не может быть записана одинаково, поэтому организмы с неодинаковым нуклеотидным составом ДНК будут различными. Если же нуклеотидный состав ДНК двух сравниваемых организмов одинаков, возможно и сходство и различие этих организмов, поскольку генетическое кодирование основано не только на определенном содержании оснований в единице кодирования (триплете), но и на их взаимном расположении.

Для таксономических целей сравнивают молярное содержание суммы гуанина и цитозина (ГЦ) в процентах от общего количества оснований ДНК у разных объектов. Определение молярного содержания ГЦ-оснований у широкого круга прокариот обнаружило, что оно колеблется от 25 до 75%, только в группе цианобактерий — от 35 до 71%².

Более тонкий метод оценки генетического сходства организмов — метод гибридизации их ДНК, позволяющий количественно оценивать степень гомологичности ДНК этих организмов. В основе его лежит способность денатурированной (одноцепочечной) ДНК в подходящих условиях ренатурироваться, т. е. соединяться с комплементарной нитью с образованием двухцепочечной молекулы ДНК. Для этого ДНК, выделенную из организмов одного вида, денатурируют нагреванием и в таком виде фиксируют в каком-нибудь носителе, например в геле. Из другого вида организмов приготавливают меченую ДНК, подвергают ее денатурации и деградации на отдельные более или менее мелкие фрагменты, после чего создают условия для реассоциации с ДНК, закрепленной в носителе. Количество двухцепочечной ДНК, образованной в результате взаимодействия однонитевых ДНК из разных организмов, служит мерой сходства этих организмов. (Количество образовав-

² Колебания нуклеотидного состава ДНК у эукариотных микроорганизмов (молярное содержание, %): грибы — 26—70, водоросли — 37—68, простейшие — 22—68. У высших растений и животных — 35—45%. Колебания в составе оснований ДНК вирусов приблизительно такие же, как у прокариот.

шейся двухцепочечной ДНК легко определяется по радиоактивной метке после удаления непрореагировавших незакрепленных фрагментов.)

Значение данных о строении ДНК для систематики прокариот огромно, поскольку о сходстве и различии организмов судят, сравнивая в целом их генетические аппараты, в которых записана вся информация о признаках организма. Однако, как показал опыт использования этого метода для систематики бактерий, при установлении филогенетических связей между группами степень сходства бактериальных геномов может служить лишь в качестве одного из тестов для определения отношений между организмами наряду с использованием для этой же цели совокупности морфологических, цитологических, физиолого-биохимических признаков. Сопоставление информации о генетическом аппарате с фенотипической характеристикой, проведенное для ряда бактериальных форм, показало, что не всегда между ними наблюдается соответствие, т. е. сходство фенотипов организмов не всегда коррелирует со сходством в строении и гомологичностью их ДНК.

Недостаток метода классификации бактерий на основании сравнения их геномов состоит в том, что с его помощью оценивается суммарно вся генетическая информация клетки, что делает этот метод нечувствительным к незначительным информационным отклонениям, которые, однако, могут определять важные свойства организма. Поясним это примером. Для автотрофной ассимиляции углекислоты клетка помимо ферментов, имеющих у гетеротрофных организмов, должна иметь два специфических фермента: рибулозодифосфаткарбоксилазу и фосфорibuлокиназу. Информация об этих ферментах записана в геноме с помощью $3 \cdot 10^2$ пар оснований. Всего же бактериальный геном содержит порядка 10^6 пар оснований. Таким образом, признак, характеризующий способность к автотрофной ассимиляции углекислоты у бактерий, приводит к ничтожному изменению в общем строении бактериального генома, которое не определяется используемым методом. Однако важность этого признака, определяющего способность микроорганизмов к автотрофии, в таксономическом отношении не вызывает сомнений.

Одним из перспективных филогенетических маркеров оказались рибосомальные РНК (рРНК), у которых консерватизм первичной структуры сочетается с постоянством функций и повсеместным распространением, указывающим на древнейшее происхождение. Это 16S рРНК прокариот и органелл эукариот и 18S рРНК цитоплазмы эукариот. К настоящему времени последовательности 16S и 18S рРНК изучены более чем у 200 организмов, принадлежащих к разным царствам живой природы, что привело к неожиданным результатам: на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей этих рРНК были выявлены не две группы организмов, различающихся прокариотным и эукариотным типом клеточной организации, а три группы. Одну образуют все эукариоты: высшие растения, животные, дрожжи, водоросли и т. п. В эту группу не вошли органеллы эукариот (митохондрии, хлоропласты). Таким образом, первая группа представлена ядерно-цитоплазматическим компонентом эукариотных клеток. Ко второй группе, получившей название истинных бактерий, или эубактерий, относится подавляющее большинство прокариот. Сюда же попали на основании степени гомологии 16S рРНК митохондрии и хлоропласты эукариотных клеток. Наконец, в третью группу вошли некоторые малоизученные прокариоты, обитающие в экстремальных условиях: метанобразующие бактерии, экстремальные галофилы и термоацидофилы. Эта группа организмов получила название археобактерий.

Помимо особенностей строения 16S рРНК прокариоты, отнесенные к архебактериям, обладают рядом черт, отличающих их от остальных двух групп: 1. Несмотря на разнообразие строения клеточных стенок архебактерий, ни в одной из них не содержится пептидогликан, характерный для клеточных стенок эубактерий. 2. Архебактерии отличаются химическим строением липидов. (Глицеролипиды архебактерий представляют собой не сложные эфиры глицерина и жирных кислот, а простые эфиры глицерина и высокомолекулярных спиртов.) 3. Особенность строения тРНК архебактерий — отсутствие последовательности ТΨСГ, характерной для большинства тРНК эубактерий. 4. Уникально строение ДНК-зависимых РНК-полимераз архебактерий, отличающихся по субъединичному составу и чувствительности к антибиотикам от РНК-полимераз представителей группы эубактерий. 5. Одна из групп архебактерий (метанобразующие бактерии) характеризуется наличием уникальных коферментов и связанными с этим метаболическими особенностями.

В то же время архебактерии по ряду свойств на молекулярном уровне проявляют сходство с эукариотами, что привело некоторых исследователей к выводу о приблизительно одинаковом эволюционном «расстоянии» между двумя группами.

Обнаружение в недрах мира прокариот группы своеобразных организмов — архебактерий — снова поставило вопрос о путях клеточной эволюции с момента возникновения некоей гипотетической первичной клетки.

Традиционная общая схема клеточной эволюции основывается на следующих постулатах: из популяции первичных клеток в результате целого ряда событий, приведших к повышению уровня клеточной организации, под давлением естественного отбора возникла популяция предковых прокариотных клеток, из которых в конечном итоге произошли разные группы прокариот. Маловероятно, чтобы предковые прокариотные клетки все были «на одно лицо». Единственная их общая черта — прокариотная организация (см. табл. 1). Согласно этой схеме прокариоты имеют общее происхождение, т. е. являются монофилетической группой. Эукариотная клетка возникла в результате эндосимбиоза, в котором клеткой-хозяином и эндосимбионтом были существенно различающиеся между собой прокариотные клетки (рис. 44, А). Одной из

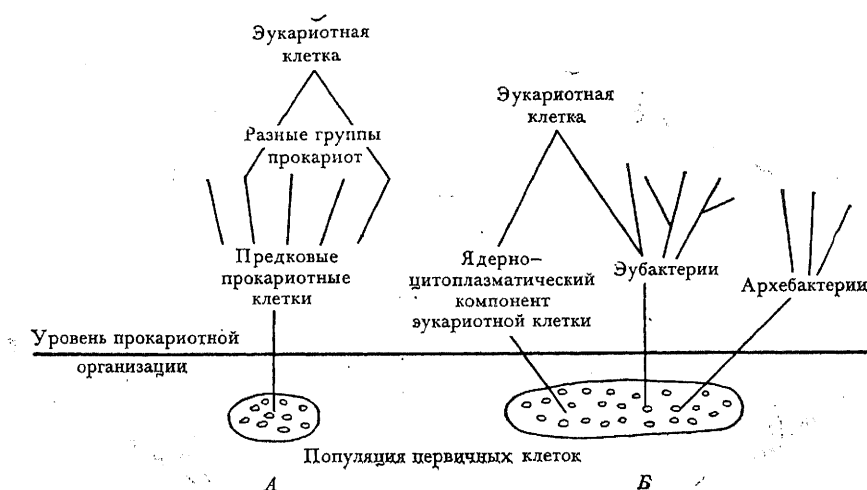


Рис. 44. Пути клеточной эволюции. Объяснение см. в тексте

ветвей, развившейся из предковых прокариотных клеток на раннем этапе их существования, могли быть архебактерии. Сходство их с эукариотными клетками делает архебактерии возможным кандидатом на роль гипотетических клеток-хозяев, поглотивших свободноживущие прокариоты, ставшие впоследствии хлоропластами и митохондриями.

Новая общая схема клеточной эволюции, акцентирующая внимание на различиях между тремя группами, исходит из того, что эубактерии, архебактерии и ядерно-цитоплазматический компонент эукариотных клеток дивергировали от общего предка намного раньше, чем по традиционной схеме, когда уровень организации был ниже современного прокариотного уровня. Каждая группа, самостоятельно и независимо эволюционируя, достигла уровня организации, характерного для клеток прокариот (рис. 44, Б). В соответствии с этой гипотезой существующие прокариоты имеют полифилетическое происхождение.

По мнению ряда исследователей, ключом к созданию естественной системы прокариот может служить также изучение аминокислотной последовательности молекул функционально сходных белков, например, цитохромов *c*, ферредоксинов, пластоцианинов и др.

Итак, в настоящее время отсутствует сколько-нибудь детализированная эволюционная система прокариот. Все описанные выше попытки подойти к ее созданию позволяют сделать вывод о том, что 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. Это, естественно, значительно усложняет задачу, но не делает ее безнадежной. Уже сейчас в мире прокариот можно проследить основные направления эволюционного развития. Одна из многообещающих идей заключается в том, что в основе прогрессивной эволюции в мире прокариот лежит совершенствование способов получения ими энергии.

Группы прокариотных организмов

В восьмом издании Определителя бактерий Берги все прокариоты, за исключением цианобактерий, распределены по группам, не имеющим таксономического статуса. Ниже следует краткая характеристика этих 19 групп. (Проблемы систематики цианобактерий изложены в гл. 10.) Группы бактерий, более подробно разбирающиеся в последующих главах, охарактеризованы намеренно предельно кратко. Наоборот, тем группам, которые в дальнейшем не обсуждаются, уделено несколько больше внимания.

Группа 1. Фототрофные бактерии. В эту группу отнесены фотосинтезирующие бактерии, характеризующиеся специфическим набором пигментов и особым типом фотосинтеза. Пигменты представлены различными видами бактериохлорофилла и каротиноидами. Фотосинтез не сопровождается выделением кислорода.

Группа 2. Скользящие бактерии. В состав группы входят два порядка *Mucobacteriales* и *Cytophagales*. К первому порядку относятся палочковидные грамотрицательные бактерии, имеющие тонкие эластичные клеточные стенки. Для них характерно образование слоя слизи, окружающего клетку. Бактерии могут передвигаться по твердому субстрату скользящими движениями. Локомоторные структуры (жгутики) отсутствуют. Миксобактерии образуют так называемые плодовые тела, внутри которых клетки переходят в покоящееся состояние (см. рис. 21). Представители порядка — облигатно аэробные хемоганогетеротрофы. Энергию получают только за счет дыхания. Для них характерно образование активных литических ферментов, способных гидролизовать такие макромолекулы, как полисахариды (целлюлоза, клетчатка, хитин), белки, нуклеиновые кислоты, эфиры жирных кислот. С этим связана роль миксобактерий в природе: они активно разрушают мертвые растительные остатки. Многие миксобактерии спо-

способны лизировать клетки прокариотных и эукариотных микроорганизмов. Хорошо растут на поверхности твердых сред. Основное место обитания — почва.

К порядку *Cytophagales* относятся бактерии, по типу движения сходные с миксобактериями, но в отличие от последних не образующие плодовых тел. Это палочки, одиночные или формирующие нити (рис. 45). В состав порядка входят 4 семейства.

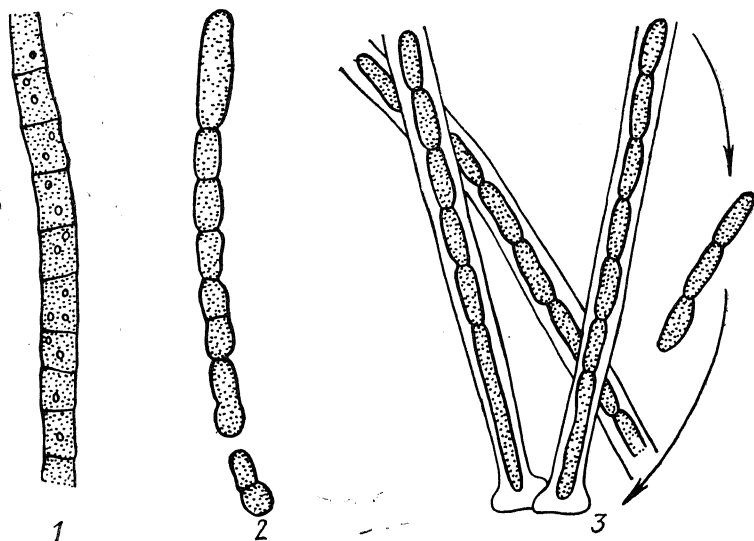


Рис. 45. Представители порядка *Cytophagales*:
1 — *Beeggiatoa*; 2 — *Vitreoscilla*; 3 — *Leucothrix* (по Lechevalier, Pramer, 1971)

Семейство *Cytophagaceae* объединяет подвижные формы, характеризующиеся хемоорганогетеротрофным способом питания. Представители рода *Cytophaga* могут использовать различные полисахариды (агар, целлюлозу, хитин, крахмал, пектин и др.). Источником энергии служит дыхание, однако некоторые цитофаги могут получать энергию за счет брожения. В это же семейство включены и скользкие нитчатые организмы, обитающие преимущественно в морской и пресной водах. В семейство *Beeggiatoaceae* объединены нитчатые формы. Нити эластичны и способны к скользящему движению. Разделение на роды осуществляется в зависимости от способности откладывать или нет в клетке гранулы серы при росте в присутствии сульфида (рис. 45, 1, 2). Сходной морфологией обладают бактерии, входящие в семейство *Leucothrichaceae*. Они образуют длинные нити, состоящие из овальных или цилиндрических клеток. Нити обычно прикреплены к субстрату и неподвижны (рис. 45, 3). Размножаются с помощью одиночных подвижных клеток, выходящих из нити. Во многих отношениях напоминают нитчатые цианобактерии, отличаясь отсутствием фотосинтетических пигментов. Облигатные аэробы. Хемоорганогетеротрофы.

Группа 3. Бактерии, образующие слизистую оболочку (влагалище). В состав группы входят нитевидные бактерии, окруженные общим влагалищем (рис. 46). Нити могут быть свободно плавающими или прикрепленными к различным находящимся в воде предметам. Влагалище состоит из гетерополисахарида, часто инкрустированного окислами железа или марганца. Клетки размножаются внутри влагалища поперечным делением. Выходящие из влагалища одиночные клетки

могут быть снабжены жгутиками, с помощью которых они перемещаются, или же жгутики отсутствуют и одиночные клетки не способны к активному движению. Все бактерии этой группы — аэробы и хемоорганогетеротрофы. Наиболее распространены представители родов *Sphaerotilus* и *Leptothrix*. Бактерии рода *Sphaerotilus* — типичные обитатели сточных вод. Они хорошо растут в проточной воде, богатой органическими веществами, а представители рода *Leptothrix* — в бедных органическими веществами местах с высоким содержанием железа.

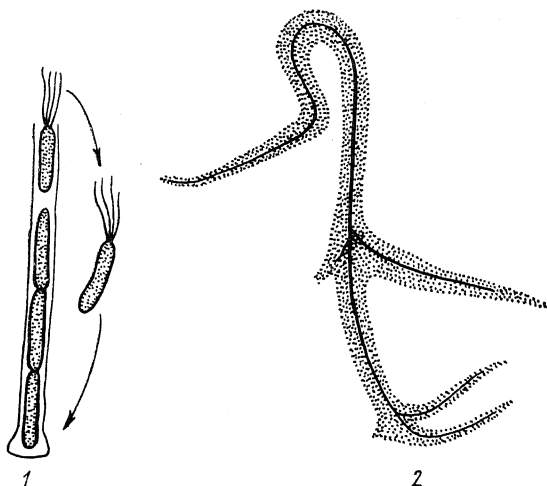


Рис. 46. Бактерии, образующие слизистую оболочку (влагалище):
1 — *Sphaerotilus*; 2 — *Leptothrix* (по Lechevalier, Pramer, 1971)

Группа 4. Почкующиеся и (или) стебельковые бактерии. В эту группу входят бактерии, образующие состоящие из слизи придатки (стебельки), не связанные с цитоплазмой клетки, или нитевидные клеточные выросты — простеки (рис. 47). Бактерии рода *Neuskia* образуют слизистые придатки, не связанные с цитоплазмой клетки. Слизь, выделяющаяся с одной стороны клетки, имеет вид стебелька, на конце которого располагается клетка. Стебельки обнаруживают дихотомическое ветвление, повторяющее деление зрелых клеток (рис. 47, 1).

Выросты представляют собой выпячивание клеточного содержимого, не отделенного от цитоплазмы клетки. Снаружи они окружены клеточной стенкой; в них можно различить цитоплазматическую мембрану, цитоплазму с рибосомами, иногда ядерный материал и мезо-

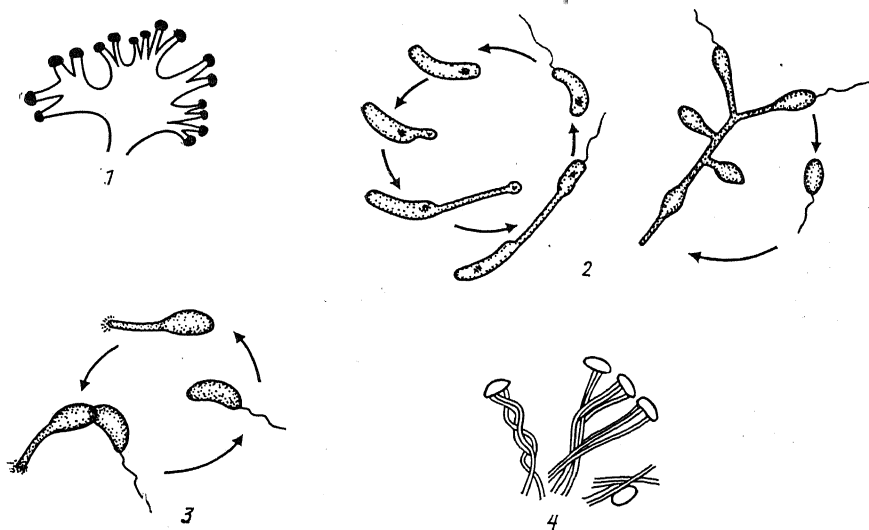


Рис. 47. Почкующиеся и (или) стебельковые бактерии:
1 — *Neuskia*; 2 — *Hyphomicrobium*; 3 — *Caulobacter*; 4 — *Gallionella* (по Brock, 1970; Lechevalier, Pramer, 1971; Schlegel, 1972)

сомы. Выросты приводят к увеличению клеточной поверхности и ЦПМ и служат для обеспечения повышенного транспорта веществ в клетку. Для протектобактерий это имеет первостепенное значение, так как многие из них обитают в условиях низкой концентрации органических веществ в среде. Общим свойством протектобактерий является способность расти с сохранением типичной морфологии только при незначительном содержании органического субстрата в среде. При дефиците питательных веществ выросты удлиняются. С увеличением концентрации необходимых для роста питательных компонентов выросты сильно сокращаются или исчезают совсем.

У некоторых бактерий выросты имеют отношение к функции размножения. Бактерии, принадлежащие к роду *Huphomicrobium*, обычно имеют вид палочек с заостренными концами, но могут быть овальной, яйцеобразной или бобовидной формы. Для них характерен своеобразный цикл развития (рис. 47, 2). Прикрепленная к субстрату материнская клетка образует нитевидный вырост, куда переходит один из поделившихся нуклеоидов. Вырост, удлиняясь, формирует гифоподобную структуру, на конце которой появляется почка. В процессе созревания почки образуется жгутик. Дочерняя клетка (созревшая почка) отделяется от материнской и в течение некоторого времени подвижна. Затем она прикрепляется к субстрату или другим клеткам, теряет жгутик и формирует вырост и почку. Нитевидные выросты клетки могут ветвиться, и на концах каждой ветви формируются почки. В некоторых случаях созревшие почки не отделяются от материнской клетки и в свою очередь формируют выросты и почки. В результате имеет место скопление гиф и клеток. Выросты могут появляться на обоих полюсах клетки.

У бактерий рода *Caulobacter* клеточные выросты не имеют отношения к репродуктивной функции (рис. 47, 3). У представителей этого рода клетки большей частью палочковидной формы с одним полярно расположенным жгутиком. Прикрепившись к какой-нибудь поверхности тем концом, на котором расположен жгутик, они формируют вырост, имеющий такое же происхождение и внутреннее строение, как у бактерий рода *Huphomicrobium*. На конце выроста выделяется небольшое количество клейкого вещества, с помощью которого клетка прикрепляется к субстрату. Размножение осуществляется поперечным делением, при этом к концу деления одна из клеток несет стебелек, другая — жгутик. После разделения клетка, снабженная жгутиком, формирует стебелек с клейким веществом, прикрепляется к субстрату и переходит в неподвижную вегетативную фазу.

В эту группу отнесены и бактерии, размножающиеся почкованием, но не образующие выростов (роды *Blastobacter*, *Seliberia*, *Pasteuria*). Все рассмотренные выше представители родов, объединяемых в группу 4, — хемоорганогетеротрофы; некоторые — олигокарбофилы. Как правило, облигатные аэробы, некоторые — факультативные аэробы. Есть виды, тяготеющие к низким концентрациям кислорода в среде (микроаэрофилы).

Наконец, к этой же группе относят бактерии родов *Gallionella*, *Metallogenium*, *Caulococcus* и др. Работами последнего времени установлено, что организмы родов *Metallogenium* и *Gallionella* не имеют клеточной стенки и являются сапрофитными микоплазмами. Такова же биологическая природа и представителей родов *Siderococcus* и *Caulococcus*. *Gallionella* представляет собой два организма: лентовидные или винтообразно перекрученные нити сформированы микоплазмopodobными формами, способными окислять железо, а находящийся на

их конце (реже — на боковой поверхности) бактериальный организм является сопутствующим (рис. 47, 4). Симбиотические отношения между ними, вероятно, определяются паразитированием микоплазм на бактериальной клетке. Все перечисленные выше сапрофитные микоплазмы (или микоплазменный компонент ассоциации в случае *Gallionella*) способны накапливать в среде или на клеточных поверхностях окислы железа и/или марганца. Хемоорганогетеротрофы. Для некоторых предполагается способность к хемолитоавтотрофии. Аэробы, часто — микроаэрофилы.

Группа 5. Спирохеты. Включает один порядок Spirochaetales. Тонкие спиралевидные одноклеточные формы, обладающие своеобразной морфологией и способом движения (см. рис. 13). Длина клеток колеблется от 3 до 500 мкм. Склонны к образованию аномальных форм (гранул, цист, сфероидов). Размножаются поперечным делением. Клетки состоят из протоплазменного цилиндра, аксиальной нити и наружной оболочки. Оболочка тонкая и эластичная, что и обеспечивает спирохетам своеобразный способ передвижения. Грамотрицательны. Представители этой группы различно относятся к кислороду. Есть среди них облигатно аэробные, факультативно и облигатно анаэробные формы. Хемоорганогетеротрофы. Свободноживущие облигатно анаэробные представители рода *Spirochaeta* сбраживают глюкозу с образованием уксусной, молочной, щавелевой, муравьиной кислот, этанола, CO_2 и H_2 .

Представители порядка Spirochaetales существенно различаются по степени требовательности к субстрату. Среди этой группы бактерий есть свободноживущие формы, основное место обитания которых — пресные и соленые озера, среда с высоким содержанием H_2S ; комменсалы³, обитающие в желудочно-кишечном тракте пресноводных и морских моллюсков, и паразиты. Некоторые виды патогенны: *Treponema pallidum* — возбудитель сифилиса, *Borrelia recurrentis* — возбудитель возвратного тифа.

Группа 6. Спиралевидные и изогнутые бактерии. Бактерии, входящие в эту группу, объединяются в семейство Spirillaceae. Клетки имеют вид изогнутых палочек или спиралевидных форм с несколькими витками. Клеточная стенка жесткая, так что клетка свою форму не меняет. Движение осуществляется с помощью одного или множества жгутиков, расположенных на одном или обоих полюсах клетки. Среди представителей этой группы есть аэробные, микроаэрофильные и анаэробные формы. Хемоорганогетеротрофы, существенно различающиеся потребностями в питательных веществах. Некоторые виды могут расти на синтетической среде, содержащей единственный источник углерода, аммонийный азот и минеральные соли; для роста других необходимы сложные белково-пептонные среды. К роду *Spirillum* относятся в основном сапрофиты, обитающие в стоячих и загрязненных водах, на гниющих растительных и животных остатках. Ряд свободноживущих форм — обитатели морских вод. Есть среди них и паразиты. Некоторые виды патогенны.

К этой же группе «приписан» род *Bdellovibrio*. Обнаруженный в 1963 г. Г. Штольпом и М. Старром (H. Stolp, M. Starr) прокариотный организм, названный ими *Bdellovibrio bacteriovorus*⁴, вызвал огромный

³ Комменсализм — вид симбиоза, когда один организм живет за счет другого, не причиняя ему, однако, какого-либо вреда.

⁴ Bdello — от латинского слова «пиявка», vorus — «пожирающий»; в целом название, данное этим бактериям, можно перевести как «пиявко-вибрионы, пожирающие бактерии».

интерес, так как было показано, что он может паразитировать внутри клеток других бактерий. *B. bacteriovorus* — грамтрицательная мелкая, слегка изогнутая палочка, размеры которой колеблются в пределах 0,25—0,4×0,8—1,2 мкм; снабжена одним полярно расположенным жгутиком. Последний отличается тем, что несколько толще обычных бактериальных жгутиков и имеет иное строение. Жгутик *Bdellovibrio* состоит из сердцевины толщиной около 13 нм и покрывающего ее чехла (толщина 7,5 нм), который есть не что иное, как продолжение клеточной стенки. Внутри вида обнаружены штаммы, существующие только в клетках других бактерий, т. е. облигатные паразиты, и свободноживущие. Последние могут быть получены в лабораторных условиях из природных штаммов, ведущих паразитический образ жизни. Недавно описаны два вида из рода *Bdellovibrio*, являющиеся факультативными паразитами, т. е. могут существовать как внутри бактериальной клетки хозяина, так и сапрофитно на питательной среде сложного состава. Бактерии рода *Bdellovibrio* — аэробные хемоорганогетеротрофы. Штаммы, существующие вне клетки хозяина, могут расти только на питательной среде, содержащей дрожжевой экстракт и (или) пептон.

Особый интерес представляет способность *Bdellovibrio* паразитировать внутри клеток других бактерий. По имеющимся данным, спектр поражаемых бактерий очень широк: это различные виды грамположительных и грамтрицательных бактерий. *Bdellovibrio* обладают способностью перемещаться с помощью своего развитого жгутика значительно быстрее многих других бактерий. Это дает им возможность активно искать и находить клетки хозяина. Настигнув бактериальную клетку, *Bdellovibrio* прочно к ней прикрепляется, пробуравливает клеточную стенку, проникает внутрь в пространство между клеточной стенкой и ЦПМ и начинает там размножаться. Как правило, в клетку проникают сразу несколько бактерий *Bdellovibrio*, поэтому целостность клеточной стенки нарушается в нескольких местах. Количество клеток-паразитов, образовавшихся в клетке-хозяине, может достигать 20—50 в зависимости от размеров хозяина. Клетка-хозяин напоминает в таких случаях «мешок», набитый *Bdellovibrio*. Цикл внутриклеточного развития *B. bacteriovorus* длится 3—5 ч, после чего паразиты освобождаются из разрушенных ими клеток-хозяев. Часть клеток *Bdellovibrio* переходит в покоящееся состояние, формируя цисты, мелкие овальные или сферические клетки, окруженные толстой оболочкой. В подходящих условиях (когда много бактериальных клеток) цисты быстро прорастают. Бактерии рода *Bdellovibrio* широко распространены в природе. Они обитают в почве, морских и пресных водах. Их используют для борьбы с возбудителями эпидемических заболеваний, например холеры.

Группа 7. Грамтрицательные аэробные палочки и кокки. Группа представлена 5 семействами. К семейству Pseudomonadaceae относятся грамтрицательные одиночные прямые или слегка изогнутые подвижные палочки. Движение осуществляется с помощью полярно расположенных жгутиков. Типичные представители семейства объединены в род *Pseudomonas*. Это в основном облигатно аэробные хемоорганогетеротрофы, потребляющие широкий набор органических соединений. Некоторые представители рода могут получать энергию также за счет окисления молекулярного водорода или окиси углерода, т. е. являются факультативными хемолитотрофами. Описаны виды, использующие в качестве конечного акцептора электронов нитраты, т. е. способные существовать факультативно аэробно.

Представители рода *Pseudomonas* повсеместно распространены в природе. Они постоянные обитатели воздуха, почв, морских и пресных вод, илов, сточных вод, где им принадлежит активная роль в минерализации органических веществ. Многие виды образуют водорастворимые и флюоресцирующие пигменты. Последние привлекли к себе внимание в связи с тем, что из них выделили вещества, обладающие антибиотической активностью против грибов, дрожжей, грамположительных и грамотрицательных бактерий. Ряд видов *Pseudomonas* используют в микробиологической промышленности для получения различных органических соединений, кислот (пировиноградной, глюконовой, α -кетоглутаровой), аминокислот (глутаминовой, аспарагиновой, валина и др.), ферментов (аспарагиназы, пероксидазы). Некоторые виды вызывают заболевания растений и животных.

Семейство Azotobacteraceae объединяет виды, имеющие крупные клетки, склонные к изменению морфологии в зависимости от возраста культуры и условий культивирования. Среди представителей этого семейства встречаются подвижные и неподвижные формы. Бактерии рода *Azotobacter* образуют цисты. Хемоорганогетеротрофы. Способны фиксировать молекулярный азот. Облигатные аэробы. Обитают в почве, воде и на поверхности растений. Азотобактер — первый аэробный микроорганизм, для которого была показана способность фиксировать молекулярный азот. В лаборатории культуры *Azotobacter* отличаются ярко выраженным плеоморфизмом. В молодой культуре в зависимости от вида можно наблюдать клетки палочковидной, овальной или кокковидной формы, часто соединенные по две и склонные к образованию скоплений, реже — цепочек, состоящих из четырех и более клеток. Молодые клетки подвижны, в старых культурах образуются покоящиеся клетки (цисты), покрытые толстой оболочкой. Для *Azotobacter* характерно образование макрокапсул.

В состав семейства Rhizobiaceae входят виды, во многих отношениях сходные с таковыми семейства Pseudomonadaceae, но отличающиеся от них плеоморфизмом, а также способностью вызывать разрастание тканей, приводящее к образованию клубеньков и галлов на корнях или стеблях различных видов растений. В род *Rhizobium* (клубеньковые бактерии) объединены бактерии, вызывающие образование клубеньков на корнях бобовых растений и способные фиксировать азот в условиях симбиоза с ними.

Клубеньковые бактерии проникают через корневые волоски в корневую систему растения и стимулируют деление тетраплоидных клеток корня, приводящее к образованию клубенька. В нем происходит интенсивное размножение бактерий. В молодых клубеньках большинство бактериальных клеток имеет форму палочек. В процессе последующего развития наблюдается образование клеток неправильной формы (бактероидов), в которых и происходит активная фиксация N_2 . Бактероиды можно рассматривать как дифференцированные формы, приспособленные для наилучшего осуществления определенной функции. В первую очередь это связано с контролем поступления в бактериоиды молекулярного кислорода, которое осуществляется с помощью находящегося в клубеньках леггемоглобина, синтезируемого растением под влиянием клубеньковых бактерий. Каждый бактериоид оказывается как бы окруженным пленкой из леггемоглобина. Последний, обладающий, как и гемоглобин, высоким сродством к O_2 , обеспечивает перенос кислорода к бактериоидам.

Отношения между клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями можно определить как мутуализм, т. е. такой вид симбиоза,

при котором оба симбионта извлекают выгоду из сожительства: растение получает азот, клубеньковые бактерии — углеродсодержащие вещества и минеральные соли. Показана способность различных видов клубеньковых бактерий фиксировать молекулярный азот без какой-либо связи с растительными клетками. Для этого необходимо обеспечить клубеньковые бактерии подходящими источниками углерода (преимущественно пентозами), минимальным количеством фиксированного азота и промежуточными соединениями цикла трикарбоновых кислот. Свободноживущие клубеньковые бактерии содержат свой собственный гемоглобин, отличающийся структурно, но не функционально от леггемоглобина.

Все бактерии, принадлежащие к роду *Agrobacterium*, за исключением вида *A. radiobacter*, вызывают тканевые разрастания на стеблях различных растений, на основании чего они могут рассматриваться как внутриклеточные паразиты. Бактерии проникают в ткань растения-хозяина, используя для этого повреждения на его поверхности. Круг растений, поражаемых ими, очень широк. Например, типичный представитель рода *A. tumefaciens* вызывает образование галлов у растений, относящихся более чем к 40 семействам.

К семейству *Methylomonadaceae* относятся граммотрицательные бактерии, способные использовать в качестве источника углерода и энергии только одноуглеродные органические соединения. Бактерии, относящиеся к роду *Methylomonas*, — одиночные прямые, изогнутые или ветвящиеся палочки, передвигающиеся с помощью одного полярного жгутика. Род *Methylococcus* объединяет неподвижные кокковые формы. По физиологическим свойствам они сходны с видами из предыдущего рода, но отличаются формой клеток и отсутствием жгутиков. Представители обоих родов — облигатные аэробы.

Семейство *Halobacteriaceae* включает облигатно галофильные (солелюбивые) бактерии, способные расти на питательных средах, содержащих не менее 12% NaCl. Экстремальные галофилы лучше всего растут при концентрации NaCl в среде 20—30%. Необычное строение имеют клеточные стенки галофилов. Они не содержат пептидогликана, а состоят в основном из липопротеидов, липидный и белковый компонент которых также весьма необычен. Все это связывают с особенностями существования галофильных бактерий. Для поддержания целостности клеточных структур галобактериям необходимы высокие концентрации ионов натрия, хлора и магния. Если концентрация этих ионов ниже определенного уровня, клеточная стенка растворяется, а ЦПМ распадается на отдельные фрагменты.

Основной способ существования галобактерий — хемоорганогетеротрофия. Энергию получают в процессе дыхания. Содержат каротиноиды (наиболее распространенный — бактериоруберин), а также фиолетовый комплекс бактериородопсина, в состав которого входит каротиноид ретиналь. Некоторые из них способны к осуществлению особого типа фотосинтеза. Обнаруживаются там, где имеются подходящие для них солевые условия: в некоторых соленых озерах, в белковых продуктах, законсервированных с помощью соли, например в соленой рыбе.

Группа 8. Грамотрицательные факультативно анаэробные палочки. Объединяет два семейства: *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*. В состав первого семейства входят граммотрицательные, подвижные или неподвижные, бесспорные, аэробные или факультативно анаэробные палочки. Некоторые виды образуют капсулы. Хемоорганогетеротрофы. Отдельные представители характеризуются высокими пищевыми по-

требностями. Энергию получают за счет дыхания или брожения. Представители этого семейства широко распространены в природе. Среди них много патогенных и сапрофитных видов. Это обитатели почв, морских и пресных вод, разлагающихся остатков животных и растений, постоянные обитатели кишечника человека и многих видов животных, птиц, рыб, рептилий.

Наиболее изученный представитель семейства — *Escherichia coli*. Эта бактерия всегда содержится в кишечнике человека и животных, поэтому о загрязнении воды и пищевых продуктов судят по наличию в них *E. coli*. *E. coli* относится к числу условно патогенных бактерий, т. е. является постоянным компонентом микрофлоры кишечника человека, но при ослаблении защитных функций организма может проникать в другие органы и вызывать сильные воспалительные процессы. К числу возбудителей тяжелых заболеваний человека принадлежат бактерии из родов *Salmonella* и *Shigella*. *Salmonella typhi* — возбудитель брюшного тифа; разные виды *Shigella* — возбудители так называемой бактериальной дизентерии.

К семейству *Vibrionaceae* относятся граммотрицательные, прямые или изогнутые подвижные палочки с ригидной клеточной стенкой. Хемоорганогетеротрофы. Энергию получают за счет дыхания или брожения. В последнем случае образуют различные кислоты; выделение газообразных продуктов (CO_2 , H_2) характерно не для всех представителей семейства. Факультативные анаэробы. В основном обитатели морских и пресных вод. Есть среди представителей семейства и патогенные формы, например, возбудитель азиатской холеры — *Vibrio cholerae*.

Группа 9. Грамотрицательные анаэробные бактерии. Основная таксономическая единица группы — семейство *Bacteroidaceae*. Это палочки правильной формы или склонные к плеоморфизму, беспоровые, неподвижные или подвижные. Облигатные анаэробы. Хемоорганогетеротрофы. В состав семейства включено три рода (*Bacteroides*, *Fusobacterium* и *Leptotrichia*), различающихся конечными продуктами брожения. Бактерии рода *Bacteroides* при сбраживании глюкозы образуют смесь кислот, состоящую преимущественно из янтарной, уксусной, муравьиной, молочной и пропионовой кислот; масляная кислота содержится в незначительных количествах. *Fusobacterium* накапливает в качестве главного продукта брожения масляную кислоту, а *Leptotrichia* — молочную кислоту. Основное место обитания этой группы бактерий — кишечник человека и животных, пищеварительный тракт насекомых. Некоторые виды патогенны и вызывают различные поражения кожных покровов, а также других органов и тканей тела.

Группа 10. Грамотрицательные кокки и коккобациллы. Группа представлена одним семейством *Neisseriaceae*, в состав которого входят четыре рода: *Neisseria*, *Branchamella*, *Moraxella* и *Acinetobacter*. Это неподвижные кокки или палочки, образующие пары, цепочки или массовые скопления. Аэробы. Бактерии, относящиеся к трем первым родам, — паразитические формы, характеризующиеся потребностью в сложных питательных веществах. Представители рода *Acinetobacter* — сапрофиты. Бактерии рода *Neisseria* — пример высокоадаптированных к паразитическому образу жизни форм. Вне организма они быстро теряют жизнеспособность. Некоторые виды патогенны, например, *N. meningitidis* — возбудитель эпидемического менингита.

Группа 11. Грамотрицательные анаэробные кокки. В состав группы входит одно семейство *Veillonellaceae*. Кокковые формы диаметром 0,3—2,5 мкм. Как правило, соединены попарно, но могут образовывать

цепочки или скопления клеток. Анаэробные хемоорганогетеротрофы с высокими потребностями в питательных веществах. В эту группу входят только паразиты теплокровных животных: обитатели пищеварительного тракта, ротовой полости и дыхательных путей человека и животных.

Группа 12. Грамотрицательные хемолитотрофные бактерии. К этой группе относятся прокариоты, получающие энергию за счет окисления восстановленных неорганических соединений азота, серы, железа, марганца. Группа разделена на три подгруппы в зависимости от химической природы окисляемых неорганических соединений.

В первую подгруппу включены бактерии, объединенные в семейство Nitrobacteraceae, источником энергии для которых являются процессы окисления аммонийного азота или нитритов. В состав семейства входят морфологически разные формы: палочки, кокки, спириллы; подвижные и неподвижные формы. Хемолитоавтотрофы. Все — облигатные аэробы. Среди представителей семейства нет паразитических форм. Основные места обитания: почва, морские и пресные воды. Во вторую подгруппу объединены бактерии, для которых доказано получение энергии в результате процессов окисления восстановленных соединений серы (роды *Thiobacillus*, *Sulfolobus*), и бактерии, до сих пор не полученные в чистой культуре, но в клетках которых обнаружены гранулы серы (роды *Thiobacterium*, *Thiovulum*, *Thiospira*). В третью подгруппу (семейство Siderocapsaceae) отнесены бактерии, способные откладывать вне клетки окислы железа или марганца. Последние накапливаются в капсулах или во внеклеточном материале. В состав семейства, включены роды, различающиеся преимущественно морфологическими признаками. Поскольку большинство бактерий этого семейства не получено до сих пор в чистой культуре, многие стороны их метаболизма остаются неясными. Основные места обитания — железосодержащие воды.

Группа 13. Метанобразующие бактерии. Группа представлена одним семейством Methanobacteriaceae. Бактерии, объединенные в это семейство, однородны по физиологическим признакам: все они облигатные анаэробы; главный и характерный продукт энергетического метаболизма — метан. Источником энергии служат процессы окисления некоторых органических и неорганических соединений: H_2 , CO , метанол, муравьиная, уксусная кислоты, а основным акцептором электронов — углекислота. Морфологически группа разнородна. Места обитания: болота, различные очистные сооружения, рубец жвачных животных.

Группа 14. Грамположительные кокки. Группа подразделена на две подгруппы: в первую отнесены аэробные и (или) факультативно анаэробные формы (семейства Micrococccaceae, Streptococccaceae), во вторую — облигатные анаэробы (семейство Peptococccaceae). Бактерии, объединяемые в семейство Micrococccaceae, — кокки, делящиеся более чем в одной плоскости, склонные не расходиться после деления и поэтому образующие скопления сферической или неправильной формы. Аэробные или факультативно аэробные хемоорганогетеротрофы с различными потребностями в питательных веществах. Энергию получают за счет дыхания или брожения. В основном сапрофиты. Разрушая многие сложные органические вещества, выполняют функцию «мусорщиков». Есть среди представителей этого семейства и патогенные формы, преимущественно относящиеся к роду *Staphylococcus*.

В семейство Streptococccaceae объединены кокковидные формы, неподвижные, бесспорные, факультативно анаэробные хемоорганогетеротрофы.

гетеротрофы со сложными потребностями в питательных веществах. В состав семейства входят 5 родов, классификация которых осуществлена по морфологическим признакам и продуктам брожения: бактерии рода *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* относятся к группе гомоферментативных молочнокислых бактерий, бактерии рода *Leuconostoc* — к группе гетероферментативных молочнокислых бактерий.

В состав семейства *Peptococcaceae* входят облигатно анаэробные кокки. Брожение сопровождается выделением CO_2 и молекулярного водорода. Среди продуктов брожения обнаруживаются низшие жирные кислоты, в некоторых случаях янтарная кислота и этиловый спирт. Молочная кислота не является основным продуктом брожения. Представителей этого семейства можно обнаружить в почве, на поверхности злаков, в ротовой полости, желудочно-кишечном тракте и дыхательных путях человека и животных. Некоторые виды патогенны.

Группа 15. Палочки и кокки, образующие эндоспоры. Все представители группы объединены в одно семейство *Bacillaceae*, в состав которого входят 5 родов. Два из них (*Bacillus* и *Clostridium*) наиболее многочисленны и представляют наибольший интерес. Род *Bacillus* объединяет палочковидные клетки, размеры которых колеблются в довольно широких пределах (0,3—2,2×1,2—7,0 мкм). Большинство видов подвижны. Жгутики расположены в основном латерально. Характерно образование эндоспор. Окрашивание по Граму различно: положительно, отрицательно или положительно только в молодой культуре. Облигатные или факультативные аэробы. Бактерии рода *Bacillus* синтезируют различные литические ферменты, расщепляющие полисахариды, белки, жиры и другие макромолекулы. Некоторые виды образуют антибиотики, такие как бацитрацин, субтилизин. Большинство бацилл — сапрофиты. Основное место их обитания — почва. Есть среди них и патогенные для животных и человека формы, например, *B. anthracis* — возбудитель сибирской язвы, а также виды, вызывающие различные заболевания членистоногих.

В состав рода *Clostridium* входят палочки, отличающиеся от предыдущего рода формой спорообразования и облигатно анаэробным способом существования. Источник энергии в большинстве случаев — маслянокислое брожение. Большинство бактерий рода *Clostridium* — сапрофиты, обитатели почвы. Некоторые виды живут в кишечнике человека и животных. К этому роду относятся весьма опасные патогенные формы: *C. tetani* — возбудитель столбняка, *C. perfringens* и некоторые другие виды клостридиев — возбудители газовой гангрены, *C. botulinum* — продуцент экзотоксина, одного из самых сильных биологических ядов.

Группа 16. Грамположительные аспорогенные палочковидные бактерии. Эта небольшая группа бактерий представлена одним семейством *Lactobacillaceae*, в состав которого входит один род *Lactobacillus*. Бактерии этого рода получают энергию за счет гомоферментативного или гетероферментативного молочнокислого брожения. Представители рода *Lactobacillus* широко распространены в природе. Их можно обнаружить в почве, на разлагающихся остатках животного и растительного происхождения, в молоке и молочных продуктах, в кишечнике позвоночных. Лишь единичные представители рода *Lactobacillus* обладают патогенными свойствами.

Группа 17. Актиномицеты и родственные организмы. Сюда отнесены коринебактерии, семейство *Propionibacteriaceae* и порядок *Actinophycetales*, включающий 8 семейств.

К роду *Corynebacterium* относятся формы, склонные к морфоло-

гической изменчивости. Кроме коротких палочек в культуре можно обнаружить кокковидные формы, клетки, имеющие булавовидные выпячивания, слабоветвящиеся формы. Для представителей этого рода характерно образование фигур, состоящих из расположенных под углом или примыкающих друг к другу дочерних клеток. Большинство коринебактерий неподвижны. Все хемоорганогетеротрофы. Энергию получают за счет дыхания или брожения. Преимущественно облигатные аэробы, хотя есть и факультативно аэробные формы. В состав рода входят свободноживущие виды, а также паразиты человека и животных. Некоторые из них патогенные, например, *C. diphtheriae* — возбудитель дифтерии. Большая группа коринебактерий — возбудители болезней растений.

К группе коринебактерий отнесены и бактерии рода *Arthrobacter*, для которых характерна большая по сравнению с предыдущим родом тенденция к ветвлению и образованию кокковидных клеток. Культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, неправильной палочковидной формы; культуры же, перешедшие в стационарную фазу, состоят в основном или исключительно из кокковидных форм. При перенесении последних на свежую питательную среду происходит «удлинение» кокковидных клеток путем образования выпячиваний; у одной клетки может быть от двух до четырех таких выпячиваний, приводящих к появлению палочек неправильной формы или клеток с рудиментарным ветвлением. Виды в молодой культуре (на стадии палочек) неподвижны или подвижны, окраска по Граму в этот период может быть нечеткой, но у кокковых форм она положительна. Все виды — облигатно аэробные хемоорганогетеротрофы. Бактерии рода *Arthrobacter* — основные представители микрофлоры почвы, активно участвующие в разложении органических веществ.

В порядок Actinomycetales объединены бактерии, образующие ветвящиеся нити, а в некоторых семействах формирующие развитый мицелий. В последнем случае при выращивании актиномицетов на твердых питательных средах различают субстратный и воздушный мицелий. Субстратный мицелий развивается в толще агаризованной среды, над поверхностью которой разрастаются гифы воздушного мицелия. Бактерии, объединенные в порядок Actinomycetales, характеризуются разными способами размножения. Большинство актиномицетов размножаются с помощью спор, образующихся в специальных органах спороношения — спорангиях. Последние различаются строением (длинные или короткие, прямые или спиралевидные с разным числом завитков) и расположением (последовательное, супротивное, мутовчатое и др.). Эти признаки используют в классификации актиномицетов. Различают два типа образования спор: фрагментационный и сегментационный. При фрагментационном спорообразовании вокруг нуклеоидов, равномерно распределенных по гифе, обособляется цитоплазма, после чего формирующаяся спора окружается собственной оболочкой, при этом в течение некоторого времени сохраняется оболочка спорангия; освобождение спор происходит в результате ее разрыва. При сегментационном спорообразовании также наблюдается деление нуклеоида спороносящей гифы и обособление вокруг образовавшихся нуклеоидов цитоплазмы, за которым следует формирование поперечных перегородок, разделяющих нуклеоиды с цитоплазмой на отдельные клетки — споры. В этом случае при созревании спор спорангий распадается на отдельные сегменты — споры.

В восьмом издании Определителя бактерий Берги порядок Actinomycetales по морфологическим признакам, характерным для этой груп-

пы бактерий (способности к образованию истинного мицелия, строению мицелия, спор и спорангиев), разделен на восемь семейств. В семейство Actinomycetaceae входят грамположительные формы, образующие на некоторых стадиях развития ветвящиеся нити. Последние имеют тенденцию к быстрой фрагментации, в результате чего появляются кокковидные клетки и различные структуры неправильной формы. Представители этого семейства не образуют ни спор, ни мицелия. В состав семейства входят аэробные, анаэробные и факультативно аэробные формы. Деление на роды осуществляется в зависимости от химического состава клеточных стенок и продуктов сбраживания глюкозы. Большинство представителей семейства — сапрофиты, живущие в почве и использующие в качестве источников углерода и энергии широкий круг органических соединений. Некоторые виды патогенны.

Семейство Mycobacteriaceae представлено одним родом *Mycobacterium*. Микобактерии — грамположительные, неподвижные палочки, прямые или неправильных очертаний. В процессе развития палочковидные формы превращаются в кокковидные. Характерным морфологическим признаком микобактерий является образование ветвящихся форм. Степень ветвления зависит от вида бактерий и условий выращивания, в первую очередь, от состава питательной среды. Ветвление можно наблюдать только в молодых активно размножающихся культурах. У микобактерий (как и у предыдущего семейства) мицелий не образуется. На некоторых стадиях роста характерна повышенная устойчивость к кислотам и спиртам. Большинство микобактерий — сапрофиты, живущие в почве и использующие самые различные органические соединения (белки, углеводы, жиры, воск, парафины). Некоторые виды патогенны, например, *M. tuberculosis* — возбудитель туберкулеза, *M. leprae* — возбудитель проказы.

В состав семейства Frankiaceae (единственный род *Frankia*) входят нитевидные, образующие истинный мицелий бактерии, развивающиеся в качестве эндосимбионтов в корневых клубеньках небобовых растений. Для клубеньков показана способность фиксировать молекулярный азот. Бактерии этого рода могут существовать в почве и в качестве сапрофитов. Пока их не удалось вырастить на искусственной питательной среде.

Представители семейства Actinoplanaceae образуют четкий субстратный мицелий, иногда также и воздушный. Для актиномицетов, входящих в состав этого семейства, характерно формирование спорангиев разной формы, возвышающихся над поверхностью субстрата, внутри которых образуются споры. Форма спорангиев, количество и расположение в них спор различны; споры также неодинаковой формы, подвижные и неподвижные. Эти признаки легли в основу классификации актиномицетов семейства Actinoplanaceae на роды (рис. 48). Все актиномицеты, входящие в состав семейства, аэробные хемоорганогетеротрофы, сапрофиты или факультативные паразиты. Основные места обитания: почва, пресная вода, мертвые растительные и животные остатки.

Своеобразный тип мицелия характерен для актиномицетов семейства Dermatophilaceae: мицелиальные нити (гифы) делятся в продольном и поперечном направлениях, в результате чего образуется паренхиматозная масса клеток. У представителей рода *Dermatophilus* образующиеся клетки — подвижные споры кокковидной формы. У *Geodermatophilus* при распаде гиф высвобождаются неподвижные клетки кокковидной или кубовидной формы, которые могут сразу прорасти, давая нити, или же сначала сформировать подвижные споры (зооспо-

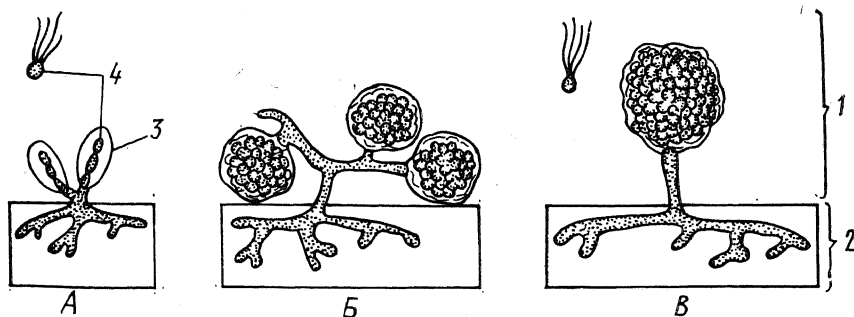


Рис. 48. Представители семейства Actinoplanaceae:
 А — *Dactylosporangium*; Б — *Stepptosporangium*; В — *Actinoplanes*; 1 —
 воздушный мицелий; 2 — субстратный мицелий; 3 — спорангий; 4 —
 споры (по Lechevalier, Pramer, 1971)

ры), которые затем переходят в покоящееся состояние и образуют нити. Все представители семейства — облигатно или факультативно аэробные хемоорганогетеротрофы с высокими потребностями в питательных веществах.

Актиномицеты семейства Streptomycetaceae образуют хорошо развитый воздушный мицелий, который в процессе последующего цикла развития не распадается на фрагменты (рис. 49). Размножение спо-

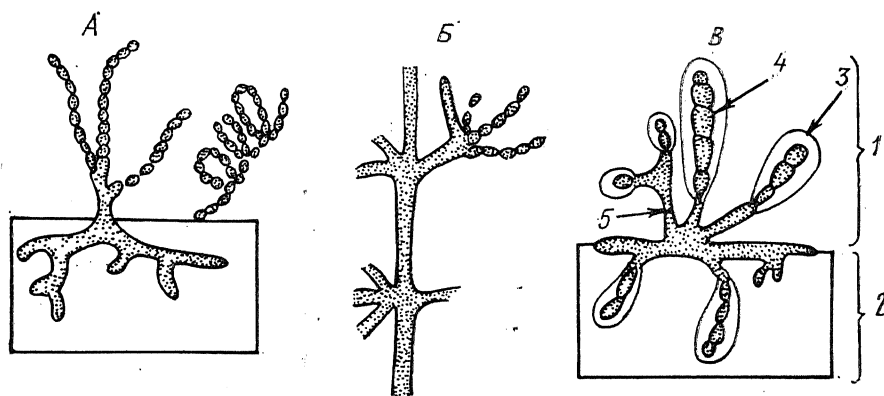


Рис. 49. Представители семейства Streptomycetaceae:
 А — *Streptomyces*; Б — *Streptoverticillium*; В — *Microellorosporia*; 1 — воз-
 душный мицелий; 2 — субстратный мицелий; 3 — спорангий; 4 — споры;
 5 — спорангионосная гифа (спорангиофор) (по Lechevalier, Pramer, 1971)

рами, формирующимися на концах гиф, или кусочками вегетативного мицелия. Актиномицеты, объединяемые в это семейство, — грамположительные, облигатно аэробные хемоорганогетеротрофы. Основным родом *Streptomyces* насчитывает около 500 видов, для которых характерно образование на воздушном мицелии прямых или спирально закрученных цепочек, состоящих из трех или более неподвижных спор. Многие стрептомицеты синтезируют антибиотики, активные против бактерий, грибов, водорослей, простейших, фагов, обладающие также противоопухолевым действием.

В состав семейства Micromonosporaceae входят актиномицеты, так же как и представители предыдущего семейства, формирующие устойчивый мицелий. За исключением актиномицетов рода *Micromonospora*, все актиномицеты этого семейства формируют оба типа мицелия (рис. 50). Размножение с помощью спор, единичных, образу-

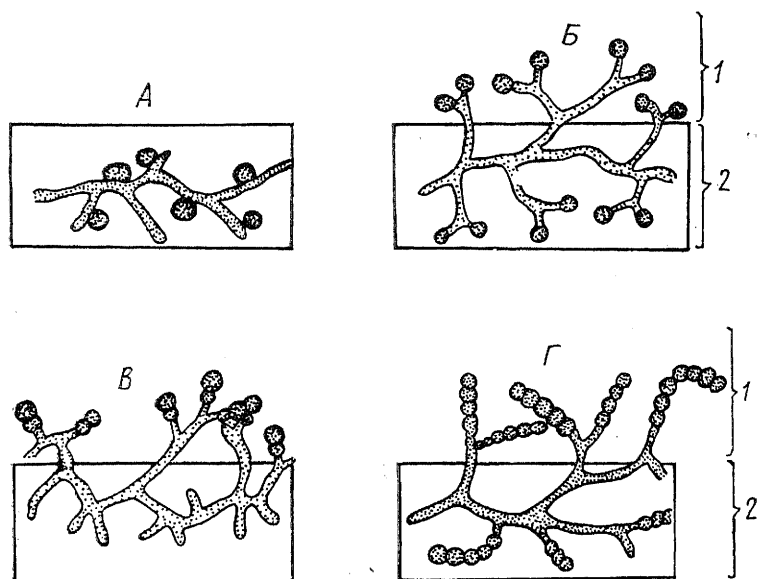


Рис. 50. Представители семейства Micromonosporaceae:
 А — *Micromonospora*; Б — *Actinobifida*; В — *Microbispora*; Г —
Micropolyspora; 1 — воздушный мицелий; 2 — субстратный мицелий (по Кучаевой, 1974)

ших пары или цепочки, содержащие до 20 спор. Спорангии отсутствуют. Споры располагаются непосредственно на гифах мицелия или на очень коротких спороносных гифах (спорофорах). Большинство представителей — облигатные аэробы, некоторые — факультативные аэробы; описаны виды, являющиеся анаэробами. Грамположительные хемоорганогетеротрофы. Грамвариабельность характерна для термофильных актиномицетов, объединенных в роды *Thermoactinomyces* и *Thermomonospora*. Преимущественно почвенные сапрофиты, реже — обитатели вод. В основу деления на роды положены различные типы спорообразования.

Группа 18. Риккетсии. В состав группы включены два порядка: Rickettsiales и Chlamydiales. Первый объединяет бактерии, характеризующиеся в большинстве случаев совокупностью следующих признаков: плеоморфные, неподвижные, грамотрицательные, с типичными для прокариот клеточными стенками, размножающиеся делением внутри клеток-хозяев; культивировать можно на специальных средах, содержащих живые или переживающие ткани, такие как куриные эмбрионы или культуры клеток позвоночных. Однако перечисленные выше признаки свойственны не всем представителям этого порядка. Так, среди риккетсий имеются подвижные виды, красящиеся положительно по Граму, а также виды, которые можно выращивать на относительно простых искусственных питательных средах. Различны взаимоотношения между риккетсиями и организмами-хозяевами. Помимо паразитизма эти отношения в некоторых случаях можно определить даже как мутуалистические. Среди риккетсий-паразитов большая часть относится к непатогенным и только меньшая вызывает заболевания человека, позвоночных и беспозвоночных животных (так называемые риккетсиозы). Успехи последнего времени, связанные с изучением риккетсий, позволили многое понять в биологии этих бактерий, но многое еще остается невыясненным.

Для риккетсий характерен ярко выраженный плеоморфизм. При неблагоприятных условиях возникают покоящиеся клетки с уплотненной клеточной стенкой и цитоплазмой, а также различные дегенеративные формы. У риккетсий описано размножение делением, наблюдающееся у кокковидных и палочковидных клеток, и дроблением. Последнее присуще нитевидным формам и приводит к образованию кокков и коротких палочек.

В клетках риккетсий обнаружены структурные элементы, типичные для бактериальной клетки: нуклеоид, цитоплазма, элементарная ЦПМ, трехслойная клеточная стенка (2,4+3,0+2,5 нм), рибосомы. Клетки окружены капсулоподобным образованием. У большинства риккетсий на клеточной поверхности имеются структуры типа ворсинок.

Все исследованные риккетсии обладают определенной активностью энергетических и биосинтетических процессов. У них найдена цитохромная система и показано запасание энергии, освобождающейся в процессе дыхания, в виде АТФ. Риккетсии могут осуществлять некоторые биосинтетические процессы, например биосинтез белка, липидов.

Порядок *Rickettsiales* делится на три семейства, в основу деления на которые положены признаки, определяющие специфичность существования риккетсий в организме-хозяине. Так, внутриклеточные паразиты, основное место размножения которых ткани или определенные органы членистоногих, объединены в семейство *Rickettsiaceae*. Риккетсии, входящие в состав семейства *Bartonellaceae*, обнаруживаются в основном в эритроцитах человека и других позвоночных или только у позвоночных животных. Могут культивироваться в бесклеточной среде. В семейство *Anaplasmataceae* отнесены очень мелкие риккетсиальные формы — облигатные паразиты различных диких и домашних животных, размножающиеся в плазме или в эритроцитах крови. Многие из них не могут культивироваться вне организма-хозяина.

Порядок *Chlamydiales* включает одно семейство *Chlamydiaceae* и один род *Chlamydia*. Хламидии — облигатные внутриклеточные паразиты позвоночных и человека, характеризующиеся сложным циклом развития. Могут размножаться только в цитоплазме клеток. Вне клеток их культивировать пока не удается. Это неподвижные кокковидные клетки, размер которых зависит от стадии цикла развития. Инфекционной формой являются мелкие клетки диаметром 0,2—0,4 мкм, называемые «элементарными тельцами». Они содержат компактный ядерный материал, рибосомные частицы и окружены жесткой клеточной стенкой, аналогичной таковой грамотрицательных бактерий.

После проникновения в клетку хозяина элементарные тельца размножаются внутри цитоплазматической вакуоли, образованной инвагинацией мембраны клетки хозяина. Цикл развития начинается с увеличения размеров элементарных телец, в результате чего образуются крупные клетки сферической формы диаметром 0,8—1,5 мкм. Этот процесс сопровождается перестройкой внутриклеточной структуры. Резко возрастает содержание РНК в клетке, ядерный материал становится менее плотным, а клеточная стенка тонкой. Крупные клетки размножаются делением, и образование их представляет собой неинфекционную вегетативную стадию в цикле развития хламидий. Через несколько генераций после формирования микроколонии размножение клеток прекращается, размеры их уменьшаются, формируются электронно-плотный ядерный материал и трехслойная клеточная стенка. Клетки превращаются в зрелые инфекционные элементарные тельца. После разрушения мембраны цитоплазматической вакуоли и стенки клетки хозяина элементарные тельца покидают клетку, проникают в

другие клетки организма и цикл развития повторяется. Элементарные тельца могут в течение некоторого времени сохранять жизнеспособность вне клеток и затем инфицировать организм хозяина.

Облигатный внутриклеточный паразитизм хламидий наложил специфический отпечаток на их метаболизм. Прежде всего это коснулось их энергетического метаболизма. Обладая способностью осуществлять определенные реакции окислительного характера (например, при добавлении необходимых кофакторов окислять глюкозу, пировиноградную и глутаминовую кислоты), хламидии не могут синтезировать высокоэнергетические соединения, и в первую очередь АТФ, поэтому они получили название «энергетических паразитов». Хламидии паразитируют в организме различных позвоночных (птиц, человека и других млекопитающих), вызывают у человека ряд заболеваний, например трахому, воспаления дыхательных органов.

Группа 19. Микоплазмы. К микоплазмам относятся существующие в природе прокариоты, у которых отсутствует клеточная стенка. Таксономическая значимость этого признака позволила все прокариоты, не имеющие клеточной стенки, выделить в группу, присвоив ей ранг класса. В восьмом издании Определителя Берги микоплазмы отнесены к классу Mollicutes порядку Mycoplasmatales⁵.

Отсутствие ригидной клеточной стенки повлекло за собой ряд морфологических, культуральных, цитологических особенностей, присущих этим микроорганизмам. Прежде всего для них характерен ярко выраженный полиморфизм. В культуре одного вида можно одновременно обнаружить крупные шаровидные тела, мелкие зерна, клетки эллипсоидной, дискообразной, палочковидной и нитевидной формы. Последние могут ветвиться, образуя структуры, подобные мицелиальным. Размеры крупных морфологических форм микоплазм достигают 10 мкм, размеры мелких структурных единиц, называемых «элементарными тельцами», находятся на границе или за пределами разрешающей способности светового микроскопа, составляя приблизительно 0,1—0,2 мкм.

Для микоплазм описаны различные способы размножения: бинарное деление, фрагментация крупных тел и нитей, сопровождающаяся освобождением большого числа кокковидных форм; процесс, сходный с почкованием.

В связи с тем что в культурах микоплазм описаны формы с наименьшими из всех известных клеточных микроорганизмов размерами, вероятно, именно микоплазмы можно считать наиболее простыми самостоятельно воспроизводящимися системами. Однако экспериментальное доказательство того, какие из наименьших полиморфных структур, обнаруженных у микоплазм, способны к самостоятельному воспроизведению, до сих пор не получено. Размеры мелких структур микоплазм, как указывалось выше, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа, поэтому визуально невозможно проследить за их размножением. Выделить однородную фракцию мелких частиц и показать их способность к размножению также пока не удалось. По проведенным подсчетам, теоретически наименьшая структурная единица, способная к самостоятельному воспроизведению на искусственной среде, не может иметь размеры меньше, чем сферическое тело диаметром 0,15—0,20 мкм или нить длиной приблизительно 13 мкм и диаметром примерно 20 нм. Все эти структуры встречаются в культурах микоплазм и, вероятно, могут рассматриваться как жизнеспособные репродуцирующиеся формы.

⁵ От греческих слов: *muse* — «гриб»; *plasma* — «плазма».

Клетки микоплазм окружены трехслойной ЦПМ толщиной приблизительно 7,5 нм. В цитоплазме расположен нуклеоид с нитями ДНК, рибосомные частицы; мезосомы никогда не выявляются. Клетки некоторых видов микоплазм окружены капсулой липидной, полисахаридной или липополисахаридной природы. Все эти особенности ультраструктуры микоплазм обнаруживаются у крупных форм, в микроформах они не просматриваются.

По объему генетической информации, содержащейся в геноме, микоплазмы занимают промежуточное положение между *E. coli* и Т-фагами. ДНК микоплазм представляет собой кольцевую хромосому, реплицирующуюся по полуконсервативному механизму. Нуклеотидный состав ДНК характеризуется низким содержанием гуанина и цитозина. У группы микоплазм в целом молярное содержание ГЦ колеблется в пределах 23—39%.

Отсутствие клеточной стенки привело к развитию у микоплазм более стабильной и эластичной ЦПМ по сравнению с ЦПМ бактериальных протопластов. Важная роль в обеспечении этих свойств принадлежит, по-видимому, холестерину — основному компоненту мембранных липидов паразитических микоплазм. Большая часть известных микоплазм для роста нуждается в экзогенном холестерине и других стеринах. Относительно недавно были обнаружены виды, не требующие для роста экзогенных стеринах. Это различие положено в основу деления порядка *Mycoplasmatales* на два семейства: *Mycoplasmataceae*, в котором объединены все стеринзависимые микоплазмы, и *Acholeplasmataceae*, куда вошли виды, не требующие для роста экзогенных стеринах. Отсутствие клеточной стенки обуславливает еще одну отличительную особенность микоплазм — их нечувствительность к антибиотикам, специфически действующим на бактериальную клеточную стенку, и в первую очередь к пенициллину и его аналогам.

Микоплазмы (особенно после обнаружения новых свободноживущих видов) представляют собой группу, чрезвычайно разнообразную с точки зрения физиолого-биохимических особенностей. Эти прокариоты могут расти на искусственных средах разной степени сложности (от простых минеральных сред до сложных органических) или только внутри организма-хозяина, из чего можно заключить, что диапазон их биосинтетических способностей весьма широк. Разнообразны и способы получения микоплазмами энергии. Среди них описаны виды, получающие энергию за счет окисления или сбраживания органических соединений (моно- и полисахаридов), а также, возможно, окисления неорганических соединений (железа, марганца). Описаны микоплазмы, являющиеся строгими аэробами и облигатными анаэробами, а также виды, растущие только в условиях высокой кислотности среды (ацидофилы) и повышенной температуры (термофилы).

Если раньше считали, что микоплазмы — в основном формы, паразитирующие на человеке и высших животных, то теперь представление о способах существования и распространения этой группы прокариот в природе значительно расширено. Микоплазмы находят в почве и сточных водах, они выделены из каменного угля и горячих источников. Помимо свободноживущих форм, способных расти как на чисто минеральных средах, так и сапрофитно, описаны микоплазмы, существующие в различных симбиотических ассоциациях с бактериями, низшими грибами, растениями, птицами, высшими животными и человеком. Формы симбиоза также разнообразны. Иногда это, вероятно, комменсализм, в большинстве случаев — типичный паразитизм. Многие паразитические формы микоплазм патогенны. Они являются воз-

будителями заболеваний растений, животных и человека, например, *M. pneumoniae* — возбудитель острых респираторных заболеваний и пневмоний у человека.

Семейство *Mycoplasmataceae* представлено одним родом *Mycoplasma*. Все представители этого семейства — хемоорганогетеротрофы, характеризующиеся высокими потребностями в питательных веществах и нуждающиеся для роста в экзогенном холестерине. Энергетический метаболизм ферментативного или окислительного типа. Использование глюкозы происходит по гликолитическому пути. У микоплазм, осуществляющих полное окисление энергетического субстрата, обнаружен функционирующий ЦТК и цепь переносчиков электронов.

В состав семейства *Acholeplasmataceae* также входит один род *Acholeplasma*, насчитывающий 5 видов стериннезависимых микоплазм. Наиболее хорошо изучена *A. laidlawii* — первая сапрофитная микоплазма, выделенная в 1936 г. из сточных вод Лондона. Сейчас в составе рода объединены свободноживущие сапрофитные микоплазмы, микоплазмы — паразиты млекопитающих и птиц; некоторые из них, возможно, патогенны. К этой же группе принадлежат микоплазменные организмы, особенности строения или удивительные свойства которых позволили отнести их в самостоятельные роды *Spiroplasma* и *Thermoplasma*. Из листьев citrusовых растений выделена *Spiroplasma citri*, образующая среди разнообразных морфологических форм спиралевидные нити. Особенностью строения этой микоплазмы является часто обнаруживаемый на мембране наружный слой, который, возможно, представляет собой модифицированную клеточную стенку или структуру, весьма напоминающую последнюю.

В 1970 г. из каменного угля, подверженного саморазогреванию, изолирован организм, морфологически и цитологически сходный с микоплазмами. Оптимальная температура роста — 59°, нижняя и верхняя границы роста — 45 и 62° соответственно; оптимальная кислотность — pH 2. Организм получил название *Thermoplasma acidophila* и был выделен в отдельный род. Изучение *T. acidophila* показало необычайную стабильность его мембраны по отношению к действию высокой температуры, низкого pH, литических ферментов, детергентов, осмотического шока. *T. acidophila* относят к группе архебактерий и рассматривают как одного из наиболее вероятных кандидатов в качестве ядерно-цитоплазматического компонента эукариотной клетки. Сходство *Thermoplasma* с эукариотами, помимо отмеченных ранее черт, дополняется обнаружением у нее гистоно- и актиноподобных белков. У *Thermoplasma* функционирует гликолитический путь катаболизма сахаров, приводящий к синтезу АТФ в реакциях субстратного фосфорилирования. В клетках этой микоплазмы обнаружены менахион, цитохромы типа *b*, *c*, *d*, цитохромоксидаза, что указывает на возможность функционирования электронтранспортной системы. Вопрос о возможности получения энергии этим организмом за счет окислительного фосфорилирования не ясен.

У растений описано около 40 болезней, возбудителями которых предположительно также являются микоплазмы.

Наконец, к сапрофитным микоплазмам относятся организмы, участвующие в окислении железа и марганца, принадлежащие к роду *Metallogenium*, *Gallionella*, *Siderococcus*, *Caulococcus*.

ГЛАВА 8

ПРОБЛЕМА ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИИ ЖИЗНИ. ВОЗНИКНОВЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ КЛЕТКИ

Согласно современным представлениям жизнь есть результат эволюции материи. Взгляды на происхождение жизни, ее развитие и сущность имеют длинную историю, но обсуждение этих вопросов до недавнего времени было предметом философских размышлений. Лишь в последние десятилетия решение этих вопросов было поставлено на экспериментальную основу и ответ на многие из них получен в лаборатории.

Развитие представлений о происхождении жизни

Попытки ответить на вопрос, что такое жизнь, вероятно, следует отнести к тому времени, когда человек стал человеком. В самых ранних дошедших до нас памятниках культуры древнейших цивилизаций в художественной форме отразились существовавшие тогда представления о возникновении живых существ. При раскопках в Уруке, городе, существовавшем в середине IV тысячелетия до нашей эры, была обнаружена ваза, на которой изображено, как из морских волн появляются растения, над растениями располагаются животные, затем — люди, а над людьми — изображение богини жизни и плодородия.

Сведения о том, как различные живые существа возникают из воды и гниющих остатков, можно найти в древних китайских и индийских рукописях, об этом рассказывают египетские иероглифы и клинописи Древнего Вавилона. В Древнем Египте существовало убеждение, что лягушки, жабы, змеи и даже крокодилы рождаются из слоя ила, который остается после разливов Нила. В Древнем Китае считали, что тля возникает на молодых побегах бамбука. Большое значение при этом придавалось теплу, влаге и солнечному свету. Убеждение в спонтанном зарождении живых существ из неживых материалов было воспринято философами Древней Греции и Рима как нечто само собой разумеющееся. Первоначально вера в самозарождение не связывалась с определенным миропониманием. Самозарождение воспринимали как очевидный, постоянно наблюдаемый в природе факт. И только значительно позднее под самозарождение стали подводить определенную теоретическую основу, толкуя его с материалистических или идеалистических позиций.

Один из древнегреческих философов Фалес Милетский (конец VII — начало VI в. до н. э.) подходил к пониманию происхождения жизни со стихийно-материалистических позиций, считая, что жизнь есть свойство, присущее материи. Для Фалеса Милетского материальным первоначалом, из которого естественным путем возник мир, была вода. На позициях материалистического толкования самозарождения жизни стоял древнегреческий философ Демокрит (460—370 гг. до н. э.). Согласно его теории материя построена из атомов, мельчайших, неде-

лимых, вечных и неизменных частиц, находящихся в движении, а жизнь возникла в результате взаимодействия сил природы, в особенности действия атомов огня на атомы влажной земли.

Противоположное идеалистическое толкование идеи самозарождения жизни связано с именем Платона (428/427—347 гг. до н. э.). Платон считал, что сама по себе растительная и животная материя не является живой. Живой она становится только тогда, когда в нее вселяется бессмертная душа — «психея». Эта идея Платона оказалась очень жизнеспособной. Ее воспринял и Аристотель (384—322 гг. до н. э.), учение которого легло в основу всей средневековой научной культуры и господствовало около двух тысяч лет. В работах Аристотеля приводятся многочисленные «факты» самозарождения живых существ: растений, насекомых, червей, лягушек, мышей, некоторых морских животных. Необходимые условия для этого — наличие разлагающихся органических остатков, навоза, испорченного мяса, различных отходов, грязи. Аристотель подвел под эти «факты» определенное теоретическое толкование, рассматривая внезапное появление живых существ как результат воздействия некоего духовного начала на безжизненную, косную материю.

В средние века идеи о возникновении живых существ из неживой материи подкреплялись новыми «фактами». Я. ван Гельмонт, голландский естествоиспытатель, известный своими исследованиями по питанию растений, предложил способ получения мышей, согласно которому, если открытый кувшин набить нижним бельем, загрязненным попом, и добавить туда некоторое количество пшеницы, то приблизительно через три недели появляется мышь, «поскольку закваска, находившаяся в белье, проникает через пшеничную шелуху и превращает пшеницу в мышь».

Развитие науки в эпоху Возрождения с ее экспериментальным подходом к изучению явлений природы поставило на повестку дня пересмотр с новых позиций идеи самозарождения живых существ. Итальянский врач Ф. Реди (F. Redi, 1626—1698) решил проверить, действительно ли, как это всеми считалось, «черви» (личинки мух) зарождаются из гниющего мяса. Для этого он уложил мясо в три банки, одну из которых оставил открытой, вторую накрыл тонкой марлей, а третью — пергаментом. Все три куска мяса начали гнить, но «черви» появились только в открытой банке. Этим простым экспериментом Ф. Реди показал, что «черви» не возникли из гниющего мяса, а появились лишь там, где мухи могли откладывать яйца непосредственно на мясо. Опыты Ф. Реди впервые серьезно поколебали господствовавшую идею самозарождения макроскопических организмов.

После открытия А. ван Левенгуком микроорганизмов именно они стали основным объектом спора о зарождении жизни, поскольку наиболее логичным представлялось, что в первую очередь к самозарождению способны наиболее примитивно устроенные живые существа. Сам А. ван Левенгук отрицательно относился к возможности зарождения микроорганизмов из неживой материи. В одном из писем Лондонскому Королевскому обществу он писал: «Я полагаю, что мы уже можем быть достаточно уверены в том, что все животные, как бы малы ни были зарождаются не в результате процессов гниения, а только размножением себе подобных».

Английский натуралист Дж. Нидхем (J. Needham, 1713—1781) попытался экспериментально ответить на этот вопрос. Дж. Нидхем поставил серию опытов, которые сводились к тому, что он готовил в стеклянных колбах разные настои, кипятил их в течение нескольких

минут, затем закрывал обычными пробками. Через несколько дней в сосудах появлялись микроорганизмы. Это привело его к заключению о спонтанном возникновении микроорганизмов из неживого органического вещества, т. е. о возможности самопроизвольного зарождения на уровне низших живых существ.

Опыты Дж. Нидхема повторил итальянский естествоиспытатель Л. Спалланцани (L. Spallanzani, 1729—1799). Его опыты внешне не отличались от опытов Дж. Нидхема, за исключением того, что Л. Спалланцани закрывал сосуд пробкой не после, а до кипячения, а само кипячение длилось не несколько минут, как в опытах Дж. Нидхема, а значительно дольше — от 30 мин до 1 ч. В таких сосудах после выдерживания в течение нескольких дней не было обнаружено никаких микроорганизмов. Л. Спалланцани сделал вывод, что в опытах Дж. Нидхема микроорганизмы в настоях появлялись, или попадая туда из воздуха (поскольку сосуды закрывали обычными пробками после кипячения), или погибали не все первоначально содержащиеся в настоях микроорганизмы из-за недостаточно длительного кипячения. (В первую очередь это относится к наиболее термоустойчивым формам бактерий — спорам.) Л. Спалланцани под микроскопом удалось наблюдать деление микроба на две одинаковые дочерние клетки, каждая из которых также делилась на две клетки. Все сказанное позволило итальянскому ученому утверждать, что и микроорганизмы возникают не в результате самозарождения, а происходят от себе подобных. Выводы Л. Спалланцани, однако, не поколебали веры Дж. Нидхема и его сторонников в самозарождение. Дж. Нидхем объяснил отрицательные результаты, полученные Л. Спалланцани, тем, что тот подвергал свои настои слишком жесткой обработке, в результате которой разрушалась их «жизненная сила».

Окончательный конец спору о самозарождении микроорганизмов положил Л. Пастер. Серией четко поставленных опытов он доказал, что микроорганизмы не возникают самопроизвольно. Особенно изящными были его опыты, проведенные в колбах с S-образными горлами (рис. 51). В такие колбы наливали подсахаренную дрожжевую воду.

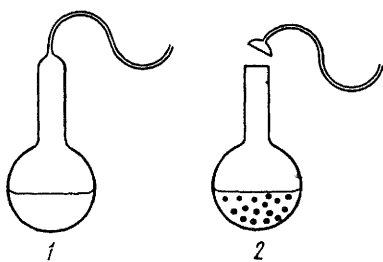


Рис. 51. Опыт Л. Пастера в колбах с S-образными горлами:
1 — колба с подсахаренной дрожжевой водой; после стерилизации и охлаждения остается стерильной в течение длительного времени; 2 — та же колба через 48 ч после удаления изогнутого горла; наблюдается рост микроорганизмов (по Kenyon, Steinman, 1972)

Если колбы прокипятить, а затем осторожно охладить, то они остаются стерильными неопределенно долгое время, несмотря на то, что не закрыты пробками. Если же удалить S-образный участок горла, то спустя несколько дней в такой колбе будет наблюдаться бурное развитие микроорганизмов. Через S-образное горло непрогретый воздух может легко поступать в колбу, но содержащиеся в воздухе микроорганизмы задерживаются в изгибах горла, оседая в его нижнем колене. После удаления S-образной части горла микроорганизмы прямо попадают в колбу, начинается их быстрый рост. Этим простым опытом Л. Пастер опроверг возражение о разрушении при нагревании таинственной «жизненной силы», содержащейся в питательной среде и в обычном (непрогретом) воздухе. Он неопровержимо доказал, что са-

мозарождение» в большинстве опытов происходит в результате попадания в стерилизованные питательные среды микроорганизмов из воздуха.

Позднее идеи о самозарождении возникли уже в XX в. по отношению к субмикроскопическим живым частицам — вирусам. Однако и в этом случае было доказано, что вирусы не зарождаются из невирусного материала, а происходят только от себе подобных частиц, т. е. вирусов. Таким образом, хотя теория самозарождения была убедительно опровергнута на разных уровнях организации живых организмов, вопрос о происхождении жизни оставался открытым. Основной вывод, который можно сделать из рассмотренного выше материала, заключается в том, что в настоящее время (имеется в виду отрезок времени достаточной исторической протяженности) спонтанное возникновение жизни невозможно. Однако это не ответ на вопрос о происхождении жизни.

Точно так же не является ответом на вопрос и гипотеза о внеземном происхождении жизни и занесении ее на Землю в виде каких-то спор или зародышей с другой планеты¹. Эта гипотеза не объясняет первоначального возникновения этих спор или зародышей, а просто истоки жизни выносит в просторы Вселенной. В настоящее время ни у кого не вызывает сомнения возможность существования жизни в других частях Вселенной, однако вероятность занесения на Землю живых организмов из космического пространства не имеет пока никаких подтверждений.

Итак, на вопрос о возможности самозарождения живых существ из неживой материи был получен отрицательный ответ, и в этом огромная заслуга Л. Пастера. Однако многими современниками Л. Пастера его опыты, опровергавшие возникновение живых существ (микроорганизмов) из неживой материи, были восприняты как абсолютное доказательство полной невозможности зарождения живых организмов из неорганической природы². Это поставило в тупик тех исследователей, которые видели в самозарождении единственный путь возникновения жизни.

В XX в. внимание к этой проблеме было привлечено советским биохимиком А. И. Опариным. В 1924 г. он выступил с гипотезой, в которой изложил новый подход к вопросу о происхождении жизни. А. И. Опарин постулировал, что биологический синтез органических веществ происходит только на современном этапе существования Земли. В условиях первобытной безжизненной Земли на ней могли происходить химические (абиогенные) синтезы углеродистых соединений и их последующая предбиологическая эволюция. В результате этой эволюции происходило постепенное усложнение органических соединений, формирование из них пространственно обособленных систем и превращение последних в предшественников жизни, а затем

¹ В конце XIX — начале XX в. большой популярностью пользовалась гипотеза панспермии, согласно которой живые организмы были занесены на Землю из космического пространства. Особенно привлекательно выглядела идея занесения их с метеоритами или космической пылью. Гипотеза панспермии была сформулирована в 1865 г. немецким исследователем Г. Рихтером (H. Richter) и поддержана С. Аррениусом (S. Arrhenius) и Г. Гельмгольцем (H. Helmholtz). В наше время эту идею с учетом достижений науки и техники, и в первую очередь освоения человеком космического пространства, модернизировали Ф. Крик и Л. Оргелл (L. Orgel), предположившие доставку зародышей жизни (микроорганизмов) на нашу планету из другой, более развитой цивилизации на космическом корабле.

² Сам Л. Пастер допускал возможность существования каких-то неизвестных условий, при которых могло произойти спонтанное зарождение жизни. В 1878 г. он писал, что не считает самозарождение в принципе невозможным.

и в первичные живые организмы. В последующие годы идеи, сформулированные А. И. Опариным, получили широкое признание и были подкреплены солидным экспериментальным материалом.

Большинством исследователей в настоящее время принимается, что жизнь возникла на нашей Земле в ранний период ее существования и есть результат длительной эволюции, в течение которой происходила цепь достаточно вероятных процессов, так что в этом может просматриваться некая закономерность. Если раньше все теории происхождения жизни были в высшей степени гипотетичными, то теперь благодаря успехам, достигнутым за последние десятилетия, можно утверждать, что разработаны экспериментальные подходы к решению этой проблемы.

Конечно, вопрос о происхождении жизни — проблема общепроизводственная. Более того, плодотворное его решение возможно только в комплексе с другими науками, такими как химия, геология, палеонтология, физика. Почему же этому вопросу так много внимания уделяется в курсе микробиологии? На это можно ответить словами К. ван Нила: «...он (микробиолог) имеет дело с биологическим материалом, по-видимому, достаточно близким к «истокам жизни», и в то же время несет прямую ответственность за тупик, созданный вследствие того, что ему не удалось доказать самопроизвольное зарождение».

Условия на древней Земле

Считается, что видимая нами Вселенная существует 10—15 млрд. лет, а наша Земля возникла приблизительно 4,5—5 млрд. лет назад. Согласно широко распространенным в настоящее время представлениям образование Земли произошло путем аккумуляции холодных твердых тел (планетозималий). Первоначально Земля была довольно однородной и ее последующее изменение происходило в направлении дифференциации исходного гомогенного вещества на кору, мантию и ядро. Этот период, в течение которого происходило формирование Земли как единого твердого тела, завершился примерно 4,6 млрд. лет назад. Для понимания процесса возникновения и эволюции жизни необходимо представлять, каковы были условия на Земле, в которых оказалось возможным «самозарождение» жизни. В последующий после формирования Земли период на ней происходили активные геологические процессы, менявшие ее облик и приводившие к формированию земной коры, гидросферы и атмосферы.

На первобытной Земле основная масса воды находилась в связанном гидратированными породами состоянии, поэтому первоначально Мировой океан содержал меньше 10% того количества воды, которое содержат современные океаны. Остальные 90% образовались позднее за счет выделения паров воды из внутренних слоев Земли. Считается, что рН Мирового океана на протяжении всей истории Земли был довольно стабильным, колеблясь в пределах 8—9. Формирование Мирового океана происходило, таким образом, постепенно, в тесной связи с формированием земной коры.

С формированием последней связано и образование атмосферы первобытной Земли, которая принципиально отличалась от современной атмосферы. По существующим представлениям, атмосфера древней Земли, т. е. та атмосфера, в которой развивалась жизнь, имела восстановительный характер. Она содержала главным образом водо-

род и его соединения (метан, аммиак, пары воды), в меньшем количестве — сероводород, азот, двуокись углерода и благородные газы. Эта атмосфера была лишена свободного (молекулярного) кислорода. Возникновение атмосферы, содержащей молекулярный кислород (кислородной атмосферы), произошло значительно позднее и связано с жизнедеятельностью фотосинтезирующих организмов. Отсутствие свободного кислорода в первобытной атмосфере Земли имело принципиальное значение, поскольку органические вещества, образующиеся в этом процессе, не могли бы синтезироваться и сохраняться на протяжении геологических периодов в присутствии кислорода.

Исходным материалом для синтеза органических веществ служили широко распространенные во Вселенной химические элементы: углерод, водород, кислород, азот, сера и фосфор. Однако синтез биологически важных молекул из этих элементов мог происходить только при условии обеспечения реакций свободной энергии, источником которой на первобытной Земле (так же, как и на современной) были солнечное излучение, электрические разряды, тепловая энергия земных недр и радиоактивное излучение. Наиболее мощный из них — солнечное излучение. Поскольку молекулярный кислород в первобытной атмосфере Земли практически отсутствовал, не было и озонового экрана, существующего в современной атмосфере на высоте примерно 25 км от поверхности Земли и сильно поглощающего коротковолновую часть ультрафиолетового излучения. Можно представить, что значительная часть коротковолнового ультрафиолета проникала через атмосферу первобытной Земли и достигала ее поверхности, поэтому в условиях древней Земли длинноволновая часть солнечного излучения играла небольшую роль.

Возможность образования органических веществ на первобытной Земле

Последовательность процессов возникновения органических веществ разной степени сложности можно представить следующим образом:

1. В результате действия всех видов энергии из химических элементов синтезировались первичные соединения: углеводороды (в первую очередь метан), аммиак, цианистый водород, окись углерода, сероводород, простейшие альдегиды (и прежде всего формальдегид) и т. д. Эти соединения сами по себе не имели биохимического значения. Основным их свойством была высокая реакционная способность.

2. Первичные соединения служили исходными веществами для образования биохимически важных органических соединений — мономеров.

3. Из мономеров путем конденсации возникали полимеры — основные составные компоненты всех живых организмов.

В свое время А. И. Опарин и Дж. Холдейн (J. Haldane) высказали предположение о возможности моделирования процессов, происходивших на древней Земле. Это можно делать путем создания в лаборатории условий, имитирующих условия, существовавшие на первобытной Земле. Выдвинутое положение стимулировало разработку экспериментальных подходов к изучаемой проблеме и оказалось весьма плодотворным. В настоящее время ряд процессов абиогенного синтеза сложных органических молекул, входящих в состав клеточных организмов, осуществлен в лабораторных условиях.

Одним из первых провел опыты по абиогенному синтезу биохимически важных соединений С. Миллер (S. Miller, 1953). Через газовую смесь, содержащую метан, аммиак, молекулярный водород и пары воды, т. е. имитирующую атмосферный состав первобытной Земли, он пропускал электрические разряды, а затем анализировал образующиеся продукты реакции. Схема прибора С. Миллера приведена на рис. 52. В реакционную колбу, содержащую смесь газов, были вмон-

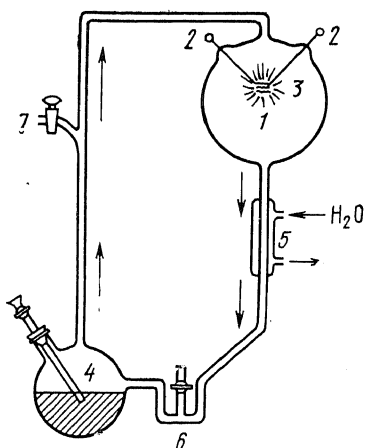


Рис. 52. Схема прибора С. Миллера:
 1 — реакционная колба; 2 — вольфрамовые электроды; 3 — искровой разряд; 4 — колба с кипящей водой; 5 — холодильник; 6 — ловушка; 7 — кран, через который в аппарат подается газовая смесь (по Кенyon, Steinman, 1972)

тированы вольфрамовые электроды. В течение недели пропускали искровые разряды напряжением 60 000 В. Содержащуюся в другой малой колбе воду поддерживали в состоянии кипения. Пары воды проходили через реакционную колбу и конденсировались в холодильнике. В процессе циркуляции они захватывали из реакционной колбы продукты реакции и переносили их в ловушку, где и осуществлялось их концентрирование. При идентификации продуктов реакции были обнаружены аминокислоты (глицин, α - и β -аланин, саркозин, α -аминомасляная, глутаминовая и аспарагиновая кислоты) и органические кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая, гликолевая, молочная). По данным С. Миллера, основными первичными продуктами реакции в зоне разряда являются альдегиды и цианистый водород. Вторичные реакции, происходящие в водной фазе, приводят к образованию из них аминокислот и органических кислот.

В настоящее время в разных лабораториях осуществлен абиогенный синтез многих биологически важных мономеров. Большая информация получена относительно абиогенного синтеза аминокислот (табл. 16). Перечисленные в таблице аминокислоты образуются в простых по составу газовых или водных смесях в результате воздействия на них разными источниками энергии. При некотором усложнении реакционной смеси введением в нее C_2 -, C_3 -углеводородов, уксусного альдегида, гидросиламина, гидразина и других соединений, образование которых легко происходит в условиях первобытной Земли, синтезируется значительно большее число аминокислот, в том числе и таких, которые не были обнаружены в качестве продуктов реакции в газообразных и водных смесях простого состава. К настоящему времени экспериментально доказано, что почти все аминокислоты, входящие в состав природных белков, можно получить в лаборатории при имитации условий первобытной Земли.

Абиогенный синтез аминокислот

Реагирующие вещества	Фаза	Источник энергии	Обнаруженные аминокислоты
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$	газовая	электрические разряды	аспарагиновая, аланин, глицин, диаминоянтарная, валин, гистидин, пролин, лизин, серин, аспарагин, аргинин, орнитин, глутаминовая, цистеин, таурин, цистамин
$\text{CO}_2, \text{NH}_3, \text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$	та же	тот же	
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}, \text{H}_2, \text{CO}_2, \text{CO}, \text{N}_2$	»	рентгеновские лучи	
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$	»	ультрафиолет	
$\text{NH}_3, \text{HCN}, \text{H}_2\text{O}$	водная	тепло (70°)	
$\text{CH}_4, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$	газовая	β -лучи	
$\text{CH}_2\text{O}, \text{N}_2, \text{H}_2\text{O}$	водная	солнечный свет	
$\text{H}_2\text{S}, \text{NH}_3, \text{H}_2\text{O}$	та же	быстрые электроны	

В разных условиях и при воздействии разными источниками энергии из формальдегида абиогенным путем удалось синтезировать приблизительно 30 видов моносахаров (гексоз, пентоз, тетроз, триоз). Абиогенный синтез низших жирных кислот был обнаружен уже в опытах С. Миллера. Синтез жирных кислот, содержащих до 12 углеродных атомов, продемонстрирован после воздействия электрическими разрядами на смесь метана и воды. Неясным пока остается образование высших жирных кислот — компонентов биологических мембран. Абиогенное образование пуриновых оснований ввиду относительной сложности строения их молекулы представлялось весьма сомнительным. Однако испанский исследователь Дж. Оро (J. Oro) показал возможность синтеза аденина при нагревании водного раствора смеси HCN и NH_3 . Позднее были получены абиогенным путем и другие пуриновые основания. Дж. Оро удалось также синтезировать урацил из простых органических молекул.

Важный шаг на пути химической эволюции — синтез нуклеозидов и нуклеотидов, и в первую очередь адениновых. Американскому биохимику К. Поннамперума (С. Роппатрегута) удалось показать, что при облучении ультрафиолетом смеси водных растворов аденина и рибозы при температуре 40° в присутствии фосфорной кислоты происходит реакция конденсации, приводящая к образованию аденозина. Если реакцию проводить при добавлении к реакционной смеси этилметафосфата, имеет место образование также и нуклеотидов: АМФ, АДФ, АТФ. Функция фосфорных соединений в этих химических синтезах двоякая: они играют каталитическую роль и могут непосредственно включаться в продукты реакции. Абиогенный синтез АТФ, представляющий собой результат нескольких относительно простых химических реакций, говорит о возможном раннем появлении

этого соединения. Первые живые структуры могли получать АТФ из окружающей среды.

Следующий этап предбиологической эволюции — дальнейшее усложнение органических соединений, связанное с полимеризацией мономеров. Все живые клетки состоят из четырех основных типов макромолекул: белков, нуклеиновых кислот, липидов и полисахаридов. Из них белки и нуклеиновые кислоты являются самыми сложными веществами клетки. На возможных путях их абиогенного возникновения мы коротко остановимся. Образование олигопептидов могло происходить непосредственно из аминокислот в результате реакции конденсации при действии определенного вида энергии или в присутствии конденсирующего агента или же минуя стадию аминокислот непосредственно из реакционноспособных предшественников аминокислот.

Наибольший интерес представляют данные в пользу возможности абиогенного синтеза высокомолекулярных пептидов (полипептидов). С. Фокс (S. Fox) осуществил опыты по термической сополимеризации смеси, состоящей из 18 природных аминокислот. Нагревание безводной смеси аминокислот в течение 6—10 ч при 170—180° приводило к образованию полипептидов, выход которых в зависимости от условий составлял 5—40%. Проведение реакции в присутствии фосфорной или полифосфорной кислот ускоряло процесс полимеризации и позволяло снизить температуру опыта до 65°, а его продолжительность — до 1 ч.

Анализ структуры и состава полученных полимеров показал, что в них входят 18 аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Относительная молекулярная масса синтезированных полимеров колеблется от 3000 до 10 000. Особенностью первичной структуры этих полимеров является обнаруженная у них определенная последовательность аминокислотных остатков в цепи, обусловленная, вероятно, структурными особенностями самих аминокислот.

Полученные С. Фоксом полимеры обладали многими свойствами, сближающими их с природными белками: служили источником питания для микроорганизмов, гидролизовались протеиназами, при кислотном гидролизе давали смесь аминокислот, обладали каталитической активностью и способностью к образованию микросистем, отграниченных от окружающей среды мембраноподобными поверхностными слоями. Из-за большого сходства с природными белками эти высокомолекулярные полипептиды были названы *протейноидами* (белкоподобными веществами).

Принципиальная возможность образования полинуклеотидов без участия ферментов была показана Г. Шраммом (G. Schramm). Синтез полинуклеотидов осуществляли путем фосфорилирования и конденсации нуклеотидов и нуклеозидов при температуре 60° и в присутствии фосфорилирующих агентов. Образующиеся полимеры содержали от 60 до 200 нуклеотидов в цепи и имели относительную молекулярную массу 15 000—50 000. Так были получены полиадениловая, полиуридилловая, полицитидилловая кислоты и их сополимеры. Таким образом, экспериментально показано, что в условиях первобытной Земли был возможен химический синтез биологически важных соединений (мономеров и полимеров), послуживших исходным материалом для построения всех организмов.

В заключение отметим, что синтез перечисленных выше биологически важных соединений был в некотором роде «биохимически предопределенным». Поясним это на следующем примере. В табл. 16 показано образование аминокислот в неодинаковых условиях при воз-

действию разными источниками энергии. Однако все реакции приводили к синтезу сходных органических соединений, т. е. направление процесса определялось не столько условиями, в которых он осуществлялся, сколько природой реагирующих молекул. Данный принцип лежит в основе всего процесса химической эволюции. Естественно, что это накладывало определенное ограничение на спектр возникающих органических соединений. Возможно, что исходно он был шире, но сохранились только те соединения, которые оказались химически более стабильными, т. е. прошли через некий «химический отбор». Понятие «химический отбор» не предполагает обязательного конфликта («борьбы за существование») между органическими молекулами. Имеется в виду лишь то, что судьба каждой из них определялась степенью устойчивости в условиях окружающей среды, и «преимущество» получали те из них, которые были более устойчивыми. Менее устойчивые быстро распадались, выбывая из фонда накапливающихся органических соединений.

Возникновение пространственно обособленных микросистем

Химическая эволюция соединений углерода могла привести только к накоплению органического вещества в гидросфере древней Земли, которая представляла собой раствор, содержащий органические и неорганические компоненты («первичный бульон»).

Для клеточной жизни характерно, что она всегда представлена в виде определенных структур, пространственно обособленных от внешней среды, но постоянно взаимодействующих с ней по типу открытых систем. Поэтому можно предполагать, что следующим этапом эволюции на пути возникновения жизни было формирование определенной структурной организации абиогенно синтезированных органических соединений. Этот этап эволюции также не является в настоящее время плодом умозрительных построений. Пространственно обособленные открытые системы можно получить экспериментальным путем из различных исходных компонентов.

С. Фокс, охлаждая растворенные в воде протеиноиды, получил микроскопические частицы, названные им микросферами, которые обладали определенной внутренней организацией и рядом интересных, с биологической точки зрения, свойств. Голландский исследователь Х. Г. Б. де Йонг (H. G. B. de Jong), смешивая раствор гуммиарабика и желатины, наблюдал формирование микроскопических структур, названных им коацерватными каплями. Позднее было показано, что коацерваты возникают в результате объединения различных полимеров, например полипептидов и полинуклеотидов, при этом для получения коацерватов основное значение имеет не специфичность внутримолекулярного строения образующих их компонентов, а степень их полимеризации. Такие пространственно обособленные открытые системы, построенные из полимеров и обладающие, как это будет показано, способностью к росту и отбору, были названы прото клетками, или протобионтами (пробионтами). Рассмотрим коротко некоторые свойства микросфер, взяв их в качестве модели прото клетки, поскольку весь ход предыдущего изложения позволяет представить процесс эволюции в виде следующих последовательных этапов: аминокислоты → протеиноиды → микросферы (прото клетки) → первичные клетки → современные прокариотные клетки.

Протеиноидные микросферы имеют сферическую форму, диаметр

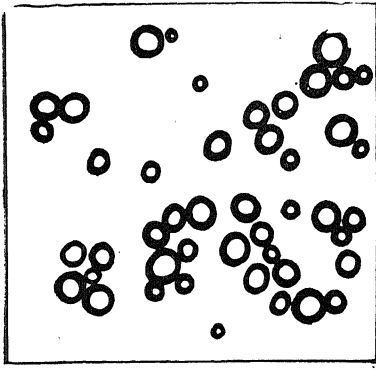


Рис. 53. Протеиноидные микросферы С. Фокса (по Фох, 1965)

их в зависимости от условий получения колеблется от 0,5 до 7 мкм (рис. 53). По величине и форме они напоминают кокковые формы бактерий, иногда образуют цепочки, похожие на цепочки стрептококков. Каждая микросфера содержит около 10^{10} молекул протеиноида. Протеиноидные микросферы обладают определенной стабильностью: не разрушаются при центрифугировании, в солевых растворах устойчивее многих препаратов коацерватных капель. Их стабильность позволила приготовить препараты для электронной микроскопии, на которых уда-

лось рассмотреть некоторые детали ультраструктуры микросфер. При изменении условий внешней среды наблюдали движение материала внутри частицы от центра к периферии, деление микрочастицы и образование двойного пограничного слоя. Окрашивание по Граму обнаружило, что микросферы, образованные из кислотных протеиноидов, грамотрицательны; микросферы, в состав которых входят в достаточном количестве основные протеиноиды, грамположительны. Из других свойств, присущих микросферам и представляющих интерес с эволюционной точки зрения, можно указать на существование у них барьеров с избирательной проницаемостью; способность к делению и почкованию; подвижность, возрастающую после добавления к суспензии микросфер АТФ; способность к росту путем наращивания массы микрочастицы; тенденцию к контактированию друг с другом. В протеиноидных микросферах найдена ферментоподобная активность, которой обладали образующие их протеиноиды. Однако этот вопрос для микросфер нуждается в дальнейшем исследовании, поэтому проблему каталитической активности в протоклетках мы разберем на модели коацерватных капель.

Интенсивные исследования по изучению коацерватных капель как модели доклеточной организации были проведены А. И. Опариным с сотрудниками. Обычно коацерватные капли получают, сливая растворы противоположно заряженных коллоидов, например желатин и гуммиарабика, гистона и РНК, гистона и желатин и т. д. При смешивании исходно гомогенных растворов каждого компонента образуются сферические частицы. Концентрация полимеров в частице на один-два порядка выше, чем в окружающем растворе. Коацерватные капли отделены от раствора четко выраженной поверхностью, способны избирательно поглощать из среды некоторые вещества, такие, как аминокислоты, сахара, мононуклеотиды, и выделять в среду продукты протекающих в них реакций.

Один из наиболее интересных опытов с коацерватными каплями состоял в том, что в коацерваты, образованные из гистона и гуммиарабика, вводили фермент фосфорилазу, а затем эти капли помещали в раствор глюкозо-1-фосфата. Коацерватные капли поглощали из раствора глюкозо-1-фосфат, и в них осуществлялось ферментативное превращение глюкозо-1-фосфата в крахмал, за счет скопления которого увеличивались размеры капли. Если в коацерватные капли вводить два фермента (фосфорилазу и β -амилазу), то в них имеет место последовательное ферментативное превращение глюкозо-1-фосфата в

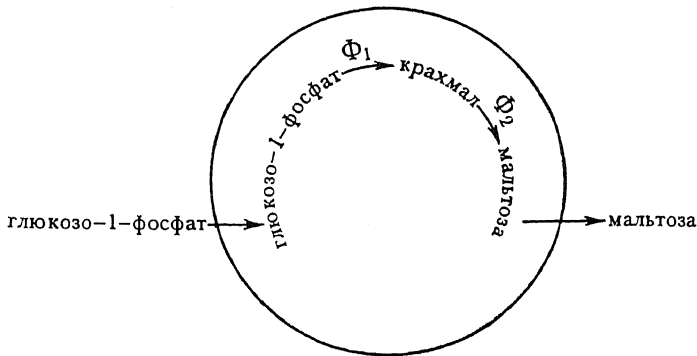


Рис. 54. Синтез и гидролиз крахмала в коацерватной капле:
 Φ_1 — фосфорилаза; Φ_2 — β -амилаза (по Опарину, 1976)

крахмал и крахмала в мальтозу, которая диффундирует из капли в раствор (рис. 54). Из приведенного примера наглядно видно, что коацерватные капли являются хорошей моделью открытой системы. Они способны поглощать из окружающей среды вещества и энергию, преобразовывать их в продукты синтеза или распада; продукты синтеза входят в состав капли, обеспечивая ее рост, а продукты распада выделяются в среду. Скорости ферментативных реакций в коацерватных каплях существенно выше, чем в гомогенных растворах. Особенно четко различие в скоростях проявляется при сочетании действия двух ферментов. Опыты с коацерватами показали важность надмолекулярной структурной организации в живых системах и, в частности, ее значение для функционирования клеточных катализаторов.

На модели коацерватных капель была показана связь между уровнем внутренней организации капель и их способностью к росту. Оказалось, что в одинаковых условиях капли, обладающие более совершенной экспериментально созданной внутренней организацией, растут быстрее, чем капли, внутренняя организация которых менее совершенна. Для последних характерны также меньшая стабильность и более быстрый распад. Естественно, что дальнейшая судьба обоих типов коацерватных капель неодинакова. Очевидно преимущество коацерватов, обладающих большей стабильностью в условиях окружающей среды и более длительным временем существования. В этом можно видеть проявление новой закономерности, возникшей на этапе образования и развития пространственно обособленных открытых систем (протоклеток). Этот этап можно рассматривать как переходный от химической эволюции к биологической, и соответственно возникающая закономерность может быть определена как предбиологический естественный отбор (по А. И. Опарину).

Новые пространственно обособленные системы с определенным уровнем структурной организации приобрели и новые свойства, отсутствующие у образующих их органических соединений. Эти свойства (зачатки метаболизма, способность к самоподдержанию структуры и росту) присущи более высокому уровню организации материи, поэтому их можно рассматривать как зачатки тех свойств, дальнейшее развитие которых в совокупности привело к возникновению живых организмов.

Эволюция протоклетки на пути возникновения первичной клетки

Из всей совокупности процессов, приведших к появлению первичной живой клетки, мы остановимся только на двух, с нашей точки зрения основных: возникновении и эволюции каталитической активности и появлении матричного синтеза.

Возникновение и эволюция каталитической активности

Как можно видеть из изложенного выше, уже пространственно обособленные открытые системы обладали примитивным метаболизмом в том смысле, что их структурная организация создавала благоприятные условия для протекания определенной последовательности биохимических реакций. Одни из продуктов этих реакций ассимилировались протоклеткой, другие выделялись в среду. Как следствие этого происходило увеличение объема и массы протоклеток, приводящее к их последующему дроблению («делению») и образованию дочерних протоклеток. Возникшие дочерние протоклетки, вероятно, до известной степени сохраняли специфичность своего взаимодействия с внешней средой, поглощая из нее определенные компоненты и подвергая их превращениям также в определенном направлении. Если в ряду поколений протоклеток сохранялось относительное постоянство их свойств, его можно рассматривать как формирование способности закреплять («наследовать») определенные признаки. Находясь под постоянным давлением предбиологического естественного отбора, протоклетки эволюционировали в сторону совершенствования своих метаболических способностей, т. е. определенными преимуществами обладали те протоклетки, «метаболический аппарат» которых был более приспособлен к условиям внешней среды, приводил к более активному обмену с ней, а отсюда и к более интенсивному разрастанию популяции определенного типа протоклеток.

Известно, что в основе метаболизма современных клеток лежит совершенный каталитический аппарат. Поэтому эволюционное развитие протоклеток, прежде всего, связано с развитием и совершенствованием их каталитических активностей. Первыми катализаторами, доступными для протоклеток, были относительно простые органические и неорганические соединения внешней среды. Хорошо известна способность солей ряда металлов ускорять реакции переноса водорода. Каталитическая активность этих неорганических соединений очень невысока. Оказалось, что ее можно существенно повысить при сочетании неорганических соединений с некоторыми органическими молекулами. Например, ионы железа могут в незначительной степени ускорять реакции переноса водорода. Если железо ввести в порфириновое кольцо, каталитическая активность этого комплекса будет в 1000 раз выше, чем каталитическая активность ионов железа. Можно представить, что аналогичный путь усовершенствования простых катализаторов имел место в процессе эволюции протоклеток. При этом следует подчеркнуть, что эволюция каталитической активности могла иметь место только в условиях включения этих катализаторов в систему метаболического аппарата протоклетки. (Молекулы катализаторов, находящиеся просто в растворе, эволюционировать не могут, так как самим молекулам их способность хуже или лучше катализировать определенные реакции не создает каких-либо преимуществ по

сравнению с молекулами, не обладающими каталитической активностью.) Действию отбора подвергались целостные системы — прото-клетки, и если каталитические функции возникшего комплекса создавали протоклетке определенные преимущества, последняя лучше росла, размножалась и, следовательно, на определенном этапе эволюции доминировал именно этот тип протоклеток.

Примером комплексов, возникших в результате сочетания различных молекул (органических и неорганических), могут быть современные коферменты. Число известных коферментов невелико, но они являются универсальными, присущими всем живым организмам катализаторами. Универсальность современных коферментов говорит об их раннем возникновении в процессе формирования метаболического аппарата, а их стабильность на протяжении столь длительного процесса эволюции — о наилучшем из всех возможных вариантов соответствия выполняемым функциям. Протоклетки, будучи предельно гетеротрофными, вначале, вероятно, просто заимствовали сложные коферменты из внешней среды и только значительно позднее у них (или у более совершенных клеток) развилась способность к самостоятельному синтезу коферментов.

Дальнейшее усложнение метаболизма потребовало более четкого согласования последовательностей составляющих его биохимических реакций. Коферменты, обладающие каталитической активностью значительно более низкой, чем современные ферменты, и не обладающие свойством субстратной специфичности, на определенном уровне развития клеточного метаболизма не могли отвечать необходимым требованиям. Поэтому они были заменены или дополнены более мощными и совершенными катализаторами — ферментами. Вероятно, первым в процессе эволюции у предшественников современных ферментов появилось свойство каталитической активности, а свойство субстратной специфичности возникло значительно позднее. В качестве предшественников современных ферментов можно рассматривать простые пептиды. В настоящее время имеются экспериментальные данные, подтверждающие способность пептидов ускорять определенные реакции, в частности, реакции гидролиза, аминирования различных соединений, а также реакции карбоксилирования α -кетокислот. Эволюция ферментных белков из предшественников — простых пептидов — прошла длительный путь в направлении наилучшего приспособления их первичной, вторичной и третичной структур к выполняемым функциям.

Возникновение матричного синтеза

Как известно, в современных клетках функции ДНК заключаются в получении, хранении и передаче информации последующим поколениям. Без ДНК и РНК невозможно точное воспроизведение всех свойств клетки, в основе которых лежит функционирование специфических белков. В модельных опытах была показана относительная простота и легкость возникновения пространственно обособленных систем, построенных из протеиноидов, характеризовавшихся определенным постоянством аминокислотных последовательностей. Это могло служить указанием на то, что информация о полипептидах типа протеиноидов была заключена в них самих, а следовательно, подводило к выводу о том, что на начальном этапе эволюции протоклетки могли воспроизводиться и передавать информацию потомству без участия нуклеиновых кислот.

Дальнейшее усложнение структуры и совершенствование функ-

ции полипептидов приводило к появлению в них определенных аминокислотных группировок, которым в какой-то степени была присуща полезная для протоклетки каталитическая активность. Однако возникновение более «совершенного» полипептида создавало преимущество для породившей его протоклетки только в том случае, если появившееся определенное сочетание аминокислотных остатков в полипептиде могло быть закреплено при разрастании этой протоклетки, т. е. передано дочерним протоклеткам. Если же этого не могло происходить, то возникшее «удачное» сочетание аминокислотных остатков в полипептиде терялось при последующем разрастании протоклеток. Таким образом, для дальнейшей эволюции протоклеток необходимо было создание специального аппарата, который обеспечивал бы в ряду их поколений достаточно точное воспроизведение полипептидов с определенно закрепленным расположением аминокислотных остатков. Это привело к формированию принципиально нового механизма синтеза — матричного синтеза, в основе которого лежит использование свойств нового класса органических соединений — полинуклеотидов.

Свойством полинуклеотидных молекул является способность к точному воспроизведению, основанная на принципе структурной комплементарности. В модельных опытах было показано, что полинуклеотидная цепь может служить матрицей, связывающей свободные нуклеотиды. При смешивании АМФ с полиуридиловой кислотой свободные молекулы АМФ связываются с остатками полиуридиловой кислоты при помощи водородных связей между комплементарными основаниями. В результате возникала спиральная структура. Точно так же наблюдали формирование устойчивой комплементарной спирали при смешивании полицитидиловой кислоты с гуанозинмонофосфатом. Для синтеза комплементарных полинуклеотидов необходимо было, чтобы между связанными с матрицей мононуклеотидами образовались межнуклеотидные связи. Экспериментально была показана принципиальная возможность возникновения таких связей без какого-либо участия ферментов. Таким образом, полинуклеотиды могли служить матрицей для неферментативного синтеза комплементарных полинуклеотидов.

Вопрос о том, каким путем в молекулах полинуклеотидов возникла и закрепились информация о структуре белков, остается наиболее неясным. Имеются данные об избирательном взаимодействии между двумя типами полимеров — полиаминокислотами и полинуклеотидами — в зависимости от их аминокислотного и нуклеотидного состава, на основании чего высказывается предположение, что в принципе полиаминокислоты и полинуклеотиды могли «узнавать» друг друга в протоклетках. Образование специфических комплексов между этими полимерами можно рассматривать как первый необходимый шаг на пути установления между ними определенных «информативных» связей. Не исключено также, что на первых этапах поток информации шел в любом направлении (полинуклеотид \rightleftharpoons протобелок) и, таким образом, устанавливались взаимные связи между определенными последовательностями аминокислот в протобелках и нуклеотидов в полинуклеотидах. Позднее поток информации стал однонаправленным (полинуклеотид \rightarrow протобелок).

Таким образом, дискуссионным остается вопрос о том, на каком этапе эволюционного процесса нуклеиновые кислоты сформировались как информационные молекулы. Согласно одним представлениям на начальном этапе эволюции роль последних выполняли белковоподоб-

ные молекулы, и первые примитивные клетки функционировали без нуклеиновых кислот. (Этому варианту было уделено основное внимание ввиду его значительно большей экспериментальной обоснованности.) Другая гипотеза исходит из того, что первыми возникли нуклеиновые кислоты, а позднее, на базе содержащейся в них информации, возникли белки (гипотеза «геной жизни»).

Эта гипотеза принадлежит американскому генетику Г. Меллеру (H. Muller), высказавшему предположение, что «жизнь» началась с абиогенного образования гена или группы генов. Появление мембран и белков, обладающих каталитическими свойствами, имело место на более поздних этапах эволюции. В пользу этой гипотезы приводятся соображения, первое из которых основано на современном представлении о молекулярной структуре и самовоспроизведении вирусов, а второе — на полифункциональных свойствах мононуклеотидов. Хорошо известно, что нуклеотиды, помимо того что составляют генетический аппарат клетки, принимают участие в самых разнообразных метаболических реакциях: служат переносчиками энергии (АДФ, АТФ), электронов и атомов водорода (НАД, НАДФ, ФМН, ФАД), сахаров, ацильных групп и др.

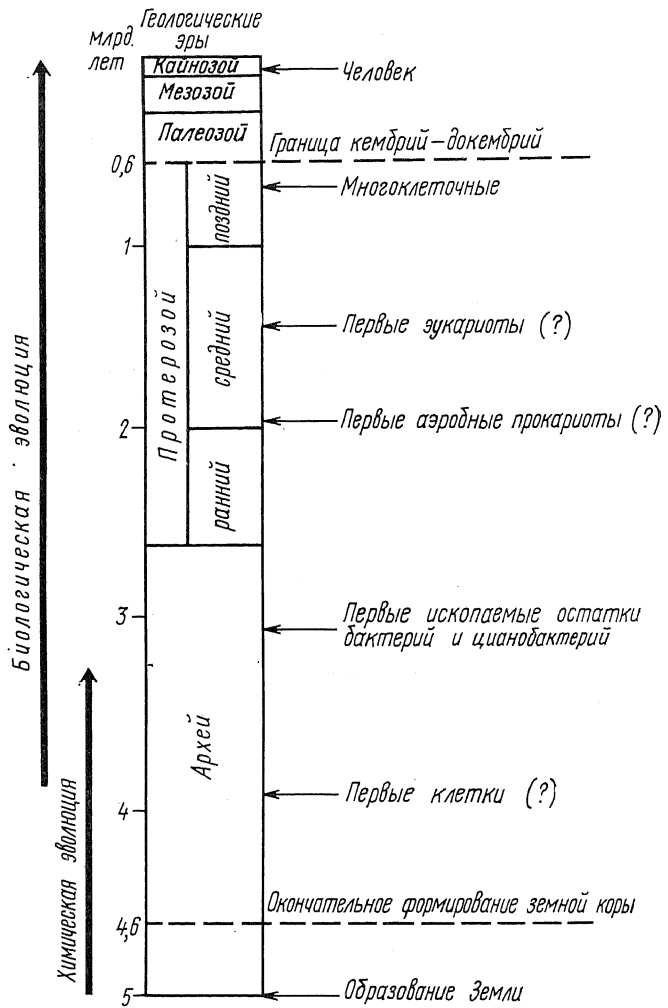
Формы жизни, возникшие на «белковой основе», были неустойчивыми из-за отсутствия системы передачи информации, использующей свойства нуклеиновых кислот, а «геной жизнь» не могла прогрессивно эволюционировать без участия белков, обладающих каталитическими свойствами. Как произошло возникновение формы жизни, в основе которой лежат белки и нуклеиновые кислоты, пока неизвестно. Ясно только, что «встреча» обоих типов соединений положила начало пути эволюции, на котором произошло формирование механизмов синтеза белка и нуклеиновых кислот и кодовых взаимодействий между обоими механизмами.

Данные палеонтологии о происхождении жизни на Земле

Согласно современным представлениям окончательное формирование земной коры произошло около 4,6 млрд. лет назад. Наши сведения об истории возникновения и развития жизни на Земле ограничены преимущественно последним периодом, длительность которого порядка 600 млн. лет. Остальной временной период, составляющий примерно 90% всей истории существования Земли, фактически является чистой страницей в изучении возникновения и развития жизни на Земле. Поэтому большой интерес представляют данные молекулярной палеонтологии, изучающей органические вещества древнейших осадочных отложений. Трудность заключается в интерпретации полученных результатов, т. е. в отсутствии надежных критериев, на основании которых можно было бы делать выводы о происхождении обнаруженных органических остатков: биогенном или абиогенном. В этой связи интересны находки, сделанные в Южной Африке в осадочных породах, возраст которых составляет больше 3 млрд. лет. В этих породах найдены заключенные в них окаменелые остатки мельчайших структур, напоминающих современные бактерии. Эти палочковидные микроструктуры ($0,5 \times 0,25$ мкм) получили название *Eobacterium isolatum*. При электронно-микроскопическом изучении у них выявлена двухслойная клеточная стенка, подобная клеточной стенке многих современных бактерий.

В породах, возраст которых также около 3 млрд. лет, обнаружены строматолиты, своеобразные известковые образования, являющиеся согласно существующим взглядам, продуктами жизнедеятель-

ности древних фотосинтезирующих организмов — цианобактерий, или сине-зеленых водорослей. Если принять, что найденные в породах ископаемые остатки действительно принадлежат древнейшим прокариотам или являются продуктами их жизнедеятельности, то следует признать, что к этому времени уже были сформированы некоторые типы жизни, которые дошли до нас в виде ее «следов». Отсюда приходится сделать вывод, что впервые земная жизнь должна была возникнуть в промежутке между 3 и 4,6 млрд. лет тому назад. Схематическое изображение во времени отдельных этапов эволюции представлено на рис. 55.



Цианобактериям мы обязаны появлением молекулярного кислорода в атмосфере Земли. Однако вначале весь выделяемый ими O_2 поглощался земной корой, в которой происходили интенсивные процессы окисления. По имеющимся геологическим данным, содержание кислорода в атмосфере достигло 1% от его содержания в современной атмосфере только в среднем протерозое, и к этому времени можно отнести возникновение первых аэробных прокариот. В пользу этого свидетельствуют обнаруженные в отложениях, возраст которых около 2 млрд. лет, звездчатые образования, свойственные облигатно аэробной свободноживущей микоплазме *Metallogenium*. Этот организм откладывает на поверхности клеток окислы железа. В природе встречается при разных концентрациях O_2 , но всегда в аэробных условиях, так что может служить индикатором молекулярного кислорода.

Рис. 55. Схематическое изображение во времени отдельных этапов биологической эволюции (по Опарину, 1976; Fox, Dose, 1975; Lehninger, 1974)

III. ЭВОЛЮЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У ПРОКАРИОТ

ГЛАВА 9

ТИПЫ ЖИЗНИ, ОСНОВАННЫЕ НА СУБСТРАТНОМ ФОСФОРИЛИРОВАНИИ

Метаболические пути формировались в процессе эволюции. Наиболее примитивным способом получения энергии, присущим определенным группам прокариот, являются процессы брожения.

Общая характеристика процессов брожения

«Брожение» — это сугубо микробиологический термин. Он характеризует энергетическую сторону способа существования нескольких групп прокариот, при котором они осуществляют в анаэробных условиях окислительно-восстановительные превращения органических соединений, сопровождающиеся выходом энергии, которую эти организмы используют. Поскольку брожение протекает без участия молекулярного кислорода, все окислительно-восстановительные превращения субстрата происходят за счет его «внутренних» возможностей. Процесс брожения связан с такими перестройками органических молекул субстрата, в результате которых на окислительных этапах процесса высвобождается часть свободной энергии, заключенной в молекуле субстрата, и происходит ее запасание в молекулах АТФ. В процессе брожения, как правило, происходит расщепление углеродного скелета молекулы субстрата.

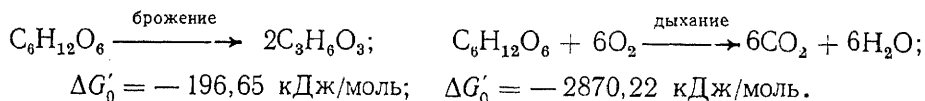
Круг органических соединений, которые могут сбраживаться, довольно широк. Это углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты, пурины, пиримидины. Однако требования, предъявляемые к субстратам брожения, больше тех, которые предъявляются к окисляемым субстратам. Химическое вещество может быть подвергнуто сбраживанию, если оно содержит неполностью окисленные (или восстановленные) углеродные атомы. В этом случае есть возможность для окислительно-восстановительных преобразований между молекулами (или внутри одного вида молекул), возникающими из субстрата. В результате одна часть продуктов брожения будет более восстановленной, другая — более окисленной по сравнению с субстратом. Продуктами брожений являются различные органические кислоты (молочная, масляная, уксусная, муравьиная), спирты (этиловый, бутиловый, пропиловый), ацетон, а также CO_2 и H_2 . Обычно в процессе брожения образуется несколько продуктов. В зависимости от того, какой основной продукт накапливается в среде, различают молочно-

кислое, спиртовое, маслянокислое, пропионовокислое и другие виды брожений.

Следовательно, в каждом виде брожения можно выделить две стороны: окислительную и восстановительную. Процессы окисления сводятся к отрыву электронов от определенных метаболитов с помощью специфических ферментов (дегидрогеназ) и акцептированию их другими молекулами, образующимися из сбраживаемого субстрата, т. е. в процессе брожения происходит окисление анаэробного типа.

Энергетическая сторона

Собственно энергетической стороной процессов брожения является их окислительная часть, поскольку реакции, ведущие к выделению энергии, — это реакции окисления. Существует несколько исключений из этого правила: некоторые анаэробы часть энергии при сбраживании субстрата получают также в результате его расщепления, катализируемого лиазами. Примитивность процессов брожения заключается в том, что из субстрата в результате его анаэробного преобразования извлекается лишь незначительная доля той химической энергии, которая в нем содержится. Продукты, образующиеся в процессе брожения, все еще содержат в себе значительное количество энергии, заключавшейся в исходном субстрате. Чтобы четче представить разницу в энергетическом выходе процессов брожения и дыхания, приведем данные по изменению уровней стандартной свободной энергии для процессов гомоферментативного молочнокислого брожения и дыхания при одинаковом исходном энергетическом субстрате (глюкоза):

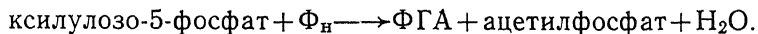


В процессе гомоферментативного молочнокислого брожения синтезируются 2 молекулы АТФ на 1 молекулу сброженной глюкозы; в процессе дыхания при полном окислении молекулы глюкозы образуется 38 молекул АТФ. В обоих случаях эффективность запасания выделяющейся энергии в макроэргических связях АТФ приблизительно одинакова.

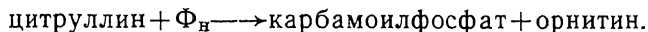
При брожении некоторые реакции на пути анаэробного преобразования субстрата связаны с наиболее примитивным типом фосфорилирования — субстратным фосфорилированием. К синтезу АТФ по механизму субстратного фосфорилирования ведут катаболические реакции, которые в зависимости от своей химической природы могут быть разделены на два типа. Большинство относится к окислительно-восстановительным реакциям. Богатые энергией соединения возникают в процессе брожения на этапах анаэробного окисления. Например, окисление фосфоглицеринового альдегида (ФГА), катализируемое ФГА-дегидрогеназой, приводит к образованию богатого энергией метаболита — 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК). Анаэробное окисление пировиноградной или α -кетоглутаровой кислот приводит к образованию высокоэнергетических метаболитов — ацетил-КоА или сукцинил-КоА соответственно.

Второй тип реакций связан с расщеплением субстратов или промежуточных продуктов, образующихся из них. Катализируются эти

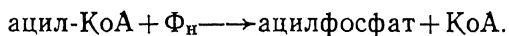
реакции ферментами, относящимися к классу лиаз. Например, у гетероферментативных молочнокислых бактерий высокоэнергетический ацетилфосфат образуется из ксилулозо-5-фосфата в реакции, катализируемой фосфокетолазой:



К реакциям подобного типа относится также расщепление цитруллина, приводящее к синтезу карбамоилфосфата, соединения с макроэргической фосфатной связью:



Богатые энергией соединения, образующиеся в реакциях рассмотренных выше типов, представляют в большинстве случаев ангидриды фосфорной кислоты или тиоэфиры органических кислот. Последние используются для синтеза АТФ через ферментативную стадию образования соответствующих ацилфосфатов:

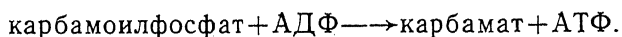


Из других высокоэнергетических соединений важное место в энергетике процессов брожения принадлежит фосфоенолпировиноградной кислоте (ФЕП). Эти соединения характеризуются тем, что свободная энергия, освобождающаяся при их гидролизе, находится в области значений от -35 до -88 кДж/моль и с помощью соответствующих ферментов может быть перенесена на молекулы АДФ.

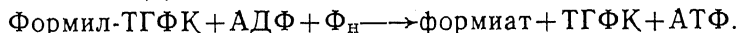
Несмотря на большое число углеродных субстратов, доступных для сбраживания, количество реакций, приводящих непосредственно к синтезу АТФ при брожениях, сравнительно невелико. Наиболее распространены следующие из них:

- 1) ацетилфосфат + АДФ \rightarrow ацетат + АТФ;
- 2) 1,3-фосфогли- + АДФ \rightarrow 3-фосфогли- + АТФ;
цериновая кислота цериновая кислота
- 3) фосфоенол- + АДФ \rightarrow пировиноград- + АТФ.
пировиноград- ная кислота
ная кислота

Другие реакции субстратного фосфорилирования ограничены какими-либо специфическими видами брожений. Например, сбраживание некоторых пиримидинов и аргинина, осуществляемое отдельными видами бактерий из рода *Streptococcus*, приводит к образованию карбамоилфосфата, фосфатная группа которого переносится на АДФ в реакции, катализируемой карбаматкиназой:



Один вид клостридиев (*C. cylindrosporum*), сбраживающий пурины, способен образовывать формиат и тетрагидрофолат (ТГФК) из формилтетрагидрофолиевой кислоты в реакции, сопровождающейся фосфорилированием АДФ:



Для этого вида указанная реакция служит основным путем получения АТФ.

Все реакции субстратного фосфорилирования локализованы в цитозоле клетки. Это указывает на простоту химических механизмов, лежащих в основе субстратного фосфорилирования.

Проблема акцептора электронов

Основная проблема всех процессов брожения — проблема акцептора электронов. В конечном итоге степень окисления и сопряженное с этим количество выделяемой свободной энергии, а также характер образующихся продуктов определяются природой конечных акцепторов электронов. При брожениях конечными акцепторами электронов служат в основном органические соединения: метаболиты, образующиеся из исходных субстратов (пировиноградная кислота, ацетальдегид), или вещества, имеющиеся в среде культивирования (некоторые аминокислоты и другие органические соединения, способные восстанавливаться). В ряде брожений акцепторами электронов служат молекулы CO_2 , а также ионы водорода (H^+). Кроме того, в отдельных случаях дополнительными акцепторами электронов могут быть некоторые достаточно окисленные неорганические соединения, такие как нитрат, молекулярная сера. Если конечным акцептором электронов является ацетальдегид, образуется этанол, если пируват — молочная кислота. Акцептирование электронов молекулами CO_2 приводит у разных видов к возникновению формиата или ацетата, если же эту функцию выполняют ионы водорода, образуется молекулярный водород (H_2).

Восстановленные соединения, акцептировавшие электроны, выделяются из клеток прокариот в окружающую среду и накапливаются в ней в значительных количествах. Из-за низкого энергетического выхода процессов брожения для обеспечения энергией всех функций и биосинтетических процессов клетке приходится перерабатывать огромные количества субстратов.

Итак, брожение — это способ получения энергии, при котором АТФ образуется в процессе анаэробного окисления органических субстратов в реакциях субстратного фосфорилирования.

Гомоферментативное молочнокислое брожение

Изложение процессов брожения мы начнем предположительно с эволюционно самого древнего и примитивного — гомоферментативного молочнокислого брожения. Последовательность биохимических реакций, лежащих в основе гомоферментативного молочнокислого брожения, получила также название гликолитического пути (гликолиза)¹, фруктозо-дифосфатного пути, или пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, по именам исследователей (Н. Embden, О. Meyerhof, Я. О. Парнас), внесших большой вклад в изучение этого процесса. Общая схема гомоферментативного молочнокислого брожения представлена на рис. 56.

Основными энергетическими ресурсами для прокариот, осуществляющих гомоферментативное молочнокислое брожение, служат моносахара (в первую очередь, глюкоза) и дисахара (мальтоза, лактоза). В процессе подготовки к энергетическим преобразованиям дисахара ферментативным путем расщепляются до моносахаров. Различные моносахара, прежде чем подвергнуться преобразованиям, должны превратиться в глюкозо-6-фосфат. Момент унификации, т. е. превращения различных субстратов в один, исходный для дальнейшего его мета-

¹ Собственно гликолиз — это определенная последовательность ферментативных реакций от углевода до пировиноградной кислоты, поэтому, строго говоря, «гликолиз» не является синонимом «гомоферментативного молочнокислого брожения», но 10 из 11 реакций у этих процессов идентичны.

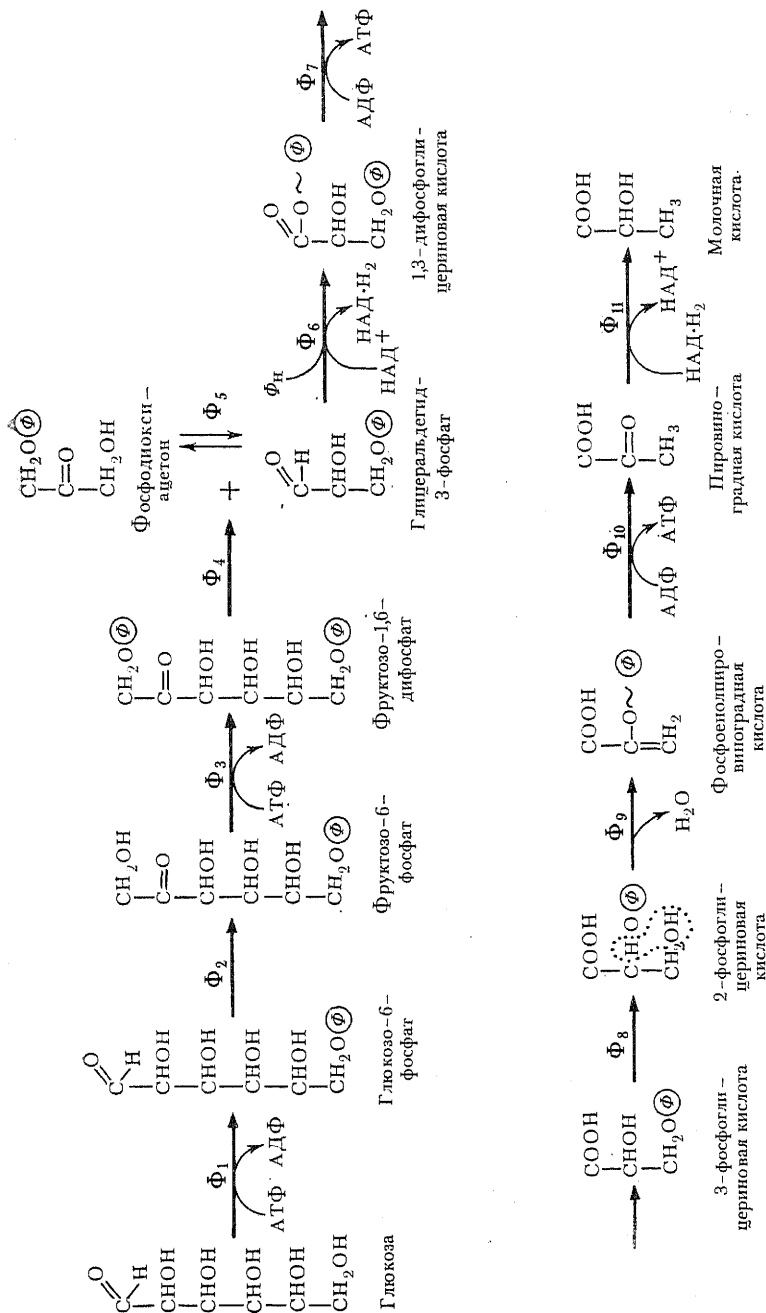


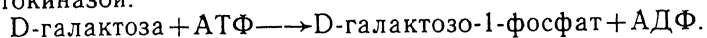
Рис. 56. Общая схема гомоферментативного молочнокислого брожения: Φ_1 — гексокиназа; Φ_2 — глюкозофосфатазиомераза; Φ_3 — фосфофруктокиназа; Φ_4 — фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза; Φ_5 — триозофосфатазиомераза; Φ_6 — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа; Φ_7 — фосфолицираткиназа; Φ_8 — фосфоглицеромутаза; Φ_9 — ендолаза; Φ_{10} — пируваткиназа; Φ_{11} — лактатдегидрогеназа (по Dayley, Nicholson, 1973)

боллизирования по данному пути, очень важен. От того, что служит исходным энергетическим ресурсом, зависит общий энергетический баланс процесса.

Если исходным энергетическим субстратом служит глюкоза, то первое превращение, которому она подвергается,— фосфорилирование, протекающее с участием АТФ и приводящее к повышению количества свободной энергии, заключенной в молекуле глюкозы. В результате

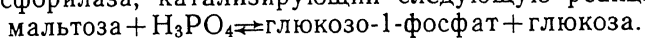
образуется глюкозо-6-фосфат — метаболически активная форма глюкозы. Приблизительно половина энергии макроэргической фосфатной связи прочно связывается в молекуле глюкозо-6-фосфата, остальная энергия выделяется в окружающую среду.

Если исходный энергетический субстрат — лактоза, первым шагом на пути метаболизирования является ферментативное расщепление лактозы с помощью β -галактозидазы на D-галактозу и D-глюкозу. D-галактоза затем подвергается фосфорилированию, катализируемому галактокиназой:



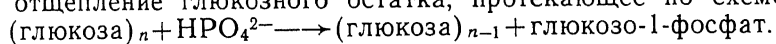
D-галактозо-1-фосфат подвергается серии ферментативных превращений с участием УТФ в качестве кофермента, в результате которых превращается в глюкозо-1-фосфат.

У некоторых бактерий из рода *Lactobacillus* имеется фермент мальтозофосфорилаза, катализирующий следующую реакцию:



В результате этой реакции осуществляется расщепление дисахарида мальтозы на две молекулы глюкозы, одна из которых образуется в фосфорилированной форме. Здесь важно подчеркнуть, что в этой реакции молекула фосфорилированной глюкозы синтезируется без затраты АТФ.

Если исходным энергетическим субстратом, вовлекаемым в процесс гликолиза, служит полисахарид типа гликогена или крахмала, то первым этапом на пути его использования является фосфоролитическое отщепление глюкозного остатка, протекающее по схеме:



Глюкозо-1-фосфат, образующийся в результате подготовительных превращений углеводов, иных, чем глюкоза, превращается затем в глюкозо-6-фосфат. Перемещение фосфатной группы из положения 1 в положение 6 катализируется ферментом фосфоглюкомутазой. Дальнейшее превращение глюкозо-6-фосфата одинаково независимо от исходного энергетического субстрата (рис. 56).

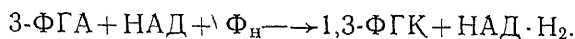
Молекула глюкозо-6-фосфата изомеризуется в молекулу фруктозо-6-фосфата. Реакция сопровождается незначительным изменением свободной энергии и поэтому легко идет в обоих направлениях. Фруктозо-6-фосфат фосфорилируется в положении 1. Донором фосфата служит АТФ. Реакция в клетке практически необратима. Вторичное фосфорилирование молекулы фруктозы приводит к ее дальнейшему активированию. Реакция катализируется фосфофруктокиназой, относящейся к числу регуляторных ферментов. Активность фосфофруктокиназы ингибируется АТФ и стимулируется АДФ и фосфатом. Высокое отношение АТФ к АДФ в клетке приводит к ингибированию этого фермента и соответственно снижению скорости гликолиза. Фосфофруктокиназа — основной регуляторный фермент гликолитического пути.

Образовавшийся фруктозо-1,6-дифосфат разрывается на две триозы: фосфодиоксиацетон и 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА). Разрыв катализируется фруктозо-1,6-дифосфатальдолоазой (альдолоазой), являющейся ключевым ферментом этого пути. Достаточно обнаружить альдолоазу, чтобы получить свидетельство существования гликолитического пути у организма. В последующие реакции может включаться только 3-ФГА. Фосфодиоксиацетон превращается в 3-ФГА в реакции изомеризации, катализируемой триозофосфатизомеразой.

На этом этапе заканчивается подготовительная стадия гликолитического пути: молекула глюкозы после активирования и расщепления на 2 фосфотриозы подготовлена для последующих превращений. Для

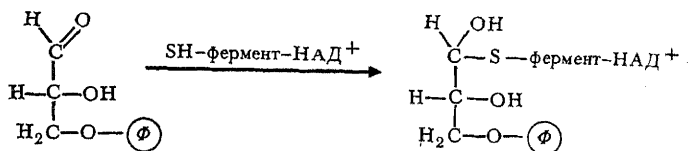
активирования 1 молекулы глюкозы тратятся 2 молекулы АТФ². Таким образом, до сих пор процесс протекает с затратой энергии. Однако его смысл и назначение заключаются в обеспечении клетки энергией. Эта задача решается на следующей стадии процесса.

Окисление 3-ФГА до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты (1,3-ФГК) — один из наиболее важных этапов гликолитического пути, поскольку именно на этом этапе энергия, освобождающаяся при окислении альдегидной группы 3-ФГА, запасается в молекуле 1,3-ФГК. Реакция катализируется ферментом глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой (3-ФГА-дегидрогеназой):

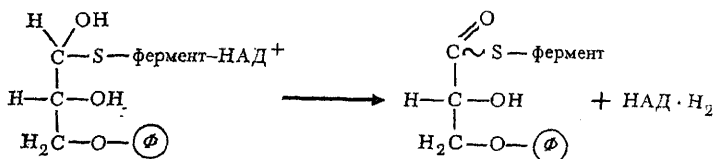


3-ФГА служит донором электронов, которые переходят на НАД⁺, функционирующий в качестве переносчика электронов от 3-ФГА к пировиноградной кислоте. Образование последней происходит на более поздних этапах гликолитического пути. Итак, альдегидная группа 3-ФГА окисляется до карбоксильной группы. Однако вместо свободной карбоновой кислоты образуется смешанный ангидрид фосфорной кислоты и карбоксильной группы 3-ФГК — 1,3-ФГК. Реакция окисления 3-ФГА до 1,3-ФГК с помощью НАД-зависимой 3-ФГА-дегидрогеназы, приводящая к первому субстратному фосфорилированию на гликолитическом пути, состоит из нескольких этапов (рис. 57). Первый из них — связывание фермента, содержащего сульфгидрильную группу (SH-группу) в активном центре, с молекулой субстрата, в результате

I этап



II этап



III этап

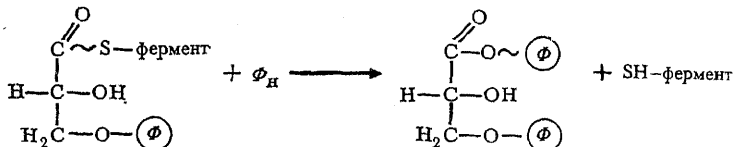


Рис. 57. Механизм субстратного фосфорилирования на уровне 3-фосфоглицеринового альдегида. Объяснение см. в тексте (по Racker, 1967)

² Если исходным субстратом служит полисахарид, например гликоген, крахмал, то для активирования глюкозного остатка на подготовительной стадии гликолитического пути затрачивается только 1 молекула АТФ.

чего образуется фермент-субстратный комплекс. Альдегидная группа субстрата связывается с SH-группой фермента. На втором этапе фермент катализирует перенос водорода на НАД⁺, также связанный с ферментом. Окисление приводит к образованию промежуточного макроэргического соединения. Возникает богатый энергией тиоэфир, в образовании которого участвует SH-группа фермента и карбоксильная группа субстрата.

На последнем этапе кислотный остаток переносится от фермента на ортофосфат, в результате чего образуется 1,3-ФГК и исходная форма фермента. 1,3-ФГК — высокоэнергетическое соединение. Энергия, освобождающаяся при окислении 3-ФГА, запасается в макроэргической фосфатной связи у первого углеродного атома 1,3-ФГК. 1,3-ФГК реагирует далее с АДФ, отдавая высокоэнергетическую фосфатную группу, в результате чего синтезируется молекула АТФ. Таким образом, энергия, высвободившаяся при окислении альдегидной группы, оказывается запасенной в молекуле АТФ.

Итак, произошло образование 3-ФГК. Теперь можно подвести некоторые итоги. Клетка на этом этапе «вернула» свои энергетические затраты: 2 молекулы АТФ были затрачены и 2 молекулы АТФ синтезировались на 1 молекулу глюкозы. На этом же этапе в реакции окисления 3-ФГА до 1,3-ФГК и образования АТФ имеет место первое субстратное фосфорилирование. Энергия освобождается и запасается в макроэргических фосфатных связях АТФ в процессе перестройки сбраживаемого субстрата при участии ферментов. Реакция, ведущая к субстратному фосфорилированию, может быть проведена в пробирке, т. е. если взять 3-ФГА, НАД⁺, неорганический фосфат, АДФ и 3-ФГА-дегидрогеназу, то реакция пойдет в сторону образования 3-ФГК и АТФ. Все необходимые для этого компоненты известны и получены в чистом виде. Возможность осуществления реакции в пробирке говорит о том, что фермент, катализирующий ее, не связан с клеточными структурами.

Протекание реакции вне какой-либо связи с определенными клеточными структурами говорит о ее примитивности, поскольку эволюция шла по пути от бесструктурных систем к зависимости от структур. Таким образом, место субстратного фосфорилирования — в самом начале формирования клеткой механизмов запасаания энергии в форме макроэргических фосфатных связей АТФ. Первое субстратное фосфорилирование носит еще название фосфорилирования на уровне 3-ФГА.

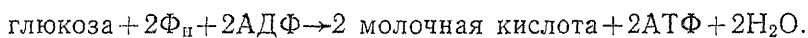
После образования 3-ФГК фосфатная группа из третьего положения переносится во второе. Реакция сопровождается очень незначительным изменением свободной стандартной энергии, поэтому она легко обратима. Далее происходит отщепление молекулы воды от второго и третьего атомов углерода 2-ФГК, катализируемое ферментом енولاзой, и образуется фосфоенолпировиноградная кислота. В результате происшедшей дегидратации молекулы 2-ФГК степень окисления ее второго углеродного атома увеличивается, а третьего — уменьшается. Таким образом, данная реакция по существу представляет собой внутримолекулярный окислительно-восстановительный процесс. Дегидратация молекулы 2-ФГК, приводящая к образованию ФЕП, сопровождается перераспределением энергии внутри молекулы, в результате чего фосфатная связь у второго углеродного атома из низкоэнергетической в молекуле 2-ФГК превращается в высокоэнергетическую в молекуле ФЕП.

Молекула ФЕП становится донором богатой энергией фосфатной группы, которая переносится на АДФ с помощью фермента пируват-

киназы. Реакция сопровождается значительным уменьшением стандартной свободной энергии и практически необратима. Таким образом, в процессе превращения 2-ФГК в пировиноградную кислоту имеет место высвобождение энергии и запасание ее в молекуле АТФ. Это второе субстратное фосфорилирование. По ряду черт оно отличается от первого субстратного фосфорилирования: 1) если в первом случае образование макроэргической фосфатной связи протекало одновременно с присоединением к субстрату фосфатной группы, то во втором — фосфатная группа была присоединена к молекуле субстрата задолго до этого события; 2) первое субстратное фосфорилирование связано с реакцией окисления, приводящей к тому, что от молекулы 3-ФГА отрываются два электрона и переходят на НАД⁺, т. е. молекула 3-ФГА служит донором электронов, но вопрос о конечном акцепторе их на этом этапе не решен. Напротив, при втором субстратном фосфорилировании, связанном с реакцией дегидратации молекулы 2-ФГК, решается проблема и донора и акцептора. Здесь в результате внутримолекулярного окислительно-восстановительного процесса одна молекула и донирует и акцептирует электроны.

В процессе второго субстратного фосфорилирования образуется еще молекула АТФ; в итоге общий энергетический выигрыш процесса составляет 2 молекулы АТФ на 1 молекулу глюкозы. Такова энергетическая сторона процесса гомоферментативного молочнокислого брожения.

Однако осталась еще проблема восстановленного переносчика — НАД·Н₂, образованного в реакции окисления 3-ФГА. Чтобы процесс продолжался, в метаболический поток необходимо вернуть этот метаболит в окисленном виде (НАД⁺), т. е. решить проблему конечного акцептора. Как же она решается в данном случае? Результатом рассмотренного выше процесса, помимо его энергетического итога, является образование 2 молекул пировиноградной кислоты и 2 молекул НАД·Н₂ на 1 молекулу сброженной гексозы. Молекула пировиноградной кислоты по своему химическому строению — достаточно окисленное соединение и может служить акцептором электронов. На первом этапе эволюции донор-акцепторная проблема была решена самым простым способом: 2 электрона переносились с НАД·Н₂ на молекулу пировиноградной кислоты, что приводило к образованию молочной кислоты. Суммарно процесс можно выразить в виде следующего уравнения:



Гомоферментативное молочнокислое брожение представляет собой энергетическую сторону образа жизни определенной группы прокариот — гомоферментативных молочнокислых бактерий. Черты эволюционной древности этой группы видны не только в процессе добывания ее представителями энергии, но и в других сторонах их метаболизма, о чем будет сказано в разделе, посвященном краткой характеристике этих бактерий. Сейчас же остается подвести некоторые итоги рассмотренного процесса и оценить его «эволюционную судьбу». В процессе гомоферментативного молочнокислого брожения имеют место 3 типа химических превращений:

- перестройка углеродного скелета исходного субстрата;
- окислительно-восстановительные превращения;
- образование АТФ.

Термодинамический анализ реакций, составляющих процесс гомоферментативного молочнокислого брожения, показывает, что все они,

за исключением трех (фосфорилирование глюкозы, фосфорилирование фруктозо-6-фосфата и превращение ФЕП в пировиноградную кислоту), легко обратимы. Энергетический выход процесса таков: образование 2 молекул АТФ на 1 молекулу глюкозы³. Энергетическая эффективность процесса, т. е. эффективность запасаения выделяемой свободной энергии в молекулах АТФ, составляет примерно 40%. Энергия запасается только в реакциях субстратного фосфорилирования. Как можно видеть из суммирования энергетических характеристик процесса, низкий энергетический выход сочетается в нем с высокой энергетической эффективностью, а в основе всего лежат простые механизмы получения энергии. Окислительно-восстановительные превращения имеют место на двух этапах процесса, именно они приводят к получению клеткой энергии. Если оценить общий окислительно-восстановительный баланс процесса ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_6O_3$), то можно видеть, что суммарного изменения степени окисленности при этом не происходит (если сравнить степень окисленности отдельных углеродных атомов глюкозы и молочной кислоты, получается другая картина). Это результат того, что процесс «замкнут на себя», т. е. субстрат является и источником веществ — доноров электронов и источником веществ — их акцепторов. «Замкнутость» процесса приводит к ограничению его окислительных и, следовательно, энергетических возможностей (но в данном конкретном случае еще не исчерпывает их). Все это, вместе взятое, определило «эволюционную судьбу» гомоферментативного молочнокислого брожения.

Возникнув как первый, далекий от совершенства энергетический процесс, гомоферментативное молочнокислое брожение не было потом отброшено в процессе эволюции. Наоборот, оно закрепилось и существует сейчас в виде гликолиза у подавляющего большинства прокариот, дрожжей, грибов, а также у высших животных и растений, но только как первый этап более совершенного энергетического процесса, сформировавшегося в результате последующего развития способов получения энергии живыми организмами. Чем объясняется такая судьба гомоферментативного молочнокислого брожения? Вероятно, оказалось выгодным использовать его в качестве первого подготовительного этапа по следующим причинам: 1) высокая энергетическая эффективность (не путать с энергетическим выходом процесса!); 2) простота механизмов получения энергии; 3) перестройка исходного субстрата в форму, метаболически удобную для последующих превращений.

Гомоферментативные молочнокислые бактерии

Гомоферментативное молочнокислое брожение, в основе которого лежит гликолитический путь разложения глюкозы, является единственным способом получения энергии для группы прокариот, которые при сбраживании углеводов превращают в молочную кислоту от 85 до 98% сахара среды. Бактерии, входящие в данную группу, морфологически различны. Это кокки, относящиеся к родам *Streptococcus* и *Pediococcus*, а также длинные или короткие палочки из рода *Lactobacillus*. Последний подразделяется на три подрода. Бактерии, относящиеся к двум из них (*Thermobacterium*, *Streptobacterium*), также осуществляют гомоферментативное молочнокислое брожение. Все бактерии, относящиеся к этой группе, положительно окрашиваются по

³ Если исходный субстрат — полисахарид, то образуется 3 молекулы АТФ на 1 молекулу сброженной глюкозы.

Граму, не образуют спор, неподвижны. Группа весьма гетерогенна в отношении нуклеотидного состава ДНК. В целом в группе молярное содержание ГЦ-пар оснований колеблется от 32 до 51%. Значительные колебания по этому признаку характерны и для бактерий, объединенных в роды и даже подроды.

Лактатдегидрогеназа, катализирующая превращение пирувата в лактат, стереоспецифична. У разных видов она содержится в виде определенных оптических изомеров; в зависимости от этого бактерии продуцируют D- или L-форму молочной кислоты. Те из них, которые образуют смесь D- и L-форм, как правило, содержат две формы фермента, различающиеся стереоспецифичностью. Некоторые признаки, характерные для прокариот, осуществляющих гомоферментативное молочнокислое брожение, представлены в табл. 17.

Таблица 17

Характеристика таксономических групп гомоферментативных молочнокислых бактерий

Род и подрод бактерий	Морфология и особенности деления клеток	Молярное содержание ГЦ в ДНК, %	Конфигурация молочной кислоты	Наиболее распространенные виды
Род <i>Streptococcus</i>	сферические или овальные клетки; делятся в одной плоскости, в результате образуются пары или цепочки клеток	33—44	D	<i>S. faecalis</i> , <i>S. cremoris</i> , <i>S. lactis</i>
Род <i>Pediococcus</i>	кокки; делятся в двух плоскостях, в результате образуются тетрады клеток	34—44	DL	<i>P. cerevisiae</i>
Род <i>Lactobacillus</i> подрод <i>Thermobacterium</i>	палочки; делятся в одной плоскости, образуют пары или цепочки клеток	35—51	L D DL	<i>L. delbrückii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. jensenii</i>
Подрод <i>Streptobacterium</i> *		32—46	DL L	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i>

* Бактерии, относящиеся к этому подроду, расщепляют пентозы по окислительному пентозофосфатному пути, осуществляя гетероферментативное молочнокислое брожение. Поэтому они не являются облигатно гомоферментативными молочнокислыми бактериями.

Как видно из разобранных выше процесса гомоферментативного молочнокислого брожения, у этой группы прокариот молекулярный кислород не включается в энергетический метаболизм, но они способны расти в присутствии O₂, т. е. являются аэротолерантными анаэробами. В клетках этих бактерий в значительном количестве содержатся флавиновые ферменты, с помощью которых происходит восстановление молекулярного кислорода до H₂O₂. Из-за неспособности молочнокислых бактерий синтезировать гемовую группу у них отсутствует каталаза — фермент, катализирующий разложение перекиси водорода, поэтому последняя может накапливаться в клетке. Существующие механизмы защиты от молекулярного кислорода и его производных у этой группы прокариот изложены в гл. 11.

Особенностями конструкторного метаболизма данной группы бактерий являются слабо развитые биосинтетические способности, что выражается в большой зависимости роста молочнокислых бактерий от

наличия в питательной среде готовых органических веществ (аминокислоты, витамины группы В, компоненты нуклеиновых кислот). В качестве источника углерода молочнокислые бактерии используют лактозу (молочный сахар) или мальтозу (растительный сахар, образующийся при гидролизе крахмала). Могут они также использовать некоторые пентозы, сахароспирты и органические кислоты. Из всех известных непатогенных прокариот молочнокислые бактерии отличаются наибольшей требовательностью к субстрату. Зависимость этих бактерий от наличия готовых органических веществ среды говорит о примитивности в целом их конструктивного метаболизма.

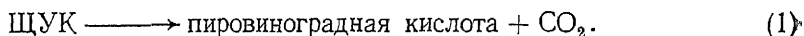
Молочнокислые бактерии распространены там, где они могут обеспечить свои высокие потребности в питательных веществах и где имеются большие количества углеводов, переработка которых дает им необходимую для роста энергию. Их много в молоке и молочных продуктах, на поверхности растений и в местах разложения растительных остатков; обнаружены они в пищеварительном тракте и на слизистых оболочках животных и человека.

Молочнокислым бактериям принадлежит главная роль в осуществлении ряда процессов, используемых с давних времен для получения различных молочнокислых продуктов, в процессах соления и квашения овощей, силосования кормов. Кефир — продукт совместной деятельности молочнокислых бактерий и дрожжей. Известно много национальных кисломолочных продуктов (кумыс, йогурт и др.), для приготовления которых используют кобылье, верблюжье, овечье, козье молоко, а в качестве закваски — естественно возникшие и сохраняемые комплексы молочнокислых бактерий и дрожжей. Молочнокислые бактерии играют также большую роль в процессе приготовления сыров и сливочного масла. Первый этап производства сыров (створаживание белков молока) осуществляется молочнокислыми бактериями.

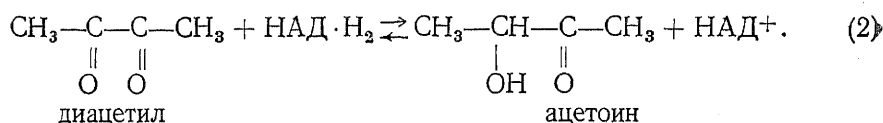
Скисание сливок, необходимое для получения сливочного масла, также вызывают бактерии рода *Streptococcus*. Помимо молочной кислоты некоторые из них образуют ацетон и диацетил, придающие сливочному маслу характерный запах и вкус. Субстратом служит лимонная кислота, содержание которой в молоке может достигать 1 г/л. Реакции, ведущие к образованию этих веществ, начинаются с расщепления лимонной кислоты, катализируемого цитратлиазой:

лимонная кислота → уксусная кислота + щавелевоуксусная кислота.

Уксусная кислота выделяется в среду, а щавелевоуксусная кислота (ЩУК) декарбоксилируется, что приводит к образованию пирувата:



Дальнейшее метаболизирование пирувата осуществляется по трем различным путям: часть молекул восстанавливается до молочной кислоты; другая часть подвергается декарбоксилированию, приводящему к возникновению разных С₂-интермедиатов (ацетил-КоА и «активный» ацетальдегид) и взаимодействию между ними, заканчивающемся синтезом молекулы диацетила. Восстановление последнего с помощью ацетондегидрогеназы приводит к образованию ацетона:



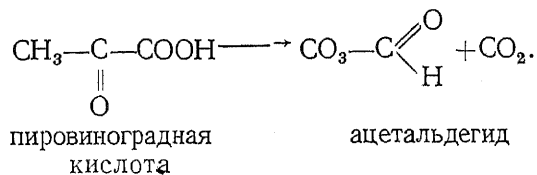
Эта последовательность реакций не связана с получением клеткой энергии. Смысл ее, возможно, в дополнительном своеобразном решении «акцепторной проблемы», так как, во-первых, образование пирувата в реакции (1) не сопровождается синтезом НАД·Н₂, и, во-вторых, синтез ацетона из диацетила (реакция 2) требует дополнительных молекул НАД·Н₂.

Использующие мальтозу молочнокислые бактерии участвуют в квашении овощей. В мелко нарезанные овощи добавляют 2—3% соли и создают условия, исключающие свободный доступ воздуха. Начинается спонтанное молочнокислое брожение. Аналогичный процесс протекает при силосовании кормов. Предназначенная для силосования растительная масса плотно загружается в силосные башни или ямы. Чтобы повысить питательные свойства среды, добавляют мелассу, а с целью создания более благоприятных условий для молочнокислых бактерий растительную массу подкисляют. В этих условиях также протекает спонтанное молочнокислое брожение.

Спиртовое брожение

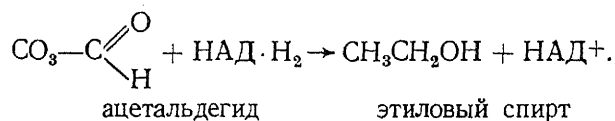
Выше мы разобрали наиболее простой способ решения донор-акцепторной проблемы, который реализуется в виде молочнокислого брожения у группы гомоферментативных молочнокислых бактерий. Дальнейшие поиски на путях эволюции привели к формированию других метаболических возможностей для решения этой проблемы. Одна из них заключается в том, что из пировиноградной кислоты в результате ее окислительного декарбоксилирования образуется ацетальдегид, который становится конечным акцептором водорода. В итоге из 1 молекулы гексозы образуются 2 молекулы этилового спирта и 2 молекулы углекислоты. Процесс получил название спиртового брожения. Спиртовое брожение распространено среди прокариотных (различные облигатно и факультативно анаэробные бактерии) и эукариотных (дрожжи) форм. В анаэробных условиях у высших растений также отмечено накопление этилового спирта.

Процесс спиртового брожения, осуществляемый дрожжами, до последней реакции идет по тому же пути, что и описанный выше процесс молочнокислого брожения, но последняя реакция заменена двумя другими ферментативными реакциями. Сначала пируват с помощью пируватдекарбоксилазы, ключевого фермента спиртового брожения, декарбоксилируется до ацетальдегида и СО₂:



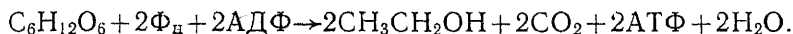
Особенность реакции заключается в ее полной необратимости. Коферментом пируватдекарбоксилазы является тиаминпирофосфат — эфир тиамин (витамина В₁) и пирофосфорной кислоты, выполняющий функцию кофермента во многих реакциях декарбоксилирования α-кетокислот.

Образовавшийся ацетальдегид восстанавливается до этанола с участием НАД⁺-зависимой алкогольдегидрогеназы:



Донором водорода служит 3-ФГА (как и в случае молочнокислого брожения).

Процесс спиртового брожения суммарно можно выразить следующим уравнением:



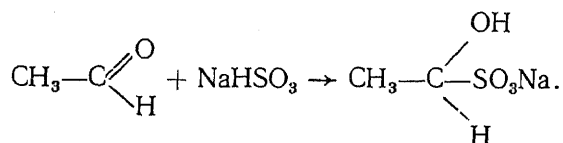
Как видно из приведенного уравнения, с точки зрения энергетического выхода оба процесса (гомоферментативное молочнокислое и спиртовое брожение) одинаковы. В обоих случаях сбраживание 1 молекулы глюкозы приводит к образованию 2 молекул АТФ. Процессы различаются природой конечных акцепторов электронов. Кроме того, если при гомоферментативном молочнокислом брожении образовавшаяся молочная кислота в целом по степени окисленности-восстановленности не отличается от молекулы гексозы (имеет место лишь внутримолекулярное перераспределение окисленности и восстановленности отдельных углеродных атомов, входящих в ее молекулу), то в случае спиртового брожения происходит достаточно четкое межмолекулярное размежевание на отдельные восстановленные (этиловый спирт) и окисленные (CO_2) молекулы.

Спиртовое брожение, осуществляемое дрожжами, интересно для нас тем, что на нем впервые были сделаны открытия, имеющие принципиальное значение. Именно при изучении спиртового брожения Л. Пастер доказал, что оно является процессом, связанным с жизнедеятельностью определенных микроорганизмов — дрожжей. Л. Пастер открыл, что в условиях свободного доступа кислорода воздуха процесс спиртового брожения ингибируется и активируется дыхание. Это явление получило название «эффекта Пастера». «Эффект Пастера» есть результат определенного взаимодействия между различными энергетическими путями, существующими у дрожжей. Одним из проявлений такого взаимодействия является конкуренция за АДФ и неорганический фосфат между процессами субстратного фосфорилирования гликолитического пути и процессами окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи.

В 1891 г. выдающийся немецкий биохимик и химик-органик Э. Фишер (E. Fischer, 1852—1912) обнаружил ферментативное действие водной вытяжки из сухих дрожжей, обладавшей способностью расщеплять мальтозу до глюкозы. Таким образом, Э. Фишер предвосхитил открытие братьев Г. и Э. Бухнеров (H. Buchner, E. Buchner), опубликовавших в 1897 г. первое сообщение о возможности осуществления спиртового брожения вне клетки. Оказалось, что бесклеточные экстракты дрожжей превращают углеводы в этанол. Это было отправным пунктом для детального изучения химизма процесса. Исследования продолжались до 40-х гг. Впервые было показано включение неорганического фосфора в этот процесс и роль фосфорилированных соединений (Л. А. Иванов, 1905; A. Harden, W. Young, 1905). Была установлена природа отдельных реакций, катализирующих их ферментов, промежуточных продуктов метаболизма, коферментов, энергетических взаимопревращений. В 1933 г. Г. Эмбден и О. Мейергоф предложили полную схему спиртового брожения. Наконец, работы К. Нойберга (K. Neuberg) по изучению механизма спиртового брожения привели

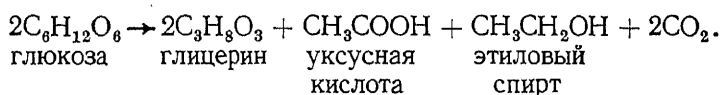
к установлению еще одной важной особенности метаболизма низших форм жизни — его чрезвычайной гибкости.

К. Нойберг обнаружил, что в зависимости от условий процесс спиртового брожения может идти с образованием продуктов, которые в норме не образуются. Если к дрожжам, сбраживающим глюкозу, добавить бисульфит, то основным продуктом брожения будет глицерин. Оказалось, что бисульфит образует комплекс с ацетальдегидом, и последний не может больше функционировать как акцептор электронов:



Следствием этого является передача электронов от НАД·Н₂ на фосфодиоксиацетон, восстановление его до 3-фосфоглицерина и дефосфорилирование последнего, приводящее к образованию глицерина. Кроме глицерина в среде происходит накопление ацетальдегида (в комплексе с бисульфитом), этанола и СО₂, но образование последних двух продуктов заметно подавлено. Когда брожение идет в присутствии бисульфита, энергетический выход процесса в два раза меньше по сравнению с нормальным спиртовым брожением, поскольку одна триоза не подвергается окислению, а восстанавливается до молекулы глицерина.

Спиртовое брожение протекает обычно при рН 3—6. Если его проводить в щелочной среде, например в присутствии NaHCO₃, также происходит накопление в сбраживаемом растворе глицерина. Оказалось, что в щелочных условиях ацетальдегид не может акцептировать электроны, поскольку в этих условиях он участвует в реакции дисмутации с образованием уксусной кислоты и этилового спирта. Акцептором электронов, как и в предыдущем случае, служит фосфодиоксиацетон. Процесс брожения в щелочной среде можно представить в виде следующего уравнения:



Микроорганизмы, осуществляющие спиртовое брожение

Накопление этилового спирта в среде в анаэробных условиях наблюдается у разных групп прокариот и группы эукариотных микроорганизмов — дрожжей.

Прокариоты

Способность осуществлять в анаэробных условиях спиртовое брожение по пути, описанному в предыдущем разделе, присуща некоторым бактериям, принадлежащим к разным таксономическим группам, например *Sarcina ventriculi*, *Erwinia amylovora*.

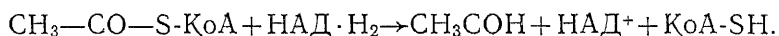
S. ventriculi относится к группе грамположительных анаэробных кокков. Клетки неподвижные, довольно крупные (2—3 мкм в диаметре); делятся в трех плоскостях, поэтому в культуре часто образуют пакеты, состоящие из 8 и более клеток. Особенностью вида является

клеточная стенка, окруженная толстым внешним слоем, состоящим из целлюлозы. Аэротолерантный анаэроб. Единственный способ получения энергии — сбраживание сахаров. Потребности в питательных веществах довольно высоки (многочисленные аминокислоты и ряд витаминов).

E. amylovora относится к группе энтеробактерий. Это граммотрицательные подвижные палочки (0,1—1,0×1,0—3,0 мкм). Особенностью вида является его патогенность для растений. Факультативный анаэроб. В аэробных условиях получает энергию в процессе дыхания.

Помимо этилового спирта и CO₂ в качестве продуктов брожения *S. ventriculi* в среде накапливаются также уксусная и молочная кислоты и выделяется молекулярный водород, у *E. amylovora* накапливается молочная кислота. Разнообразие конечных продуктов у этих бактерий связано с тем, что пируват, образующийся в результате сбраживания глюкозы по гликолитическому пути, далее может метаболизироваться различно: восстанавливаться до молочной кислоты; подвергаться декарбоксилированию и последующему восстановлению, как описано в предыдущем разделе; подвергаться ферментативному расщеплению с последующими окислительными или восстановительными этапами.

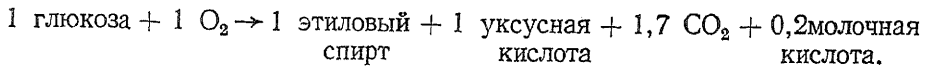
У многих клостридиев и энтеробактерий среди продуктов брожения обнаруживают этиловый спирт, но путь его образования отличен от описанного в предыдущем разделе. Сбраживание сахаров до пировиноградной кислоты происходит по гликолитическому пути, дальнейшее же превращение пирувата идет не через пируватдекарбоксилазу. У названных групп бактерий пируват подвергается расщеплению, приводящему к образованию ацетил-КоА, который затем восстанавливается до ацетальдегида в реакции, катализируемой ацетальдегиддегидрогеназой:



Гетероферментативные молочнокислые бактерии накапливают в среде спирт, метаболизируя глюкозу по окислительному пентозофосфатному пути. В результате ряда ферментативных превращений образуется ацетилфосфат, восстановление которого в два этапа приводит к появлению молекулы этилового спирта.

Наконец, у бактерий *Zytoponas mobilis* с неясным систематическим положением, используемых в Мексике для получения национального спиртного напитка «пульке», разложение глюкозы до пировиноградной кислоты идет по пути Энтнера — Дудорова. Дальнейшее превращение пирувата происходит с участием пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы. Выход продуктов брожения такой же, как при спиртовом брожении по гликолитическому пути: по 2 молекулы спирта и CO₂ на 1 молекулу сброженной глюкозы, но энергетический выход в два раза ниже, чем при гликолизе: всего 1 молекула АТФ на 1 молекулу сброженной глюкозы.

Z. mobilis — граммотрицательные подвижные бактерии, имеющие форму коротких палочек. Характеризуются высокими биосинтетическими способностями (могут расти на синтетической среде простого состава с добавлением только пантотеновой кислоты в качестве ростового фактора). Анаэробы, единственный способ получения энергии для которых — спиртовое брожение. Однако эти бактерии способны расти в присутствии молекулярного кислорода. Последний в этом случае используется для окисления части этанола до уксусной кислоты в соответствии со следующим уравнением:



Таким образом, молекулярный кислород существенно не меняет характера энергетического метаболизма *Z. mobilis*. В клетках бактерии обнаружены фрагменты ЦТК, цитохромы *b*, *c*, *a*₂, каталаза. Наиболее вероятным представляется, что предки *Z. mobilis* — аэробы. Способ получения энергии за счет спиртового брожения — более позднее приспособление к условиям обитания.

Эукариоты

Основными продуцентами этилового спирта, имеющими широкое практическое применение, являются дрожжи — одноклеточные эукариотные микроорганизмы, принадлежащие к разным классам высших грибов. Наиболее распространенный способ размножения дрожжей — почкование. Дрожжи — аэробы со сформированным аппаратом дыхания, но в анаэробных условиях осуществляют спиртовое брожение по пути, рассмотренному в предыдущем разделе, т. е. получают энергию за счет субстратного фосфорилирования. Конструктивный метаболизм дрожжей основан на их хорошо развитых биосинтетических способностях. Есть виды дрожжей, развивающиеся на простых синтетических средах; эти дрожжи способны синтезировать все необходимые им сложные органические соединения. Существуют виды, нуждающиеся в определенных витаминах группы В. Добавление к питательной среде веществ, содержащих комплекс витаминов, аминокислот, сахаров, приводит, как правило, к заметному стимулированию роста дрожжей.

Ряд отраслей промышленности основан на жизнедеятельности дрожжей (виноделие, производство спирта, пивоварение, хлебопекарное производство). Сырьем для производства спирта с использованием дрожжей служат углеводы растительного происхождения (картофель, злаки), отходы пищевой (мелассы) и целлюлозно-бумажной (щелока) промышленности, различные сельскохозяйственные отходы, а также гидролизаты древесины. Сбраживание дрожжами виноградного сока лежит в основе виноделия; сбраживание пивного сусла, приготовленного из проросших зерен ячменя, специальными пивными дрожжами — в основе пивоварения.

О путях образования этилового спирта

Изложенные данные позволяют составить определенное представление о том, насколько широко распространено образование этилового спирта среди разных групп прокариот и насколько различны метаболические пути, ведущие к его синтезу. Из этого следует, что накопление в культуральной среде этилового спирта само по себе не может служить указанием на место процесса, приводящего к его образованию, в эволюции. Этиловый спирт у прокариот может быть одним из конечных продуктов как эволюционно более ранних (гликолиз), так и более поздних (окислительный пентозофосфатный цикл, путь Энтнера — Дудорова) катаболических процессов. До сих пор среди прокариот не обнаружены организмы, сохранившие черты примитивности энергетического и конструктивного метаболизма, у которых спиртовое брожение служило бы единственным способом получения энергии. Тот факт, что наиболее четко и в самом «классическом» виде спиртовое брожение проявляется у дрожжей, форм эукариотных, не может, как нам кажется, ставить под сомнение его место в эволюции анаэробных энергетических процессов.

Пропионовокислое брожение

Из рассмотренных двух типов брожения видно, что ключевым соединением в обоих процессах является пируват, поскольку в конечном счете специфика брожения определяется дальнейшей судьбой пирувата. Основная задача последующих реакций — регенерирование молекулы НАД⁺ и возвращение ее в клеточный метаболизм. Прямое восстановление пирувата с помощью НАД·Н₂ до молочной кислоты реализуется в молочнокислом брожении. Другая возможность регенерирования НАД⁺ — «сбрасывание» водорода с НАД·Н₂ на фрагменты, образуемые при метаболизме пирувата, — имеет место в спиртовом брожении, осуществляемом дрожжами и некоторыми видами бактерий. Третья возможность связана с синтетическим процессом — усложнением молекулы пирувата, в результате которого создается более окисленная молекула акцептора, способная принять больше электронов с восстановленных переносчиков. Это происходит при присоединении к молекуле пирувата СО₂, приводящем к формированию четырехуглеродного скелета. Процесс получил название гетеротрофной ассимиляции углекислоты.

Впервые гетеротрофная ассимиляция углекислоты была обнаружена в 1936 г. Х. Вудом и К. Веркманом (H. Wood, C. Werkman) при изучении сбраживания глицерина пропионовыми бактериями. Карбоксилирование пирувата, приводящее к образованию шавелевоуксусной кислоты, получило название реакции Вуда — Веркмана. У прокариот обнаружены различные реакции карбоксилирования пирувата или его фосфорилированного производного. В настоящее время показано, что реакции карбоксилирования имеют место у всех гетеротрофных прокариот, а также в клетках всех эукариотных организмов, включая высшие растения и животных. Кроме того, в больших масштабах в природе реакции связывания СО₂ осуществляются автотрофными организмами в процессе хемо- и фотосинтеза.

В пропионовокислом брожении мы имеем дело с реализацией

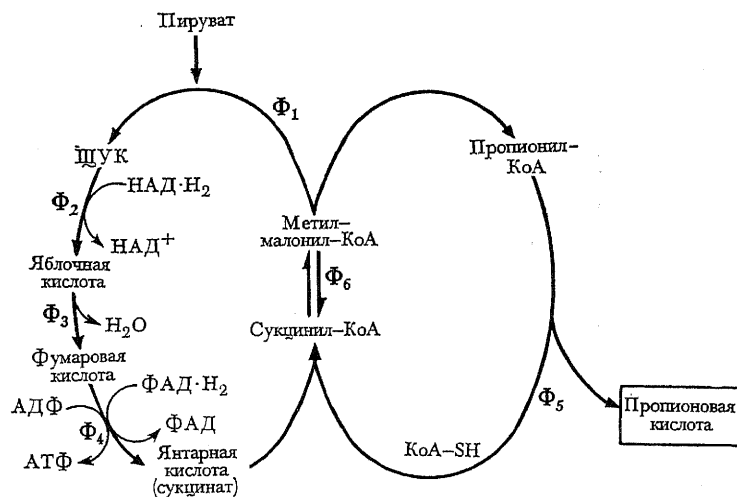
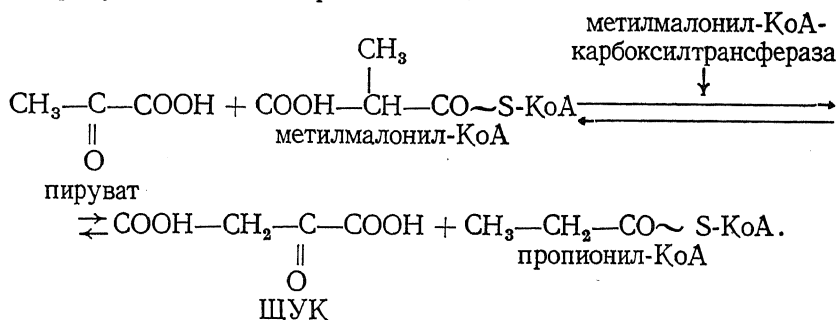


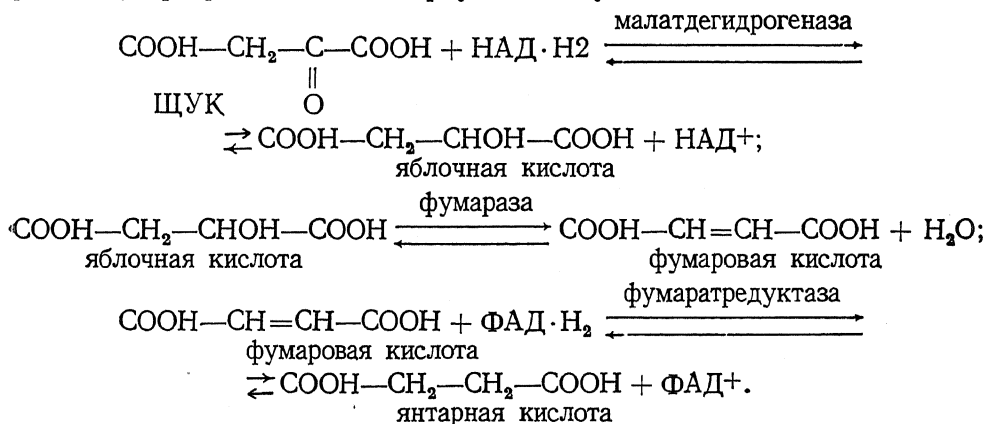
Рис. 58. Схематическое изображение превращения пирувиноградной кислоты в пропионовую при пропионовокислом брожении: Φ_1 — метилмалонил-КоА-карбоксилтрансфераза; Φ_2 — малатдегидрогеназа; Φ_3 — фумараза; Φ_4 — фумаратредуктаза; Φ_5 — КоА-трансфераза; Φ_6 — метилмалонил-КоА-мутаза (по Dagley, Nicholson, 1973; Rose, 1971)

третьей возможности превращения пирувата — его карбоксилированием, приводящим к возникновению нового акцептора водорода — щавелевоуксусной кислоты (ЩУК). Восстановление пировиноградной кислоты в пропионовую у пропионовокислых бактерий протекает следующим образом (рис. 58). Пировиноградная кислота карбоксилируется в реакции, катализируемой биотинзависимым ферментом, у которого биотин выполняет функцию переносчика CO_2 . Донором CO_2 -группы служит метилмалонил-КоА. В результате реакции транскарбоксилирования образуются ЩУК и пропионил-КоА:

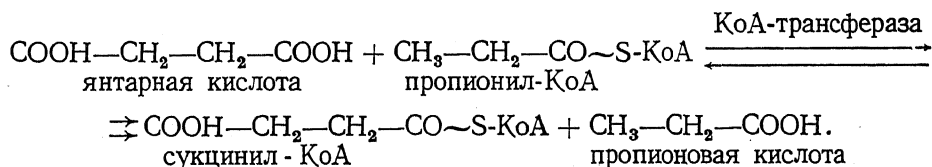


Рассмотрим теперь дальнейшую судьбу каждого из двух продуктов реакции, а также вопрос о происхождении одного из субстратов реакции — метилмалонил-КоА. (Основным источником пировиноградной кислоты служит процесс гликолитического расщепления гексоз или окислительные превращения, если в качестве субстрата брожения используют, например диоксиацетон или глицерин.)

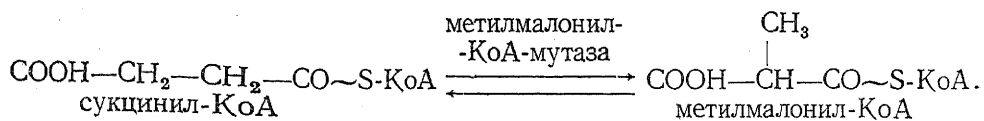
Щавелевоуксусная кислота в результате трех ферментативных этапов (аналогичных реакциям 6,7,8 цикла трикарбоновых кислот, см. рис. 102) превращается в янтарную кислоту:



Следующая реакция заключается в переносе КоА-группы с пропионил-КоА на сукцинат, в результате чего образуется сукцинил-КоА и пропионовая кислота. Реакция катализируется КоА-трансферазой:



Образовавшаяся пропионовая кислота выводится из процесса и накапливается вне клетки. Сукцинил-КоА с помощью мутазы превращается в метилмалонил-КоА:



В состав кофермента метилмалонил-КоА-мутазы входит витамин В₁₂. Перегруппировки типа, указанного в приведенном выше уравнении, характерны для реакций, катализируемых ферментами, содержащими кофермент В₁₂. В описанной выше реакции происходящие перемещения атомов в молекуле сводятся к двум типам: изменению углерод-углеродных связей и перераспределению водорода между углеродными атомами (рис. 59). Реакция, катализируемая мутазой, — ключевая в пропионовокислом брожении, так как в ней подготавливается субстрат, являющийся предшественником пропионовой кислоты.

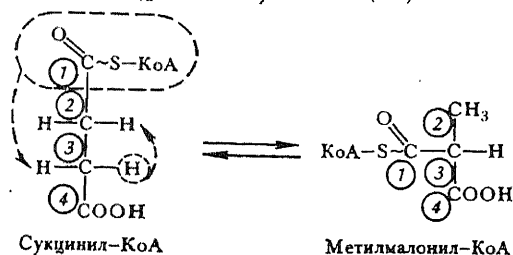
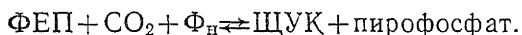


Рис. 59. Механизм реакции, катализируемой метилмалонил-КоА-мутазой. Цифрами в кружочках пронумерованы атомы углерода

Кофермент А, принимающий активное участие в пропионовокислом брожении, относится к группе мононуклеотидов (рис. 60). Он содержит аденин, Д-рибозу, пирофосфатную группу и пептидоподобное соединение, в состав которого входит пантотеновая кислота — еще один витамин группы В. Функция кофермента А заключается в переносе ацильных групп (R CO⁻). Ацильная форма КоА представляет собой тиоэфир. Тиоэфирная связь, образуемая между карбоксильной группой кислоты и тиоловой группой КоА, является высокоэнергетической.

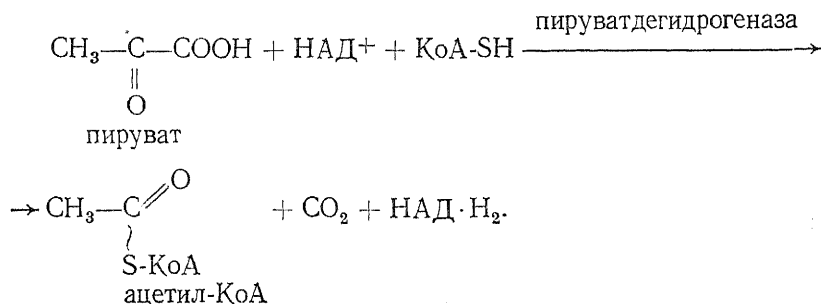
Итак, разобранный выше поток реакций приводит к синтезу пропионовой кислоты. Однако пропионовокислое брожение — более сложный процесс, поскольку наряду с пропионовой кислотой в качестве продуктов брожения образуются уксусная, янтарная кислоты и СО₂. В схеме, изображенной на рис. 58, янтарная кислота образуется как промежуточное соединение на пути, ведущем к синтезу пропионата; но она может накапливаться в среде и как конечный продукт. К образованию сукцината, количество которого зависит от содержания СО₂ в среде, ведет последовательность реакций, начинающаяся с карбоксилирования фосфоенолпирувата (рис. 61). Пропионовые бактерии содержат ФЕП-карбокситрансфосфорилазу, катализирующую реакцию карбоксилирования, в которой остаток фосфорной кислоты фосфоенолпирувата переносится на неорганический фосфат, что приводит к образованию пирофосфата:



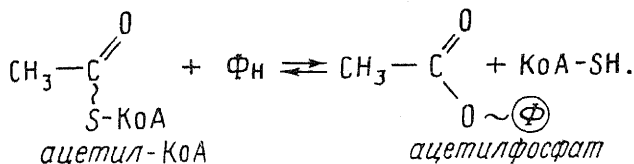
Дальнейшие превращения ЩУК до янтарной кислоты аналогичны реакциям 2—4, изображенным на рис. 58.

Многие пропионовые бактерии сбрасывают глюкозу так, что на каждую молекулу пирувата, окисленную до уксусной кислоты и СО₂,

приходится 2 молекулы пирувата, восстановленные до пропионовой кислоты. Путь превращения пирувата, приводящий к образованию уксусной кислоты и CO_2 , представлен на рис. 61. На этом пути имеют место окислительно-восстановительные реакции, идущие с вовлечением новых молекул НАД^+ . Пируват подвергается окислительному декарбосилированию с участием кофермента А:



Процесс катализируется пируватдегидрогеназным ферментным комплексом и практически необратим. В результате образуется ацетил-КоА — соединение с высокоэнергетической тиоэфирной связью. Ацетильная группа затем с помощью фосфотрансацетилазы переносится на неорганический фосфат, что приводит к образованию ацетилфосфата и регенерированию кофермента А:



В этой реакции энергия, заключенная в тиоэфирной связи, реализуется в виде высокоэнергетической фосфатной связи ацетилфосфата.

И наконец, ацетилфосфат донирует фосфатную группу на АДФ с образованием АТФ и уксусной кислоты:

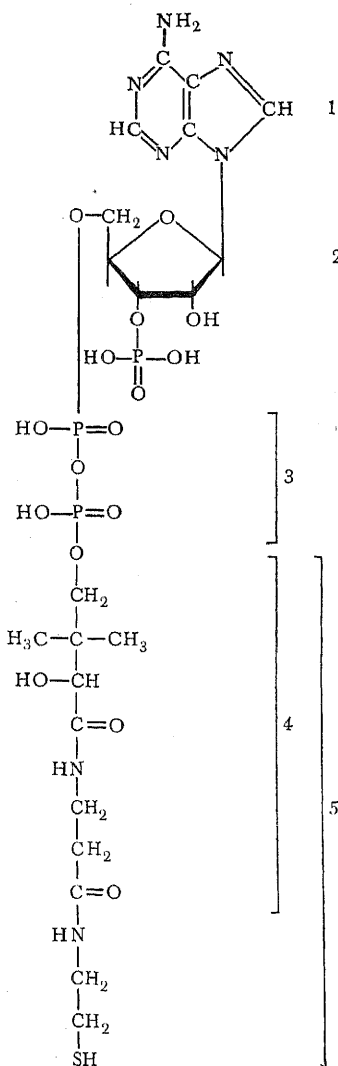
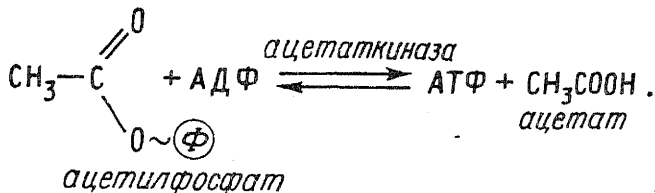


Рис. 60. Кофермент А:

1 — аденин; 2 — D-рибоза; 3 — пиррофосфатная группа; 4 — пантотеновая кислота; 5 — пептидоподобное соединение — пантотенил-β-аминоэтантол (по Dagleу, Nicholson, 1973)

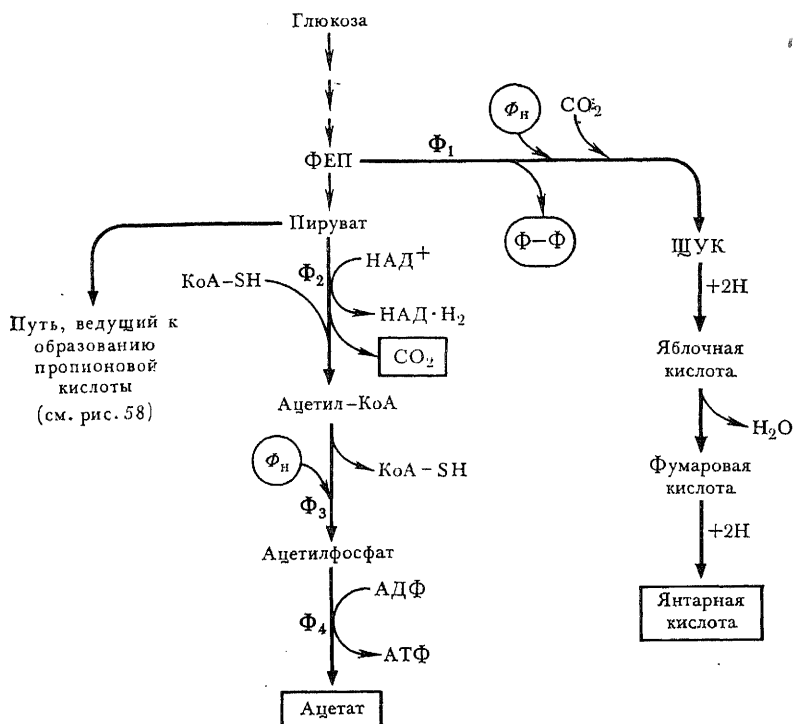


Рис. 61. Пути образования янтарной, уксусной кислот и CO_2 пропионовыми бактериями:
 Φ_1 — ФЕП-карбокситрансфосфорилаза; Φ_2 — пируватдегидрогеназа;
 Φ_3 — фосфотрансацилаза; Φ_4 — ацетаткиназа

Итак, на участке от пирувата до ацетата образуется 1 молекула $\text{NAD}\cdot\text{H}_2$ и 1 молекула ATP . Энергетическое значение для пропионовых бактерий этого участка метаболического пути очевидно и не требует обсуждения.

Кроме основных продуктов в разных количествах в культуральной жидкости пропионовых бактерий обнаружены молочная, муравьиная, изовалериановая кислоты, этиловый и пропиловый спирты, уксусный и пропионовый альдегиды, ацетон, диацетил. Состав конечных продуктов брожения зависит от культуры бактерий, состава среды и условий культивирования. Это касается как видов накапливаемых продуктов, так и количественных соотношений между ними.

Теоретически пропионовое брожение должно приводить к образованию 4 молекул ATP при сбраживании 1,5 молекулы глюкозы. Однако было обнаружено, что выход энергии несколько выше. Источником дополнительных молекул ATP , возможно, является этап восстановления фумаровой кислоты до янтарной, катализируемый фумаратредуктазой (см. рис. 58). В настоящее время получены экспериментальные данные в пользу того, что восстановление фумарата до сукцината — процесс, в результате которого некоторые первично анаэробные прокариоты могут синтезировать ATP в результате фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов. Показано, что фумаратредуктаза связана с мембраной и образует комплекс с переносчиком электронов хиноном. У некоторых прокариот в составе комплекса обнаружен цитохром *b*. Фумаратредуктазная система найдена у пропионовых бактерий. Этой системе в настоящее время придается

большое значение в эволюции как, возможно, первому шагу на пути создания многокомпонентных электронтранспортных цепей у прокариот.

Энергетическая эффективность пропионовокислого брожения связана также с выработкой пропионовыми бактериями новых метаболических способностей: реакций транскарбоксилирования и перегруппировки, участия в процессе КоА-производных. Образование дикарбоновой кислоты из пировиноградной с использованием механизма транскарбоксилирования вместо прямого карбоксилирования пирувата позволяет избежать дополнительных энергетических затрат на этом этапе брожения. Все это, вместе взятое, позволяет рассматривать пропионовокислое брожение как более совершенный из рассмотренных до сих пор способов получения энергии в анаэробных условиях.

Пропионовокислые бактерии

В эту группу, объединяемую в род *Propionibacterium*, входят грамположительные, неподвижные, не образующие спор палочковидные бактерии, размножающиеся бинарным делением. Для них характерна неправильная и изменчивая форма клеток, зависящая от условий культивирования и цикла развития. Обычно клетки булавовидные с одним округленным и другим конусообразным или заостренным концом. Клетки некоторых культур могут быть кокковидными, удлиненными, раздвоенными и даже разветвленными; обычно располагаются поодиночке, парами (в виде букв V или Y), короткими цепочками или группами в форме «китайских иероглифов». В Определителе бактерий Берги (1974) род *Propionibacterium* представлен 8 бактериальными видами, различающимися нуклеотидным составом ДНК (молярное содержание ГЦ-пар оснований от 59 до 66%). Типовой вид — *P. freudenreichii*.

Большинство пропионовокислых бактерий — аэротолерантные анаэробы, получающие энергию в процессе брожения, основным продуктом которого является пропионовая кислота. Аэротолерантность их обусловлена наличием полностью сформированной ферментной системы защиты от токсических форм кислорода (супероксидный анион, перекись водорода). У пропионовокислых бактерий обнаружены супероксиддисмутазная, каталазная и пероксидазная активности. Внутри группы отношение к O₂ различно. Некоторые из видов могут расти в аэробных условиях.

Брожение не исчерпывает всех возможностей получения энергии этой группой прокариот. Хотя гликолитическое расщепление глюкозы с образованием в качестве обязательного промежуточного соединения при брожении пировиноградной кислоты является основным путем разложения глюкозы, кроме этого пути в группе пропионовых бактерий обнаружен окислительный пентозофосфатный путь, реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), активное «флавиновое дыхание» и окислительное фосфорилирование, сопряженное с электронтранспортной системой. Вклад каждого из этих путей в общий энергетический метаболизм зависит как от вида бактерий, так и от конкретных внешних условий. Эволюция пропионовых бактерий определенно шла по пути приспособления к аэробным условиям. У некоторых видов обнаружен «эффект Пастера»: в присутствии кислорода воздуха переключение с брожения на дыхание. Пропионовые бактерии могут синтезировать гемсодержащие белки. В их клетках обнаружены цитохромы.

Важную роль в аэробном метаболизме пропионовых бактерий играет «флавиновое дыхание», которому приписывают основную связь этих бактерий с молекулярным кислородом. В процессе «флавинового дыхания» происходит перенос двух электронов с флавопротеидов на молекулярный кислород, сопровождающийся образованием перекиси водорода, которая разлагается бактериальной каталазой и пероксидазой. Однако «флавиновое дыхание» не связано с получением клеткой энергии. Транспорт электронов в дыхательной цепи некоторых пропионовых бактерий сопровождается образованием АТФ, что может указывать на подключение к этому процессу цитохромов, однако эффективность окислительного фосфорилирования низка. Последнее, вероятно, объясняется несовершенством механизмов сопряжения. В то время как в аэробных условиях конечным акцептором электронов с НАД·Н₂ является молекулярный кислород, в анаэробных условиях им может быть нитрат, фумарат.

Таким образом, в группе пропионовых бактерий мы впервые при рассмотрении прокариотных форм сталкиваемся с большим разнообразием энергетических возможностей, что выражается в сложном организованном ферментном аппарате энергетического обмена этих прокариот. В целом у пропионовых бактерий достаточно четко просматриваются две тенденции: с одной стороны, усовершенствование основного анаэробного способа получения энергии, с другой — попытки приспособления и, более того, рационального использования молекулярного кислорода.

Конструктивный метаболизм пропионовых бактерий претерпел дальнейшую эволюцию в сторону усложнения ферментного аппарата и большей независимости от органических соединений внешней среды. Пропионовые бактерии характеризуются хорошо развитыми биосинтетическими способностями и могут расти на простой синтетической среде с аммонийным азотом в качестве единственного источника азота при добавлении к среде пантотеновой кислоты и биотина, а для некоторых видов и тиамин. У ряда пропионовых бактерий обнаружена способность к азотфиксации.

Местообитание пропионовых бактерий — кишечный тракт жвачных животных, молоко, твердые сыры, в приготовлении которых они принимают участие. После молочнокислого брожения, когда лактоза превращена в молочную кислоту, начинают размножаться пропионовые бактерии, сбразивающие молочную кислоту с образованием уксусной и пропионовой кислот. Эти кислоты придают сырам специфический острый вкус. В настоящее время пропионовые бактерии используются в микробиологической промышленности в качестве продуцентов витамина В₁₂.

Маслянокислое брожение

Следующий вариант решения донор-акцепторной проблемы на базе гликолитически образованного пирувата представляет собой маслянокислое брожение. Новое в маслянокислом брожении — возникновение реакций конденсации типа $C_2 + C_2 \rightarrow C_4$, в результате чего образуется С₄-акцепторная кислота. Судьба этой кислоты различна и определяется необходимостью акцептирования водорода с НАД·Н₂, освобождающегося в процессе брожения, а это в свою очередь тесно связано с оттоком водорода на конструктивные процессы. В качестве конечных С₄-продуктов в процессе брожения возникают соединения

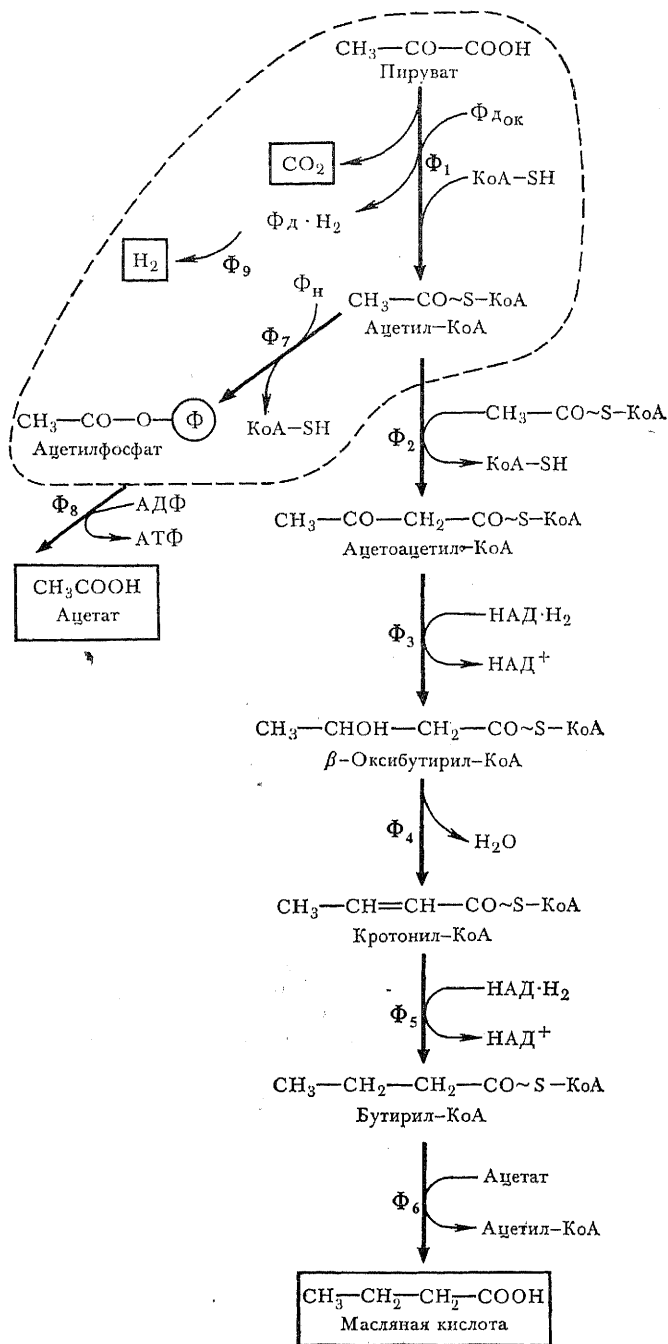


Рис. 62. Пути превращения пирувата в маслянокислом брожении, осуществляемом *Clostridium butyricum*:

Φ_1 — пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза; Φ_2 — ацетил-КоА-трансфераза (тиолаза); Φ_3 — β -оксибутирил-КоА-дегидрогеназа; Φ_4 — кротоназа; Φ_5 — бутирил-КоА-дегидрогеназа; Φ_6 — КоА-трансфераза; Φ_7 — фосфотрансацетилаза; Φ_8 — ацетаткиназа; Φ_9 — гидрогеназа. Пунктиром обведены ферментативные реакции, участвующие в процессе фосфоролитического расщепления пирувата

различной степени восстановленности. Характерным C_4 -продуктом брожения является масляная кислота. Осуществляют такой тип брожения многие бактерии, относящиеся к роду *Clostridium*.)

Типичными представителями кластридиев, осуществляющих маслянокислое брожение, являются *C. butyricum* и *C. pasteurianum*. Они сбраживают сахара с образованием масляной и уксусной кислот, CO_2 и H_2 (рис. 62). Превращение глюкозы до пирувата осуществляется по гликолитическому пути. Следующая реакция — разложение пирувата до ацетил-КоА и CO_2 , сопровождающееся образованием восстановленного ферредоксина. Реакция катализируется ферментом пируват: ферредоксин-оксидоредуктазой и является ключевой в маслянокислом брожении. Особенности реакции — участие в ней белков, содержащих негемовое железо и кислотолабильную серу (FeS-белки), входящих как в состав пируват: ферредоксин-оксидоредуктазы, так и выполняющих функцию переносчиков электронов (ферредоксин).

К FeS-белкам относится группа белков, участвующих в процессах электронного транспорта (ферредоксины), и ряд ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. В настоящее время установлено, что FeS-белки являются ключевыми в таких важных клеточных процессах, как фотосинтез, дыхание, азотфиксация, фиксация CO_2 .

Впервые белок, содержащий негемовое железо, названный ферредоксином, был выделен в 1962 г. при изучении азотфиксации *C. pasteurianum*. Вскоре было показано, что FeS-белки есть у самого широкого круга организмов: у прокариот и эукариот, в том числе у высших растений и животных. Отличительная особенность FeS-белков — строение их простетической группы, содержащей негемовое железо, координационно связанное с пептидной цепью через сульфгидрильные группы цистеиновых остатков. Три типа железосероцентров (FeS-центры) широко распространены в клетках. Простейший из них содержит один атом железа, координационно связанный в молекуле белка, получившего название рубредоксина, с четырьмя остатками цистеина (рис. 63, А).

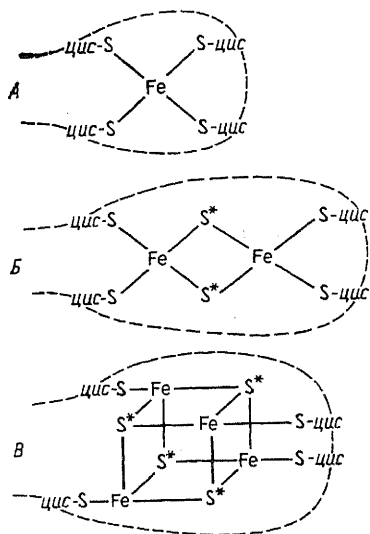


Рис. 63. Схематическое изображение железосероцентров FeS-белков. Железосероцентр рубредоксина (А); предполагаемые модели железосероцентров Fe_2S_2 -типа (Б) и Fe_4S_4 -типа (В). Звездочкой отмечена неорганическая кислотолабильная сера; прерывистой линией обозначена полипептидная цепь; цис — цистеин

Обнаруженный у *C. pasteurianum* рубредоксин имеет окислительно-восстановительный потенциал около -57 мВ и участвует в реакциях одноэлектронного переноса.

Остальные FeS-белки имеют более сложноорганизованные FeS-центры, в состав которых входит также неорганическая кислотолабильная сера⁴. Известны два типа таких центров: один содержит по два атома железа и неорганической серы (Fe_2S_2), другой — по четыре (Fe_4S_4) (рис. 63, Б, В). FeS-белки могут содержать один или

⁴ Кислотолабильной она названа потому, что при кислотной обработке белка происходит ее выделение в виде H_2S .

более FeS-центров в молекуле. У большинства FeS-содержащих ферментов помимо FeS-центров в молекуле имеются и иные кофакторы: металлы (молибден, селен), хромовые группы (флаavin, геммы, птеридины), витамины.

До недавнего времени считали, что ферредоксины Fe₂S₂-типа характерны для хлоропластов высших растений и клеток цианобактерий. Позднее они были обнаружены у разных групп бактерий, хотя у прокариот менее распространены по сравнению с Fe₄S₄-ферредоксинами. Клостридии содержат ферредоксины с центрами Fe₄S₄-типа и молекулярной массой 6000—7000. В молекуле ферредоксина может быть локализован один (*C. thermoaceticum*) или два (*C. pasteurianum*, *C. acidivorans*) Fe₄S₄-центра. Ферредоксины некоторых бактерий содержат до 3 и даже 4 центров Fe₄S₄-типа.

В зависимости от особенностей строения FeS-центров ферредоксины могут осуществлять одновременный перенос одного или двух электронов. Окислительно-восстановительный потенциал ферредоксинов находится в диапазоне от —490 до —310 мВ, однако описаны FeS-белки, окислительно-восстановительный потенциал которых высоко положителен (около +350 мВ).

Ферредоксины играют центральную роль в метаболизме клостридиев, сопрягая каталитические процессы с биосинтетическими реакциями (рис. 64). Объясняется это тем, что у клостридиев (так же, как и других облигатных анаэробов) физиологические

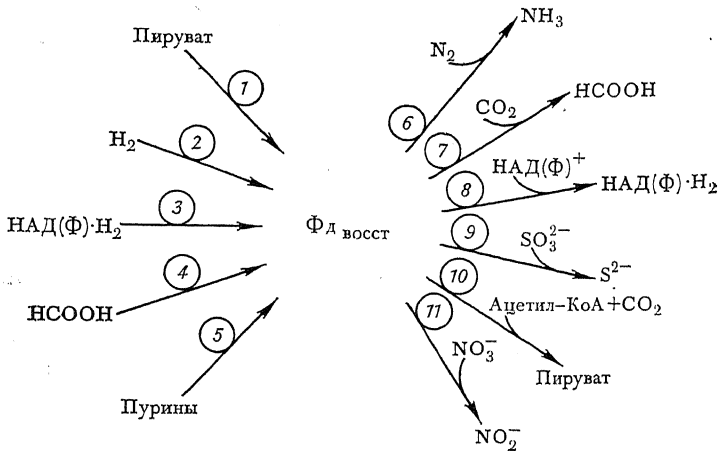


Рис. 64. Роль ферредоксина в метаболизме клостридиев:
1 — пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза; 2 — гидрогеназа; 3 — ферредоксин: НАД(Ф) — оксидоредуктаза; 4 — формат-дегидрогеназа; 5 — ксантиндегидрогеназа; 6 — нитрогеназа; 7 — ферредоксин: СО₂-оксидоредуктаза (возможно, это форматдегидрогеназа, катализирующая реакцию 4 в обратном направлении); 8 — реакция 3, протекающая в обратном направлении; 9 — сульфатредуктаза; 10 — реакция 1, протекающая в обратном направлении; 11 — нитратредуктаза

реакции в клетке всегда протекают при отрицательных окислительно-восстановительных потенциалах. В этих условиях FeS-белки, имеющие общий отрицательный окислительно-восстановительный потенциал, особенно пригодны для функционирования в составе ферментов и в качестве переносчиков электронов.

Молекулы FeS-содержащих ферментов в большинстве случаев организованы более сложно по сравнению с ферредоксинами. Только у небольшой части ферментов простетические группы представлены FeS-центрами, как у ферредоксинов. К этой группе ферментов относится гидрогеназа, катализирующая реакции поглощения и выделения Н₂. Основная масса FeS-содержащих ферментов имеет дополнительные кофакторы иной природы (табл. 18).

Образующийся в реакции восстановленный ферредоксин поставляет электроны для восстановления N₂, протонов (H⁺), СО₂ и НАДФ⁺, а последующее превращение ацетил-КоА приводит к синтезу АТФ в реакции субстратного фосфорилирования.

Путь, ведущий к синтезу масляной кислоты, начинается с реакции конденсации двух молекул ацетил-КоА, катализируемой ферментом

Железосеросодержащие ферменты прокариот

Простегическая группа	Ферменты
FeS-центры	гидрогеназа и др.
FeS-центры + тиаминпирофосфат	пируват : ферредоксин-оксидоредуктаза
FeS-центры + флавин	сукцинатдегидрогеназа, НАД(Ф)·Н ₂ -дегидрогеназа; глутаматсинтетаза и др.
FeS-центры + гем	диссимиляционная сульфитредуктаза
FeS-центры + молибден	нитрогеназа, диссимиляционная нитратредуктаза, формиатдегидрогеназа и др.
FeS-центры + два и более дополнительных кофактора	ассимиляционная сульфитредуктаза, ксантиндегидрогеназа и др.

тиолазой (см. рис. 62). Образовавшийся ацетоацетил-КоА восстанавливается в β -оксибутирил-КоА при участии фермента β -оксибутирил-КоА-дегидрогеназы. Источником электронов в этой реакции и дальше на пути синтеза масляной кислоты служат молекулы НАД·Н₂, образующиеся при окислении 3-ФГА в 1,3-ФГК (см. рис. 56).

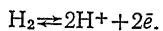
Дальнейшее превращение заключается в отщеплении от молекулы β -оксибутирил-КоА молекулы воды. Реакция катализируется кротоназой и приводит к образованию соединения с двойной углеродной связью. Кротонил-КоА ферментативно восстанавливается в бутирил-КоА. Масляная кислота образуется в реакции переноса кофермента А с молекулы бутирил-КоА на ацетат, катализируемой КоА-трансферазой. Эта реакция более «выгодна» для клетки, так как не приводит к потере энергии (в отличие от реакции простого гидролиза). Образующийся в реакции ацетил-КоА возвращается в метаболический поток и может быть использован для синтеза АТФ (реакция 7 на рис. 62) или же вновь участвовать в последовательности реакций, ведущих к синтезу масляной кислоты (реакции 2—6, там же).

Разобранный выше путь, завершающийся синтезом масляной кислоты, не связан с получением клеткой энергии, поскольку ни на одном из этапов не происходит образования АТФ. Единственное назначение метаболических превращений ацетил-КоА по этому пути — акцептирование электронов, переносимых на НАД⁺ в процессе гликолитического метаболизирования глюкозы: две молекулы НАД·Н₂ образуются на этапе гликолиза, и на двух этапах превращений ацетил-КоА до масляной кислоты происходит потребление водорода с НАД·Н₂.

В связи с этим особо важное значение приобретает превращение ацетил-КоА, ведущее к синтезу ацетата, поскольку именно с этим путем связано дополнительное получение кластридиями энергии в процессе маслянокислого брожения. К синтезу АТФ и образованию уксусной кислоты у маслянокислых бактерий ведет процесс фосфоролитического расщепления пирувата. Первоначально полагали, что это одна реакция. Позднее было установлено, что процесс включает несколько ферментативных реакций (см. рис. 62). Сначала

происходит окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты, катализируемое пируват: ферредоксин-оксидоредуктазой. Далее гидрогеназа катализирует выделение молекулярного водорода с восстановленного ферредоксина.

Гидрогеназы — одна из групп FeS-содержащих ферментов, катализирующих реакции поглощения и выделения молекулярного водорода. К настоящему времени гидрогеназы обнаружены у разных групп прокариот: облигатных анаэробов и аэробов, факультативных форм, у хемо- и фототрофных организмов. Гидрогеназы различаются по строению молекулы, природе доноров и акцепторов электронов, с которыми взаимодействуют, локализации в клетке, выполняемым функциям. Но все гидрогеназы катализируют следующую реакцию:



Гидрогеназа *C. pasteurianum*, один из наиболее детально изученных ферментов, — это белок с молекулярной массой около 60 000, представленный одной субъединицей. В молекуле содержится три центра типа Fe_4S_4 . Донором (акцептором) электронов кластриальной гидрогеназы служит ферредоксин.

При разрушении клеток *C. pasteurianum* гидрогеназная активность проявляется только в растворимой фракции. Более детальное изучение локализации в клетке этого фермента обнаружило его в периплазматическом пространстве и цитоплазме. Гидрогеназа, локализованная в периплазматическом пространстве, по имеющимся данным, катализирует необратимую реакцию поглощения H_2 . Находящаяся в цитоплазме гидрогеназа способна катализировать реакции как поглощения, так и выделения H_2 . У кластридий она входит в состав ферментного комплекса, осуществляющего окислительное декарбоксилирование пирувата (см. рис. 62).

Основная функция гидрогеназ кластридий (и других облигатных анаэробов) заключается в избавлении от избытка образующихся в катаболических реакциях восстановительных эквивалентов (электронов), которые переносятся на H^+ и удаляются из клетки в виде молекулярного водорода.

Гидрогеназы других прокариот могут иметь более сложное строение: состоять из нескольких неидентичных субъединиц, содержать помимо FeS-центров флавины в качестве простетических групп. Помимо ферредоксинов гидрогеназы разных организмов могут взаимодействовать с довольно широким набором переносчиков электронов: цитохромами *c*, НАД(Ф), хинонами и др.

В то время как поглощение H_2 происходит только с участием гидрогеназ, выделение молекулярного водорода у прокариот, способных к фиксации N_2 , наряду с гидрогеназой может катализироваться и нитрогеназой. Согласно одной из точек зрения гидрогеназы возникли в результате усложнения структуры ферредоксинов.

Ацетил-КоА превращается в ацетилфосфат, а затем в ацетат, при этом синтезируется молекула АТФ. Две последние реакции аналогичны тем, которые происходят при образовании уксусной кислоты в пропионовокислом брожении (см. рис. 61).

Основным источником выделяемых при брожении газообразных продуктов (CO_2 и H_2) служит реакция окислительного декарбоксилирования пирувата. У кластридий описаны и другие пути образования молекулярного водорода. В частности, НАД· H_2 , возникающий на пути Эмбдена — Мейергофа — Парнаса, может восстанавливать ферредоксин в реакции, катализируемой НАД· H_2 : ферредоксин-оксидоредуктазой, а с восстановленного ферредоксина H_2 выделяется при участии гидрогеназы. Как видно, природа нашла различные пути для избавления от избытка восстановительных эквивалентов и для регенерирования и последующего возвращения в клеточный метаболизм промежуточных переносчиков водорода.

Выведение уравнения маслянокислого брожения и определение его энергетического выхода затруднительно из-за лабильности процесса, состоящего из двух основных ответвлений: одного — окислительного, ведущего к образованию ацетата и АТФ, другого — восстановительного, функция которого — акцептирование водорода, образовавшегося в процессе гликолиза. Количественное соотношение между обоими от-

ветвлениями зависит от многих внешних факторов (состав среды, стадия роста и др.).

Расчеты показали, что в целом на 1 моль сбраживаемой глюкозы в маслянокислом брожении образуется 3,3 моля АТФ. Это наиболее высокий энергетический выход брожения, т. е. получения энергии за счет субстратного фосфорилирования, из всех рассмотренных выше типов брожений.

Некоторые клостридии (*C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. cellulosivorum* и др.) при сбраживании сахаров наряду с кислотами образуют нейтральные продукты (бутиловый, изопропиловый, этиловый спирты, ацетон). Особенно много нейтральных продуктов образуется культурой *C. acetobutylicum*, что дало основание в свое время выделить как вариант маслянокислого брожения ацетоно-бутиловое брожение. У клостридий, осуществляющих ацетоно-бутиловое брожение, образование масляной кислоты происходит на первом этапе брожения.

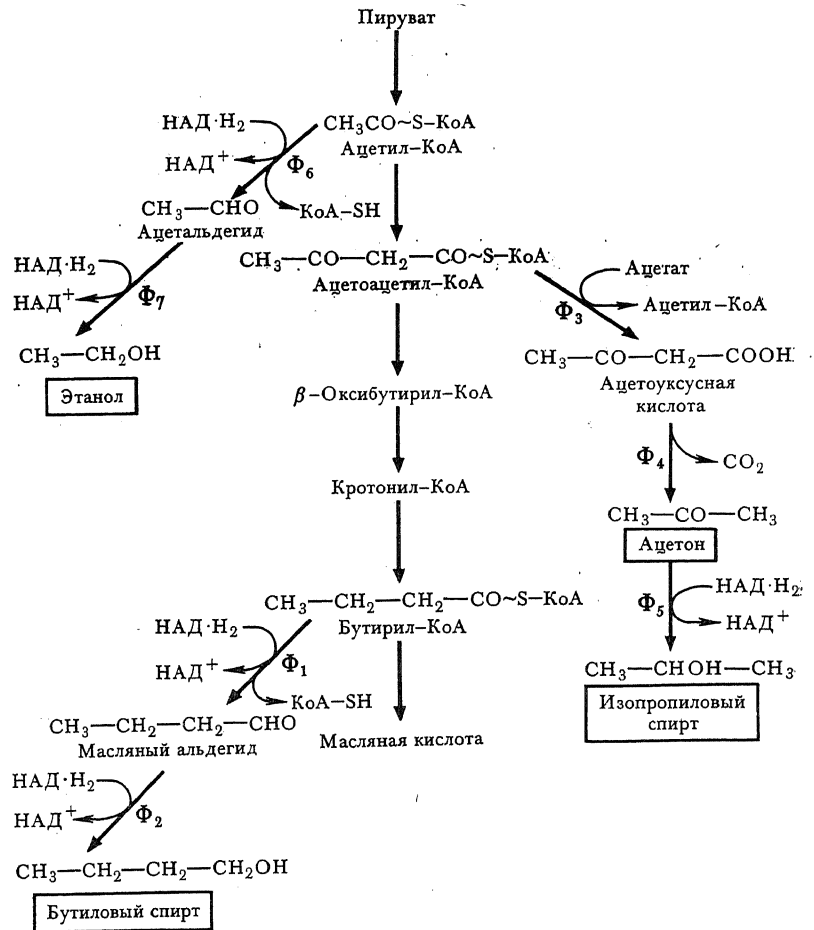


Рис. 65. Образование нейтральных продуктов при маслянокислом брожении:

Φ_1 — бутиралальдгиддегидрогеназа; Φ_2 — бутанолдегидрогеназа;
 Φ_3 — КоА-трансфераза; Φ_4 — ацетоацетатдекарбоксилаза; Φ_5 — изо-
 пропанолдегидрогеназа; Φ_6 — ацетальдегиддегидрогеназа; Φ_7 — ал-
 когольдегидрогеназа

По мере подкисления среды индуцируется синтез ферментов, приводящих к накоплению нейтральных продуктов, в первую очередь *n*-бутанола и ацетона. *n*-Бутанол образуется из бутирил-КоА, предшественника масляной кислоты, в результате двух последовательных ферментативных реакций (рис. 65). Первая из них заключается в отщеплении кофермента А и одновременном гидрировании, приводящем к образованию масляного альдегида. Последующее его восстановление с помощью НАД·Н₂ приводит к появлению *n*-бутанола. Путь, ведущий к образованию ацетона, начинается от ацетоацетил-КоА с переноса от последнего кофермента А на ацетат. Декарбоксилирование ацетоуксусной кислоты приводит к образованию ацетона. Образование этанола происходит в результате двухступенчатого восстановления ацетил-КоА.

Физиологический смысл дополнительных ферментативных этапов у *S. acetobutylicum*, ведущих к накоплению в среде *n*-бутанола, этанола и ацетона, заключается в образовании конечных продуктов нейтрального характера. Первоначально нейтральный рН среды вследствие накопления масляной и уксусной кислот быстро падает. Некоторые клостридии выработали механизм борьбы с нарастающей кислотностью, который начинает функционировать при низком рН среды и приводит к появлению перечисленных выше нейтральных продуктов. Одновременно происходит понижение общей кислотности среды, что также свидетельствует об активном противодействии этих бактерий неблагоприятным условиям среды.

Изучение физиологии группы клостридиев, осуществляющих ацетоно-бутиловое брожение, привело к открытию В. Н. Шапошниковым (1884—1968) явления двухфазности этого брожения, которое позднее было обнаружено в большинстве типов брожений, характеризующихся сложным набором конечных продуктов. В основе явления двухфазности лежит тесная связь между конструктивными и энергетическими процессами. Вначале, когда имеет место активный рост культуры, сопровождающийся интенсивными биосинтетическими процессами, происходит значительный отток образующегося при брожении восстановителя для конструктивных целей. Это сопровождается преобладающим синтезом более окисленных конечных продуктов брожения (I фаза). При затухании роста и переходе культуры в стационарное состояние уменьшается потребность в восстановителе для конструктивных целей. Это приводит к большему его использованию в энергетических процессах и, следовательно, к образованию более восстановленных конечных продуктов брожения (II фаза). Таким образом, масштабы конструктивного метаболизма определяют характер и направление энергетических процессов.

Как можно оценить возникшую у маслянокислых бактерий последовательность ферментативных реакций, ведущих к синтезу масляной кислоты, а также дополнительные ферментативные этапы, ведущие к синтезу *n*-бутанола и ацетона? На пути от ацетил-КоА до масляной кислоты в двух точках имеет место акцептирование водорода с НАД·Н₂. Синтез *n*-бутанола из бутирил-КоА связан еще с двумя восстановительными этапами. Итак, образование *n*-бутанола вызвано не только противодействием нарастающей кислотности. Этот дополнительно развившийся участок пути весьма эффективен в качестве ферментативных преобразований, связанных с утилизацией возникающих в процессе брожения молекул НАД·Н₂.

Рассмотрим под этим же углом зрения путь, ведущий к синтезу

ацетона. Метаболизирование части ацетоацетил-КоА через ацетоуксусную кислоту в ацетон приводит к определенной потере потенциальных акцепторов водорода, которые могли бы на пути к образованию масляной кислоты или *n*-бутанола присоединить соответствующее количество водорода с НАД·Н₂. Однако этот путь является более коротким путем образования нейтральных продуктов, что, вероятно, для бактерий в определенных условиях выгодно. Кроме того, попыткой как-то компенсировать этот недостаток можно объяснить возникновение у некоторых видов клостридий способности ферментативно восстанавливать ацетон в изопропанол с использованием водорода с НАД·Н₂.

С точки зрения решения обеих проблем (нейтрализация среды и акцептирование восстановительных эквивалентов, образующихся при гликолизе), наиболее эффективен путь, ведущий к синтезу этанола, на двух этапах которого происходит акцептирование водорода с НАД·Н₂. Некоторые клостридии в качестве одного из нейтральных продуктов образуют значительные количества этанола.

Бактерии рода *Clostridium*

К клостридиям относят большое количество видов бактерий, число которых постоянно возрастает. В настоящее время это один из самых крупных родов в мире прокариот. Принадлежность к роду определяется на основании только трех признаков: 1) способности образовывать эндоспоры; 2) облигатно анаэробного характера энергетического метаболизма; 3) неспособности осуществлять диссимиляционное восстановление сульфата. Отсюда понятно, что эта таксономическая группа прокариот чрезвычайно гетерогенна, о чем, в частности, свидетельствует интервал значений ГЦ-оснований ДНК, молярное содержание которых с учетом описанных новых видов занимает область от 21 до 57%.

Из этого можно также сделать вывод, что организмы, объединяемые в род *Clostridium*, нельзя рассматривать как эволюционно однотипные. Последующая характеристика их метаболических особенностей дает достаточно четкое представление об этом. Изучение прокариот, относимых в настоящее время к клостридиям, наоборот, указывает на раннее расхождение видов рода в процессе эволюции.

За исключением *C. coccoides*, вегетативные клетки бактерий из рода *Clostridium* имеют форму прямых или слегка изогнутых палочек с закругленными концами (рис. 66). Большинство видов грамположи-



Рис. 66. Схематическое изображение процесса спорообразования у клостридий:

1 — молодые вегетативные клетки; 2 — клетки, находящиеся в стационарной фазе; 3, 4 — стадии спорообразования; 5 — клетки с созревшими спорами (по Иерусалимскому, 1963)

тельные, подвижные. Движение осуществляется с помощью перитрихально расположенных жгутиков. По мере старения в процессе цикла развития клетки теряют подвижность, накапливают гранулезу (запасное вещество типа крахмала) и переходят к спорообразованию. Об-

разующиеся споры овальной или сферической формы. Диаметр их, как правило, превышает диаметр вегетативной клетки, поэтому, если формирующаяся спора расположена в центре клетки, последние меняют форму, становясь веретеновидными (рис. 66); если же споры образуются у одного из клеточных концов (терминально), клетки приобретают форму барабанных палочек.

Клостридии — облигатные анаэробы. Однако спектр их чувствительности к молекулярному кислороду достаточно широк, что связано с обнаружением в клетках большинства клостридий супероксиддисмутазы и с другими приспособлениями на уровне клеточных популяций, помогающими нейтрализовать токсические эффекты молекулярного кислорода и его производных. Именно при работе с клостридиями Л. Пастер в 1861 г. открыл форму жизни без кислорода.

Энергетический метаболизм

В зависимости от вида сбраживаемого субстрата выделяют несколько физиологических групп клостридий: сахаролитические клостридии, использующие в качестве субстратов брожения вещества углеводной природы (моносахара, крахмал, клетчатка); протеолитические клостридии, субстратами брожения которых являются белки, пеп-

Таблица 19

Основные продукты брожения некоторых сахаролитических клостридий, не образующих масляной кислоты

Организм	Основные продукты брожения
<i>C. sphenoides</i> <i>C. glycolicum</i>	этанол, уксусная кислота, CO ₂ , H ₂
<i>C. cellobioparum</i>	этанол; уксусная, муравьиная, молочная кислоты; CO ₂ , H ₂
<i>C. clostridiiforme</i>	уксусная, молочная кислоты; CO ₂ , H ₂
<i>C. oroticum</i>	этанол; уксусная, молочная, муравьиная кислоты; CO ₂
<i>C. coccoides</i>	янтарная, уксусная кислоты
<i>C. durum</i>	этанол, пропанол; муравьиная, уксусная, молочная кислоты
<i>C. nexile</i>	этанол; муравьиная, уксусная, молочная, янтарная кислоты; H ₂
<i>C. quercicolum</i>	уксусная, пропионовая кислоты, H ₂
<i>C. ramosum</i>	муравьиная, уксусная, молочная, янтарная кислоты
<i>C. aceticum</i> <i>C. thermoaceticum</i> <i>C. formicoaceticum</i> <i>C. spiroforme</i>	уксусная кислота

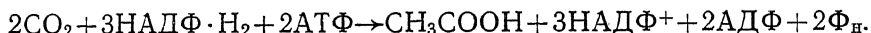
тиды, аминокислоты, и пуринолитические клостридии, специфически приспособленные к сбраживанию гетероциклических соединений (пурины и пиримидины). Среди них есть виды, обладающие довольно широкими возможностями (субстратами брожения служат как углеводы, так и белки), и узкоспециализированные виды, способные использовать в качестве источника энергии и углерода какое-либо одно или очень небольшое число соединений.

Субстратами брожения сахаролитических клостридий служат такие моносахара, как глюкоза, фруктоза, лактоза, ксилоза и др. Некоторые виды могут использовать крахмал (*C. butyricum*), целлюлозу (*C. cellobioparum*), пектин (*C. felsineum*), хитин (*C. sporogenes*), предварительно гидролизуемые соответствующими экзоферментами. Типичными представителями сахаролитических клостридий, осуществляющих разобранное в предыдущем разделе классическое маслянокислое брожение, являются *C. butyricum* и *C. pasteurianum*. Известны среди клостридий виды, сбраживающие сахара по гликолитическому пути, но без образования масляной кислоты (табл. 19). Пути, ведущие к биосинтезу большинства перечисленных в таблице продуктов брожений, осуществляемых клостридиями, уже обсуждались нами при разборе маслянокислого и других видов брожений.

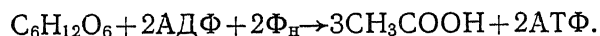
Для некоторых клостридий (*C. aceticum*, *C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum* и др.) характерно сбраживание сахаров, приводящее практически к образованию только одного конечного продукта — уксусной кислоты; из 1 молекулы сброженной гексозы синтезируются около 3 молекул ацетата. Изучение последовательности биохимических реакций, приводящих к этому, показало, что сбраживание 1 молекулы гексозы по гликолитическому пути приводит к образованию только 2 молекул ацетата. Одновременно образуются и 2 молекулы CO_2 . Третья молекула ацетата синтезируется принципиально иным путем: углекислота используется как акцептор электронов и восстанавливается до ацетата за счет восстановительных эквивалентов, образующихся на путях клеточного катаболизма. Схема реакций, ведущих к синтезу молекулы ацетата из 2 молекул CO_2 , следующая:

- 1) $\text{CO}_2 + \text{НАДФ} \cdot \text{H}_2 \rightarrow \text{НСООН} + \text{НАДФ}^+$;
- 2) $\text{НСООН} + \text{ТГФК} + \text{АТФ} \rightarrow \text{формил-ТГФК} + \text{АДФ} + \text{Ф}_\text{H}$;
- 3) $\text{формил-ТГФК} + 2\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2 \rightarrow \text{СН}_3\text{-ТГФК} + 2\text{НАДФ}^+$;
- 4) $\text{СН}_3\text{-ТГФК} + \text{CO}_2 + \text{АТФ} \rightarrow \text{СН}_3\text{-СООН} + \text{ТГФК} + \text{АДФ} + \text{Ф}_\text{H}$.

В итоге:



Как видно из последнего уравнения, для образования молекулы ацетата расходуется 2 молекулы АТФ. Так как сбраживание глюкозы, приводящее к синтезу 2 молекул ацетата и CO_2 , сопровождается синтезом 4 молекул АТФ, суммарное уравнение брожения, получившего название гомоацетатного, следующее:



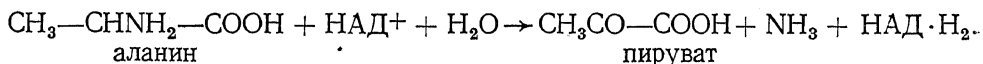
К протеолитическим относятся клостридии, имеющие активные протеолитические ферменты и поэтому способные использовать в качестве субстратов белки и пептиды, гидролизуя их до аминокислот и подвергая затем последние сбраживанию. В эту группу входят *C. putrificum*, *C. histolyticum*, *C. sporogenes* и другие сапрофитные виды. Близки к этим видам и некоторые патогенные формы: *C. bo-*

tulinum — продуцент ботулина — экзотоксина, являющегося одним из самых сильных биологических ядов; *C. tetani* — столбнячная палочка, образующая в организме человека столбнячный токсин. К протеолитическим клостридиям примыкают виды, использующие в качестве источника углерода и энергии ограниченное число свободных аминокислот. Например, *C. cochlearum* растет только на среде с глутаминовой кислотой, глутамином и гистидином; *C. sticklandii* может сбраживать лизин, аргинин, фенилаланин, серин, а *C. propionicum* — треонин, аланин, серин, цистеин.

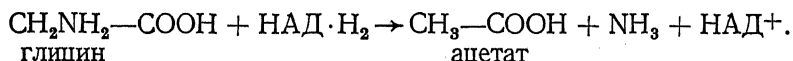
Известны два типа сбраживания аминокислот клостридиями. Для многих клостридий одна аминокислота может служить источником энергии и углерода, например, глутаминовая кислота — для *C. tetanomorphum*, лизин — для *C. sticklandii*. В этом случае ее диссимильная приводит к возникновению метаболитов, характерных для гликолитического пути, и в первую очередь пирувата, дальнейшие превращения которого идут по одному из путей, описанных выше. У *C. sticklandii* сбраживание лизина приводит к образованию масляной и уксусной кислот и NH_3 , а у *C. tetanomorphum* при сбраживании глутаминовой кислоты в дополнение к перечисленным выше продуктам образуется некоторое количество CO_2 .

Ряд аминокислот может подвергаться сбраживанию клостридиями только парами. Механизм процесса был расшифрован Л. Стиклендом (L. Stickland, 1935), показавшим, что при этом происходит сопряженное окисление-восстановление пары аминокислот, одна из которых окисляется, другая — восстанавливается. Такой тип сбраживания аминокислот получил название реакции Стикленда. Окисляемыми аминокислотами, т. е. донорами электронов, служат аспарагин, аланин, валин, серин, гистидин и др. Восстанавливаемые аминокислоты — глицин, пролин, орнитин, аргинин и др.

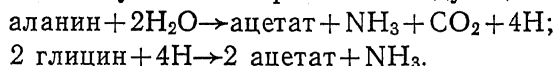
Наиболее обстоятельно изучен процесс сопряженного сбраживания аланина и глицина, которые, как правило, поодиночке большинством клостридий не используются. Первым этапом превращений аланина является его окислительное дезаминирование, приводящее к образованию соответствующей α -кетокислоты, в данном случае пирувата:



Пировиноградная кислота затем подвергается окислительному декарбоксилированию в реакции, катализируемой пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой, приводящей в конечном итоге к синтезу молекулы АТФ и ацетата. На двух этапах окислительного преобразования аланина возникают восстановленные переносчики, которые используются для восстановления второй аминокислоты — глицина. Восстановительное дезаминирование глицина до ацетата — довольно сложная реакция. Катализирующая ее ферментная система связана с мембраной и состоит из нескольких белков, включая белок, содержащий селен:



В целом сопряженные окислительно-восстановительные превращения аланина и глицина могут быть выражены следующим образом:

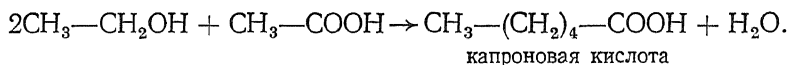
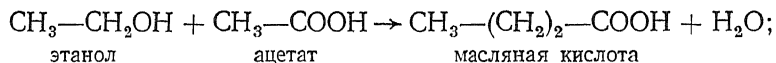


Получение энергии при сбраживании этой пары аминокислот свя-

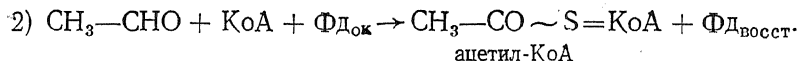
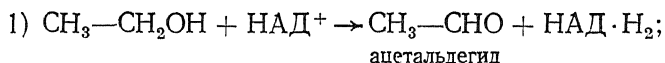
зано с окислением аланина и соответствует 1 молекуле АТФ на молекулу окисленного аланина.

Обнаружены клостридии, специфически приспособленные к сбраживанию гетероциклических азотсодержащих соединений, в том числе пуринов и пиримидинов, — пуринолитические клостридии. Относящиеся к этой группе виды часто узкоспециализированы в отношении пищевых субстратов. Так, *C. acidurici* и *C. cylindrosporum* могут расти, сбраживая только некоторые пурины (гуанин, ксантин, гипоксантин, мочевая кислота) до уксусной и муравьиной кислот, глицина, NH_3 и CO_2 . *C. uracilium* и *C. oroticum* могут сбраживать пиримидины. *C. oroticum* использует оротовую кислоту, выделяя в среду уксусную и дикарбоновую кислоты, CO_2 и NH_3 . *C. uracilium* использует урацил, который распадается до β -аланина, CO_2 и NH_3 . Сбраживание пуринов и пиримидинов — сложный процесс, состоящий из многих последовательных реакций, в некоторых из них путем субстратного фосфорилирования синтезируется АТФ.

Совершенно особый тип брожения осуществляет *C. kluyveri*, сбраживающий смесь этанола и уксусной кислоты до масляной, капроновой кислот и H_2 . Превращение этанола и уксусной кислоты в масляную и капроновую кислоты можно описать следующими уравнениями:



Однако ни одна из этих реакций не приводит к синтезу АТФ. Энергетическая сторона процесса долгое время оставалась неясной. Оказалось, что получение энергии связано с образованием молекулярного водорода в процессе окисления этанола, дегидрирование которого на двух этапах приводит к синтезу ацетил-КоА:



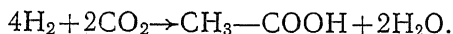
Электроны с ферредоксина могут переноситься далее на НАД^+ или на H^+ , что приводит в последнем случае к выделению H_2 . Следствием переноса части электронов на H^+ будет нарушение соотношения между количеством ацетил-КоА и $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$, необходимыми для синтеза масляной кислоты (см. рис. 62), в сторону относительного недостатка молекул восстановленного кофермента. Возникшие «избыточные» молекулы ацетил-КоА используются для синтеза АТФ в реакциях, описанных ранее. По проведенным подсчетам, энергетический выход этого вида брожения составляет около 1 моля АТФ на 6 молей этанола.

Таким образом, типы брожений, осуществляемых клостридиями, необычайно разнообразны как в отношении используемых субстратов, так и образуемых конечных продуктов, и виды, осуществляющие сбраживание углеводов по гликолитическому пути с образованием масляной кислоты в качестве одного из основных продуктов, являются только одной из групп организмов, относимых в настоящее время к роду *Clostridium*.

Особенности конструктивного метаболизма

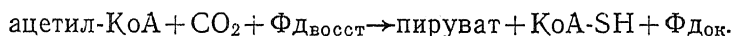
Потребности клостридиев в питательных веществах отличаются большим разнообразием. Как правило, клостридии могут расти только на сложных, богатых органическими соединениями средах. Многие клостридии выделяют экзоферменты, расщепляющие макромолекулы (углеводы, белки) на составляющие их мономеры. До сих пор только небольшое число видов удалось культивировать в лаборатории на синтетической среде. Для них выявлена потребность в витаминах (главным образом группы В) и наборе аминокислот.

Интересная особенность прокариот из рода *Clostridium* — дальнейшее развитие способности вовлекать углекислоту в клеточный метаболизм. У *C. kluyveri*, растущего на смеси С₂-соединений (этанол+ацетат), до 30% углерода клетки возникает из углерода СО₂. Для *C. acetivum* показана способность к автотрофному росту на минеральной среде за счет превращения Н₂ и СО₂ в ацетат:



Пути включения СО₂ в клеточный метаболизм клостридиев различны. Углекислота может использоваться ими в качестве конечного акцептора электронов, что приводит к прямому восстановлению СО₂ до формиата. Донорами электронов в этой реакции служат восстановленный ферредоксин или НАД·Н₂. Реакция может служить способом удаления избытка восстановительных эквивалентов, образующихся при брожении, т. е. быть необходимой для сбалансирования окислительных и восстановительных этапов в энергетическом метаболизме. Образовавшийся в результате восстановления СО₂ формиат может подвергаться дальнейшему восстановлению и служить источником метильных групп, используемых для клеточных биосинтезов.

Для разных видов клостридиев показана активная фиксация СО₂ на С₂- и С₃-соединениях, таких как ацетил-КоА, пропионил-КоА, пируват, в реакциях восстановительного карбоксилирования, например:



Дальнейший шаг вперед по пути независимости от среды связан с распространением у этой группы прокариот способности фиксировать атмосферный азот (небольшая способность к фиксации N₂ обнаружена у пропионовых бактерий). Первый анаэробный азотфиксатор был выделен из почвы С. Н. Виноградским и назван им в честь Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*.

Молекула N₂ чрезвычайно прочна. Чтобы разорвать три связи, соединяющие между собой два атома в молекуле N₂, необходимо затратить 941 кДж/моль, поэтому восстановление N₂ до NH₃ химическим путем — очень энергоемкий процесс. Фиксация молекулярного азота, до сих пор обнаруженная только у прокариот, осуществляется с помощью ферментной системы — нитрогеназы, состоящей из двух компонентов: малого (Fe-белок) и большого (MoFe-белок). Соотношение между ними у разных азотфиксирующих прокариот колеблется от 1:1 до 2:1, хотя в целом нитрогеназы из разных источников обнаруживают значительное сходство. Fe-белок (молекулярная масса около 60 000 Д) состоит из двух идентичных субъединиц, содержащих один Fe₄S₄-центр на димер.

MoFe-белок организован значительно более сложно: молекулярная масса от 200 000 до 220 000; построен из четырех субъединиц двух типов, т. е. может быть представлен как α₂β₂. Количественный состав

протетической группы MoFe-белка точно не установлен. По разным определениям, MoFe-белок *C. pasteurianum* содержит 2 атома молибдена, 20—24 атомов железа и столько же кислотолabileй серы. Часть железа и серы организованы в центры Fe₄S₄-типа. Кроме того, молибден, железо и сера входят в состав низкомолекулярного кофактора (MoFe-кофактор), локализуемого в активном центре нитрогеназы.

Для функционирования нитрогеназы необходим источник энергии в виде АТФ, ионы магния и восстановитель с низким окислительно-восстановительным потенциалом. У *C. pasteurianum* непосредственным донором электронов для восстановления N₂ служит восстановленный ферредоксин, электроны с которого поступают сначала на Fe-белок нитрогеназы (рис. 67). Восстановленный Fe-белок образует комплекс с молекулами Mg и АТФ, что приводит к сдвигу окислительно-восстановительного потенциала FeS-центра белка от —290 до —400 мВ. Это делает возможным последующий перенос электронов на MoFe-белок, в активном центре которого происходит восстановление N₂. Перенос 1 электрона на MoFe-белок сопровождается гидролизом как минимум 2 молекул АТФ. Так как за один раз

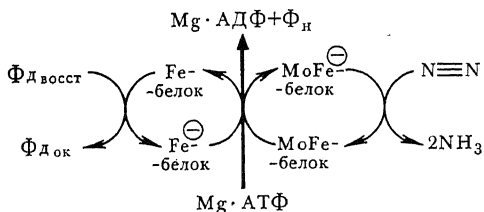
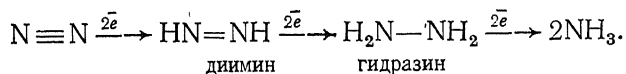


Рис. 67. Схематическое изображение функционирования нитрогеназы. \ominus — восстановленная форма белка. Объяснение см. в тексте

FeS-центрами ферредоксина, Fe- и MoFe-белков может быть перенесено не более 2 электронов, а для восстановления N₂ до аммиака необходимо 6 электронов, следовательно, процесс должен состоять не меньше чем из трех последовательных стадий восстановления:



Однако до сих пор не удалось обнаружить какие-либо частично восстановленные промежуточные продукты. Единственный до сих пор идентифицированный продукт восстановления — аммиак. Вероятно, промежуточные соединения остаются прочно связанными с нитрогеназой. По проведенным измерениям, для восстановления 1 молекулы N₂ требуется не менее 12 молекул АТФ. Таким образом, процесс азотфиксации связан с затратой большого количества клеточной энергии. Для ассимиляции 1 мг N₂ *C. pasteurianum* в процессе брожения перерабатывает около 500 мг сахара.

Помимо N₂ нитрогеназа может восстанавливать целый ряд других субстратов, таких как N₂O, C₂H₂ и его аналоги, N₃⁻, CN⁻. В отсутствие N₂ нитрогеназа катализирует выделение молекулярного водорода в реакции, протекающей с затратой АТФ. Это дает основание предполагать, что нитрогеназа является результатом дальнейшего усложнения молекулы гидрогеназы, приобретшей способность катализировать не только восстановление протонов, ведущее к выделению H₂, но и ряд других субстратов, в том числе и N₂.

Роль в природе и практическое значение

С жизнедеятельностью клостридий связаны различные процессы, протекающие в природе: разложение (гниение) азотсодержащих со-

единений (белков, нуклеиновых кислот) в анаэробных условиях; анаэробное разложение растительных материалов, таких как клетчатка, хитин. Некоторые сахаролитические клостридии могут использовать в качестве субстрата брожения пектиновые вещества, составляющие покровы растительных клеток. Пектин — полимер метил-D-галактуроновой кислоты. Последняя имеет сложное строение и при воздействии на нее пектиновыми ферментами гидролизуется на ряд сахаров, кислот и метиловый спирт. Клостридии, принадлежащие к виду *C. felsenium*, содержат активную пектиназу и могут поэтому получать энергию, осуществляя маслянокислое брожение пектиновых веществ. Этот вид играет важную роль в процессе мацерации волокон при мочке льна.

Еще в конце прошлого века было обнаружено, что некоторые клостридии патогенны, т. е. вызывают заболевания человека и животных. В основе патогенности клостридий лежит их способность синтезировать и выделять из клетки высокоэффективные токсины.

В настоящее время бактерии группы *Clostridium* находят практическое применение. Их используют в производстве масляной кислоты, необходимой для парфюмерной промышленности. Ацетоно-бутиловое брожение, осуществляемое некоторыми видами клостридий, используют для получения в промышленном масштабе ацетона и бутанола. В свое время в нашей стране возникла острая потребность в этих веществах. Получать их химическим путем в то время было гораздо сложнее, чем микробиологическим. В 30-х гг. академик В. Н. Шапошников организовал одно из первых в СССР промышленных микробиологических производств, на котором было освоено получение *n*-бутанола и ацетона с помощью клостридий.

Альтернативные пути сбраживания углеводов

В течение длительного времени считалось, что единственным путем сбраживания углеводов является гликолитический путь с различными вариантами метаболизирования пирувата. Однако постепенно накапливались данные, которые определенно указывали на существование иного, чем гликолиз, пути расщепления углеводов. Гликолитическая схема не могла объяснить использования прокариотами пентоз в качестве энергетического субстрата, а также того, каким путем они синтезируют необходимую для нуклеиновых кислот рибозу. В 40-е гг. работами нескольких лабораторий был расшифрован путь расщепления углеводов, отличный от гликолитического, получивший название окислительного пентозофосфатного пути (другие названия: гексозомонофосфатный путь, фосфоглюконатный путь, путь Варбурга — Диккенса — Хорекера).

Окислительный пентозофосфатный путь

Схема начальных этапов окислительного пентозофосфатного пути представлена на рис. 68. Первая реакция заключается в фосфорилировании глюкозы с помощью АТФ и превращении ее в метаболически активную форму глюкозо-6-фосфата, аналогично тому, что имеет место на первом этапе гликолиза. Следующий этап заключается в дегидрировании глюкозо-6-фосфата, катализируемом глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназой. Особенность реакции в том, что в ней участвуют НАДФ⁺, в качестве акцептора водорода. Образовавшееся соединение

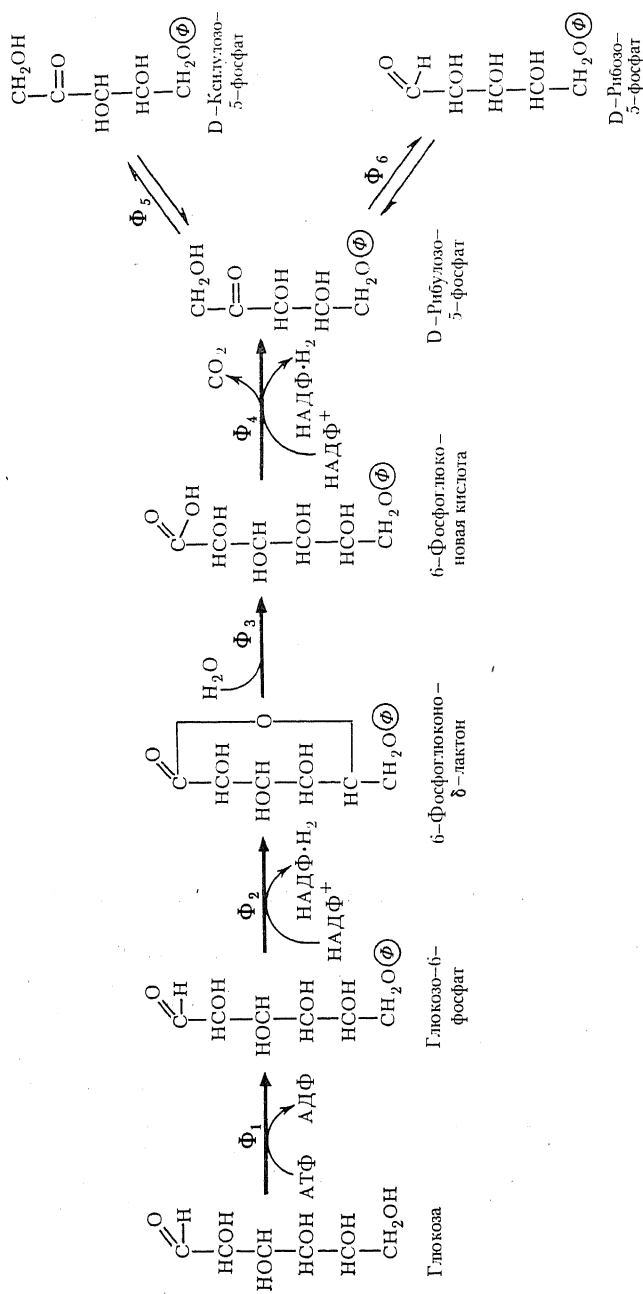
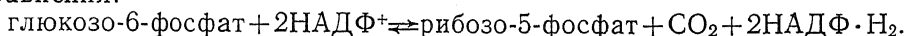


Рис. 68. Схема окислительного пентозофосфатного пути (начальные этапы): Φ_1 — гексокиназа; Φ_2 — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа; Φ_3 — лактоназа; Φ_4 — фосфоглюконатдегидрогеназа (декарбоксилирующая); Φ_5 — фосфопентозоэпимераза; Φ_6 — фосфопентозоизомераза (по Dagley, Nicholson, 1973)

очень нестойко и спонтанно или с помощью специального клеточного фермента лактоназы гидролизуется с образованием 6-фосфоглюконовой кислоты, которая подвергается окислительному декарбоксилированию, катализируемому фосфоглюконатдегидрогеназой. Эта реакция приводит к образованию соответствующего пентозофосфата, НАДФ·Н₂ и выделению СО₂. Рибулозо-5-фосфат обратимо превращается в ксилулозо-5-фосфат и рибозо-5-фосфат с участием ферментов фосфопентозоэпимеразы и фосфопентозоизомеразы соответственно.

Суммарно весь процесс можно представить в виде следующего уравнения:



Как видно, на этом этапе образуются 2 молекулы НАДФ·Н₂, которые могут потребляться в восстановительных биосинтетических процессах, и молекула рибозо-5-фосфата, используемого в синтезе нуклеиновых кислот и пентозосодержащих коферментов⁵. Примечательно, что ни на одном из окислительных этапов не синтезируется АТФ.

Первоначально окислительный пентозофосфатный путь возник, вероятно, для обеспечения прокариот пентозами. В этом случае возникновение только трех новых ферментов (глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, лактоназы и фосфоглюконатдегидрогеназы) уже приводило к синтезу пентоз. Поскольку к этому времени функционировали изомеразные ферменты гликолитического пути (фосфоглюкозоизомераза и триозофосфатизомераза), формирование фосфопентозоизомеразы, катализирующей превращение рибулозо-5-фосфата в рибозо-5-фосфат, произошло довольно легко. Действительно, при определенных условиях окислительный пентозофосфатный путь на этом завершается.

Дальнейшее его развитие, вероятно, связано с энергетическими потребностями клетки. Меньшей части образующегося рибозо-5-фосфата оказалось достаточно для удовлетворения всех потребностей клетки в пентозах. Остальная часть синтезируемого пентозофосфата была субстратом, хранившим в себе большие запасы энергии. Способность использовать в энергетических целях этот субстрат связана с возникновением двух ферментов: фосфопентозоэпимеразы, катализирующей превращение рибулозо-5-фосфата в ксилулозо-5-фосфат (рис. 68), и тиаминпирофосфат-зависимой пентозофосфокетазы, катализирующей фосфоролитическое расщепление ксилулозо-5-фосфата на 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА) и ацетилфосфат (рис. 69).

Использование в качестве источника энергии в анаэробных условиях пентозных субстратов, образуемых в окислительном пентозофосфатном пути, свойственно группе так называемых гетероферментативных молочнокислых бактерий, для которых характерно образование в качестве конечных продуктов брожения ряда органических соединений: молочной и уксусной кислот, этилового спирта, глицерина, СО₂ и др. Этим гетероферментативные молочнокислые бактерии отличаются от гомоферментативных, почти полностью сбрасывающих гексозы по гликолитическому пути в молочную кислоту.

Изучение механизмов образования конечных продуктов брожения гетероферментативными молочнокислыми бактериями обнаружило, что все они связаны с дальнейшими различными путями метаболизирования С₂- и С₃-фрагментов фосфокетазной реакции. 3-ФГА претерпевает ряд ферментативных превращений, идентичных таковым гликолитического пути, и через пируват превращается в молочную кислоту. Судьба двухуглеродного фрагмента различна: двухступенчатое восстановление ацетилфосфата приводит к накоплению в среде этанола; окислительный путь превращения ацетилфосфата завершается образованием уксусной кислоты (рис. 69).

Преобладание в ферментационной среде того или иного продук-

⁵ Некоторые авторы считают, что особенность окислительного пентозофосфатного пути — перенос электронов на окислительных этапах на НАДФ⁺, а не на НАД⁺ — в последующем оказалась очень «выгодной» для аэробов, так как позволила иметь два отдельных пула восстановленных пиридиновых переносчиков, с одного из которых (НАД·Н₂) электроны поступали в дыхательную цепь, а с другого (НАДФ·Н₂) использовались в биосинтетических восстановительных реакциях.

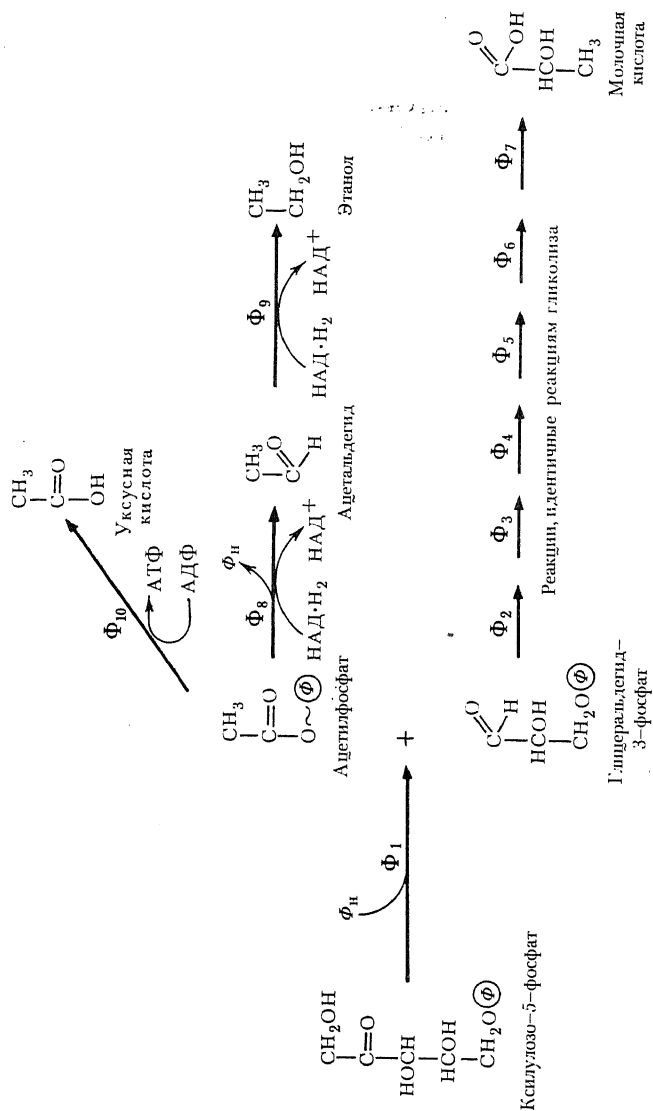


Рис. 69. Схема гетероферментативного молочнокислого брожения: Φ_1 — пентозофосфокетаза; Φ_2 — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; Φ_3 — фосфолицираткиназа; Φ_4 — фосфоглицеромутаза; Φ_5 — енолаза; Φ_6 — пируваткиназа; Φ_7 — лактатдегидрогеназа; Φ_8 — ацетальдегиддегидрогеназа; Φ_9 — алкогольдегидрогеназа; Φ_{10} — ацетаткиназа (по Schlegel, 1972)

та зависит от вида культуры, условий культивирования и фазы развития. Гетероферментативные молочнокислые бактерии *Leuconostoc mesenteroides* сбраживают глюкозу в молочную кислоту, этанол и CO_2 по следующему уравнению:



У других гетероферментативных молочнокислых бактерий больший удельный вес занимают процессы, ведущие к накоплению уксусной кислоты. Образование уксусной кислоты из ацетилфосфата сопряжено с синтезом АТФ. Если брожение идет с образованием этанола, то выход энергии равен 1 молекуле АТФ на молекулу сброженной глюкозы; если образуется уксусная кислота, то общий энергетический баланс

процесса составляет 2 молекулы АТФ на молекулу глюкозы, т. е. такой же, как при гликолизе.

Окислительный пентозофосфатный путь функционирует в качестве единственного пути сбраживания углеводов у так называемых облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий. Эти бактерии лишены ключевых ферментов гликолитического пути, например альдозазы и триозофосфатизомеразы. Большинство молочнокислых бактерий имеют два пути сбраживания углеводов: гликолитический и окислительный пентозофосфатный. Сбраживание гексоз, как правило, протекает по гликолитическому пути, а пентоз — по окислительному пентозофосфатному. Это имеет место, например, у *Lactobacillus plantarum*. Ферменты окислительного пентозофосфатного пути обнаружены у клостридий.

Таким образом, возникнув сначала как механизм синтеза клеткой C_5 -соединений, т. е. для выполнения узкой специфической задачи, этот путь получил дальнейшее развитие и стал выполнять дополнительную функцию снабжения прокариот энергией в анаэробных условиях. Субстратная база для окислительного пентозофосфатного пути позднее была расширена, так как он стал использоваться и для сбраживания пентоз биогенного происхождения, накапливавшихся в окружающей среде.

Но на этом эволюционное развитие окислительного пентозофосфатного пути расщепления углеводов не остановилось. Была сформирована последовательность реакций, «закрывающая» этот путь в цикл, в результате чего стала возможной полная деградация молекулы сахара. Разберем коротко эту последовательность реакций. Исходными субстратами служат пентозы, образующиеся из рибулозо-5-фосфата, ксилулозо-5-фосфата и рибозо-5-фосфата (см. рис. 68). При участии

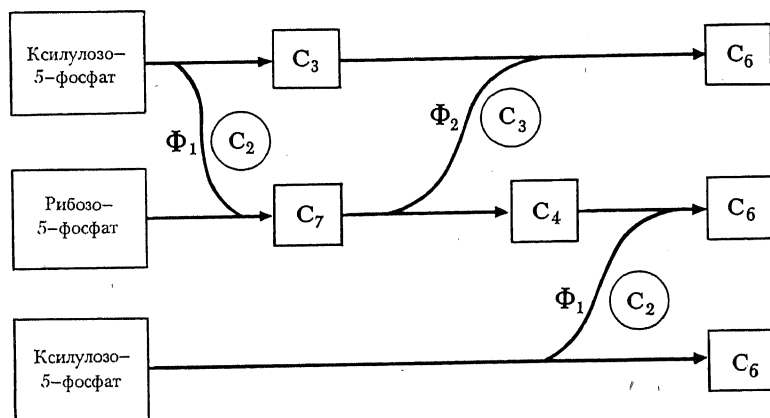


Рис. 70. Схема окислительного пентозофосфатного пути (конечные этапы):

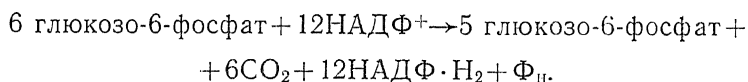
Φ_1 — транскетолаза; Φ_2 — трансальдозаза; C_2 — гликольальдегидная группа; C_3 — диоксиацетоновая группа; C_3 — 3-фосфоглицериновый альдегид (3-ФГА); C_4 — D-эритрозо-4-фосфат; C_6 — D-фруктозо-6-фосфат; C_7 — D-седогептулозо-7-фосфат (по Schlegel, 1972)

двух дополнительных ферментов — транскетолазы и трансальдозазы — осуществляется перенос C_2 - и C_3 -фрагментов между изомерными пен-

тозо-5-фосфатами и продуктами их взаимопревращений (рис. 70). Сначала транскетолаза переносит C₂-фрагмент — гликольальдегидную группу (СН₂ОН—СО—) от молекулы ксилулозо-5-фосфата на молекулу рибозо-5-фосфата, в результате чего образуется C₇-сахар — D-седогептулозо-7-фосфат и C₃-сахар — 3-ФГА. 3-ФГА, образующийся в транскетолазной реакции и, как известно, представляющий собой промежуточный продукт гликолитического пути, является первой точкой, в которой пересекаются эти два пути.

Далее трансальдолаза действует на продукты транскетолазной реакции, перенося C₃-фрагмент — диоксиацетоновую группу (СН₂ОН—СО—СНОН—) от молекулы D-седогептулозо-7-фосфата на C₃-молекулу — 3-ФГА. В результате образуется C₆-сахар — D-фруктозо-6-фосфат и C₄-сахар — D-эритрозо-4-фосфат. Один из продуктов реакции — фруктозо-6-фосфат является промежуточным соединением гликолитического пути, поэтому эта реакция есть вторая точка пересечения обоих путей углеводного метаболизма. Наконец, транскетолаза осуществляет перенос C₂-фрагмента от молекулы D-ксилулозо-5-фосфата на молекулу D-эритрозо-4-фосфата по той же схеме, что и в первой транскетолазной реакции, приводящей к образованию D-фруктозо-6-фосфата и 3-ФГА.

Итог этих взаимопревращений таков: из 3 молекул пентозофосфата синтезируются 2 молекулы фруктозо-6-фосфата и 1 молекула 3-ФГА. Фруктозо-6-фосфат ферментативно превращается в глюкозу, и 2 молекулы глюкозы снова возвращаются в цикл. 2 молекулы 3-ФГА также могут конденсироваться с образованием 1 молекулы глюкозы. В результате функционирования описанного выше полного окислительного пентозофосфатного пути из 6 поступающих в него молекул глюкозы 5 молекул ревосстанавливаются, а 1 полностью окисляется до СО₂, что приводит к восстановлению 6 молекул НАДФ⁺ до НАДФ·Н₂. Это можно представить в виде следующего уравнения:



Отсюда ясно, что окислительный пентозофосфатный путь может служить циклическим механизмом полной деградации углеводов, при этом водород (2H), отщепленный от глюкозы, поступает в электронтранспортную цепь и переносится на О₂.

Остановимся теперь на функциях последнего этапа пути. Как механизм, обеспечивающий полную деградацию углеводов, этот путь не получил универсального распространения, хотя существуют прокариоты, осуществляющие разложение углеводов в аэробных условиях только по окислительному пентозофосфатному пути. У многих организмов, использующих пентозы в качестве субстратов брожения, окислительный пентозофосфатный путь служит для превращения пентоз в гексозы, которые затем сбраживаются в гликолитическом пути. Кроме того, выше мы упоминали о двух точках пересечения этого пути с гликолизом на этапах образования 3-ФГА и фруктозо-6-фосфата. Все это говорит о тесном контакте окислительного пентозофосфатного пути с гликолизом и о возможном переключении с одного пути на другой. Наконец, помимо пентоз, образующихся на начальных этапах пути, возникновение C₄- и C₇-сахаров в транскетолазной и трансальдолазной реакциях также представляет определенный интерес для клетки, так как эти сахара являются исходными субстратами для синтеза ряда важных клеточных метаболитов.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии

К гетероферментативным молочнокислым бактериям, сбраживающим сахара с образованием молочной кислоты, CO₂, этанола и/или уксусной кислоты, относятся представители рода *Leuconostoc* и бактерии, объединенные в подрод *Betabacterium* рода *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. brevis*). У них отсутствует ключевой фермент гликолитического пути — фруктозодифосфатальдолаза, и поэтому сбраживание субстратов они могут осуществлять только по окислительному пентозофосфатному пути, т. е. являются облигатно гетероферментативными формами. Кроме того, представители подрода *Streptobacterium* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. xylosus*) этого же рода сбраживают гексозы по гликолитическому пути, а пентозы по окислительному пентозофосфатному пути, осуществляя в первом случае гомоферментативное, а во втором — гетероферментативное молочнокислое брожение.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии по морфологическим, культуральным признакам, особенностям конструктивного метаболизма близки к гомоферментативным формам. Некоторые из признаков гетероферментативных молочнокислых бактерий представлены в табл. 20.

Таблица 20

Характеристика таксономических групп гетероферментативных молочнокислых бактерий*

Род и подрод бактерий	Морфология и особенности клеточного деления	Молекулярное содержание ГЦ в ДНК, %	Конфигурация молочной кислоты	Наиболее распространенные виды
Род <i>Leuconostoc</i>	сферические или чечевицеобразные клетки; делятся в одной плоскости, в результате образуются цепочки	38—44	D	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. cremoris</i>
Род <i>Lactobacillus</i> Подрод <i>Betabacterium</i>	палочки; делятся в одной плоскости	37—53	DL	<i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i>

Характеристика представителей подрода *Streptobacterium* приведена в табл. 17.

Путь Энтнера — Дудорова

Третий путь расщепления углеводов прокариотами был обнаружен при изучении распределения ¹⁴C в молекуле спирта при сбраживании глюкозы, меченной по определенному углеродному атому. Этот путь получил название 2-кето-3-дезоксиглюконовой (КДФГ) пути расщепления углеводов, или пути Энтнера — Дудорова (N. Entner, M. Doudoroff) по имени исследователей, расшифровавших последовательность и природу ферментативных реакций этого пути. Общая схема пути Энтнера — Дудорова представлена на рис. 71.

Первые два его этапа — фосфорилирование молекулы глюкозы и ее дегидрирование до 6-фосфоглюконовой кислоты — идентичны первым двум этапам окислительного пентозофосфатного пути. Специфичны для пути Энтнера — Дудорова две следующие реакции: 1) дегидратирование 6-фосфоглюконовой кислоты, катализируемое 6-фосфоглюконат-дегидратазой и приводящее к образованию КДФГ-кислоты; 2) расщепление продукта первой реакции на два C₃-фрагмента с по-

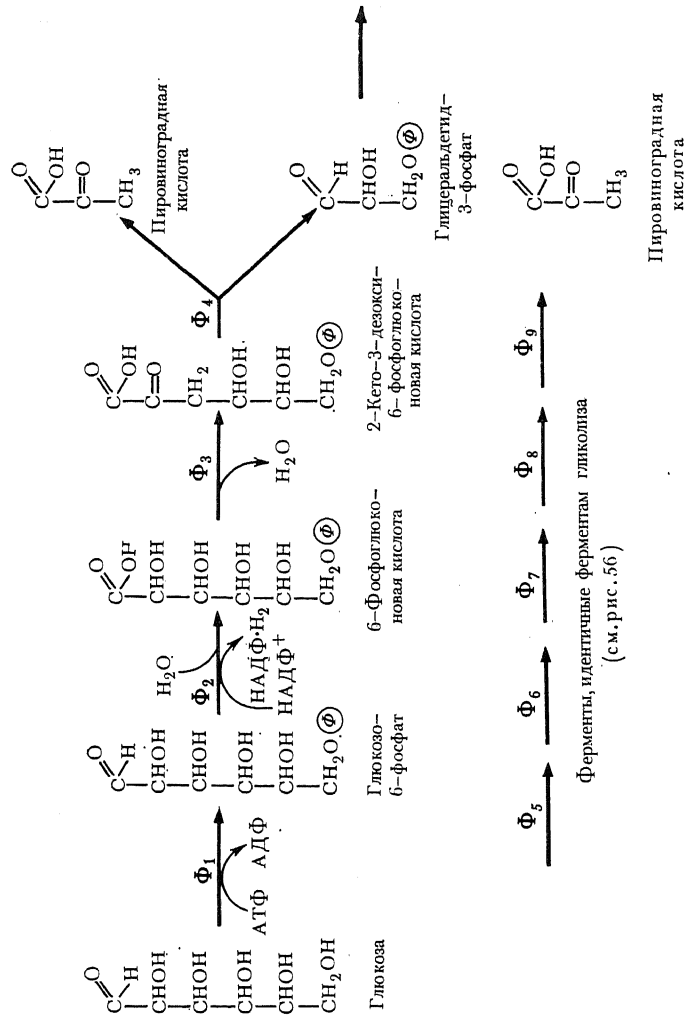


Рис. 71. Путь Энгнера—Дудорова:
 Φ_1 — гексокиназа; Φ_2 — глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа; Φ_3 — 6-фосфоглюкоконат-дегидратаза; Φ_4 — 2-кето-3-деокси-6-фосфоглюконат-альдолаза; Φ_5 — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; Φ_6 — фосфоглицераткиназа; Φ_7 — фосфоглицеромутаза; Φ_8 — енолаза; Φ_9 — пируваткиназа (по Dagley, Nicholson, 1973)

мощью фермента КДФГ-альдолазы. Конечными продуктами второй реакции являются пировиноградная кислота и 3-ФГА. Последний окисляется в пировиноградную кислоту так же, как в гликолитическом пути. Следовательно, при разложении молекулы глюкозы до пирувата по пути Энтнера — Дудорова образуется 1 молекула АТФ (2 молекулы АТФ синтезируются на отрезке пути 3-ФГА→пировиноградная кислота минус 1 молекула АТФ, затраченная на фосфорилирование глюкозы), 1 молекула НАД·Н₂ и 1 молекула НАДФ·Н₂.

Путь Энтнера — Дудорова имеет важное значение, когда сбраживаемыми субстратами служат глюконовая, маннановая, гексуроновые кислоты или их производные. Он функционирует у довольно широкого круга прокариот, главным образом грамотрицательных, получающих энергию в процессе дыхания (энтеробактерии, виды *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Spirillum*, *Xanthomonas*, *Thiobacillus* и др.). У анаэробов он встречается довольно редко. В качестве примера организма, сбраживающего сахара по пути Энтнера — Дудорова, можно привести облигатно анаэробную бактерию *Zymomonas mobilis*. Однако ее изучение позволяет предполагать, что *Z. mobilis* — вторичный анаэроб, произошедший от цитохромсодержащих аэробов. Путь Энтнера — Дудорова обнаружен у некоторых клостридиев, что еще раз подчеркивает неоднородность прокариот, объединенных в эту таксономическую группу.

Согласно существующим представлениям путь Энтнера — Дудорова сформировался позднее гликолитического и окислительного пентозофосфатного путей и возник как ответвление последнего, поскольку начала окислительного пентозофосфатного пути и пути Энтнера — Дудорова идентичны и для последнего необходимо было сформировать только два новых фермента (6-фосфоглюконат-дегидратазу и КДФГ-альдолазу). Появление пути Энтнера — Дудорова, вероятно, было вызвано высокой потребностью прокариот в пирувате, поэтому возникла необходимость сформировать механизм, при помощи которого пируват образовывался бы из исходного субстрата как можно более коротким и прямым путем. Действительно, к получению пирувата по пути Энтнера — Дудорова ведут всего 4 реакции, в то время как в гликолитическом пути для этого требуется 9 ферментативных преобразований.

Как можно видеть из схемы процесса (рис. 71), путь Энтнера — Дудорова имеет несколько точек пересечения с гликолитическим и окислительным пентозофосфатным путями: 6-фосфоглюконовая кислота представляет собой промежуточное соединение пути Энтнера — Дудорова и окислительного пентозофосфатного; пируват и 3-ФГА — промежуточные соединения пути Энтнера — Дудорова и гликолиза.

* * *

В настоящее время в природе есть много мест с полным или почти полным отсутствием молекулярного кислорода. Это глубокие слои воды, почвы, илы морей и континентальных водоемов. Особую экологическую нишу для развития анаэробов представляют рубец и кишечник животных и человека. Облигатно анаэробный способ существования широко распространен среди прокариот. Систематическое изучение анаэробных прокариот, предпринятое в последние десятилетия, обнаружило неоднородность входящих в эту группу организмов, способных получать энергию в процессах брожения, фотосинтеза и анаэробного дыхания.

Только небольшая часть облигатно анаэробных прокариот может быть отнесена к первичным анаэробам, т. е. возникшим в докислородную эпоху и сохранившим до настоящего времени основные черты метаболизма того периода в результате обитания в анаэробных экологических нишах: получение энергии в процессе брожения, отсутствие электронтранспортных цепей, слабо развитые биосинтетические способности.

Большинство существующих в настоящее время облигатных анаэробов среди прокариот имеют вторичное происхождение как следствие повторной адаптации к анаэробным условиям, сопровождающейся, как правило, изменениями деградационного характера: потерей способности взаимодействовать с O_2 , утратой некоторых компонентов переноса электронов, большей зависимостью от готовых органических соединений среды обитания и т. д. Примером могут служить строго анаэробные бактерии, составляющие основную микрофлору рубца и пищеварительного тракта животных и человека. Это в большинстве грамотрицательные кокки (роды *Veilonella*, *Acidominococcus*, *Megasphaera*) или палочки (роды *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Anaerovibrio*, *Selenomonas*, *Succinomonas*, *Succinovibrio*, *Butyrivirbio* и др.), способные сбраживать сахара и/или аминокислоты. У многих из них обнаружены цитохромы *b* и *a* и показана способность синтезировать АТФ по механизму мембранного фосфорилирования.

В представленном в этой главе материале проанализированы энергетические процессы, сформированные на первом этапе эволюции жизни на Земле. То, что брожение — наиболее примитивный способ получения энергии живыми организмами, в настоящее время никем не ставится под сомнение. Гораздо сложнее оценить, какой путь в процессе эволюции пройден теми или иными организмами. Очевидно, что при имеющихся возможностях обмена генетической информацией между близкородственными линиями прокариот сохранение их в первоначальном виде маловероятно. Описание представленных в этой главе нескольких групп анаэробных прокариот, в первую очередь пропионовокислых бактерий и клостридиев, служит иллюстрацией этого.

ГЛАВА 10

ТИПЫ ЖИЗНИ, ОСНОВАННЫЕ НА ФОТОФОСФОРИЛИРОВАНИИ

В предыдущей главе был рассмотрен ряд групп прокариот, получающих энергию в реакциях субстратного фосфорилирования и не зависящих от молекулярного кислорода. Их предки появились на Земле, когда в ее атмосфере отсутствовал молекулярный кислород. Единственным источником свободной энергии, доступным первобытным прокариотным организмам, была химическая энергия органических молекул, возникших в основном абиогенным путем. Увеличение численности популяций приводило к возрастанию использования органических молекул в окружающей среде, которое на определенном этапе стало превышать их накопление. В результате органические вещества постепенно исчерпывались из среды. Создавалась критическая ситуация, вызываемая нехваткой соединений, которые могли бы служить источником свободной энергии для организмов. Перед ними возникла проблема поиска новых источников углеродного питания и свободной энергии. В энергетическом плане необходимо было найти способ получения энергии за счет постоянно действующего источника. Такой источник энергии представляет собой солнечная радиация. Глобальное значение разившейся способности использовать световую энергию в том, что фотосинтез — единственный процесс, приводящий к увеличению свободной энергии на нашей планете. Таким образом, фотосинтез обязан своим «происхождением» экологическому кризису, возникшему в результате исчерпания на определенном этапе развития жизни органических ресурсов планеты.

Жизнь за счет анаэробных превращений органических субстратов привела к возникновению анаэробной формы жизни за счет света. Для этого прежде всего должны были возникнуть окрашенные молекулы, поглощающие кванты света. Когда сформировались структуры для улавливания света, появилась возможность жизни за счет использования световой энергии. В конечном итоге это создало предпосылки для возникновения жизни в том виде, в каком она существует сейчас. То, как эти возможности реализовывались, доказывает наличие нескольких типов фотосинтеза, осуществляемого разными группами прокариот, энергетический метаболизм которых полностью или частично основан на использовании энергии света. Фотосинтезирующие прокариотные организмы представлены пурпурными и зелеными бактериями, большой группой цианобактерий¹, недавно обнаруженными организмами, названными прохлорофитами, и галобактериями.

¹ В ботанической литературе — сине-зеленые водоросли.

Пигменты фотосинтезирующих прокариот

Для синтеза в первичном бульоне органических веществ в основном требовался ультрафиолет. Все известные в настоящее время фотосинтезирующие организмы используют в процессе фотосинтеза видимый и инфракрасный свет. Наиболее богатые энергией ультрафиолетовые лучи в фотосинтезе практически не используются (см. рис. 30). Это связано с фотохимическими эффектами разных частей спектра, рассмотренными ранее.

Фотосинтезирующие организмы обязательно содержат магний-порфириновые пигменты — хлорофиллы, построенные из четырех пиррольных колец, соединенных углеродными мостиками и образующих закрытую (циклическую) структуру². Известно больше десяти видов хлорофиллов, различающихся природой химических групп, присоединенных к пиррольным структурам порфиринового ядра, но все они поглощают свет видимой и инфракрасной частей спектра.

Большинством исследователей принимается, что первыми фоторецепторами, предшественниками современных хлорофиллов, следует считать порфирины, структура которых обеспечивает поглощение умеренно энергизованных квантов света. Экспериментально показана возможность синтеза порфиринов абиогенным путем из простых веществ — пиррола и альдегидов — в условиях, имитирующих условия первобытной Земли.

Важным моментом в эволюции порфиринов явилось включение ионов металла в центр порфиринового ядра. Все порфирины, обладающие фоторецепторным действием, являются магниевыми комплексами. Порфирины, участвующие в темновом транспорте электронов (цитохромы), а также ферменты каталаза и пероксидаза содержат в центре порфиринового кольца атом железа.

Итак, способность организмов существовать за счет энергии света в первую очередь связана с наличием у них специфических фоторецепторных молекул — пигментов. Набор пигментов характерен и постоянен для определенных групп фотосинтезирующих прокариот. Соотношения же между отдельными пигментами колеблются в зависимости от вида и условий культивирования. В целом фотосинтетические пигменты прокариот обеспечивают поглощение света с длиной волны в области 300—1100 нм.

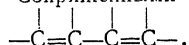
Все фотосинтетические пигменты относятся к двум химическим классам соединений: 1) пигменты, в основе которых лежит тетрапиррольная структура (хлорофиллы, фикобилипротеиды); 2) пигменты, основу которых составляют длинные полиизопреноидные цепи (каротиноиды). Особенность химического строения молекул всех фотосинтетических пигментов состоит в наличии системы сопряженных двойных связей³, от количества которых зависит способность пигментов улавливать бедные энергией кванты света, а также защита каротиноидами хлорофилла от синглетного кислорода.

Хлорофиллы

У фотосинтезирующих прокариот известно больше десяти видов хлорофиллов (рис. 72; табл. 21). Хлорофиллы двух групп прокариот, осуществляющих бескислородный фотосинтез (пурпурные и зеленые

² Исключение составляют галобактерии, осуществляющие бесхлорофилльный фотосинтез (с. 286).

³ Сопряженными называются двойные связи, чередующиеся с простыми, т. е.



бактерии), встречающиеся только в этих группах, получили общее название бактериохлорофиллов. В настоящее время идентифицировано пять основных видов бактериохлорофиллов: *a*, *b*, *c*, *d* и *e*⁴. Все пурпурные бактерии содержат какую-либо одну форму бактериохлорофилла: *a* или *b*. Небольшие различия в химическом строении приводят к существенным изменениям в спектральных свойствах этих пигментов. Пурпурные бактерии, содержащие бактериохлорофилл *a*, могут поглощать свет с длиной волны до 950 нм. У видов, имеющих бактериохлорофилл *b*, максимум поглощения в красной части спектра сдвинут в длинноволновую область больше чем на 100 нм и приходится на 1020—1040 нм, а граница поглощения продвинута до 1100 нм. Дальше бактериохлорофилла *b* не поглощает ни один известный фотосинтетический пигмент. Основными хлорофильными пигментами зеленых бактерий являются бактериохлорофиллы *c*, *d* или *e*, незначительно различающиеся между собой по спектрам поглощения (табл. 21). Кроме них в клетках всех зеленых бактерий в небольшом количестве содержится бактериохлорофилл *a*. Наличие этих бактериохлорофиллов позволяет зеленым бактериям использовать свет с длиной волны до 840 нм.

Прокариоты, фотосинтез которых сопровождается выделением молекулярного кислорода (цианобактерии и прохлорофиты), содержат хлорофиллы, характерные для фотосинтезирующих эукариотных организмов. У цианобактерий — это хлорофилл *a*, единственный вид хлорофилла, обнаруженный в этой группе; в клетках прохлорофит — хлорофиллы *a* и *b*. Присутствие этих пигментов обеспечивает поглощение света до 750 нм.

Для всех хлорофиллов характерно наличие нескольких максимумов поглощения. В клетке спектральные свойства хлорофиллов определяются взаимодействиями молекул пигмента друг с другом, а также с липидами и белками фотосинтетических мембран.

Фикобилипротеиды

Фикобилипротеиды — красные и синие пигменты, содержащиеся только у одной группы прокариот — цианобактерий⁵. Хромофорная группа пигмента, называемая фикобилином, ковалентно связана с водорастворимым белком типа глобулина и представляет собой структуру, состоящую из четырех пиррольных колец, но не замкнутых, как в молекуле хлорофилла, а имеющих вид развернутой цепи, не содержащей металла (рис. 73). Молекулы фикобилипротеидов состоят из двух нековалентно связанных неидентичных субъединиц — α и β , к

⁴ Бактериохлорофиллы *a*, *b* и *c*, по последним данным, существуют в нескольких модификациях, так как радикал R_6 может быть фитолом, фарнезолом, геранилгераниолом или другим многоатомным спиртом (табл. 21).

⁵ Фикобилипротеиды содержатся также у двух групп эукариот: красных и криптофитовых водорослей.

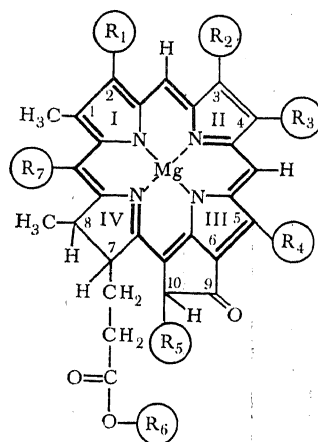


Рис. 72. Обобщенная формула хлорофиллов. Римскими цифрами указаны пиррольные кольца. Химическая природа радикалов R_1 — R_7 приведена в табл. 21

Таблица 21
Различия в химическом строении хлорофиллов фотосинтезирующих прокариот и основные максимумы их поглощения в клетке

Пигмент	Химическая природа радикалов, указанных на рис. 72							Основной максимум поглощения в клетке, нм	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇		
Хлорофилл	a	—CH=CH ₂	—CH ₃	—C ₂ H ₅	—CH ₃	—C(=O)—O—CH ₃	фитол	—H	680—685
	b	»	—C(=O)—H	»	»	»	»	»	650—660
Бактериохлорофилл	a	—C(=O)—CH ₃	—CH ₃ *	»	»	»	фитол или геранил-гераниол	»	850—890
	b	»	—CH ₃ **	=CH—CH ₃	»	»	»	»	1020—1040
	c	OH —CH—CH ₃	»	—C ₂ H ₅	—C ₂ H ₅	—H	фитол, фарнезол и др.	—CH ₃	750—760
d	»	»	»	»	»	фарнезол	—H	720—740	
e	»	—CH=O	»	»	»	фарнезол	—CH ₃	715—725	

* II пиррольное кольцо восстановлено; между третьим и четвертым углеродными атомами связь насыщена, к ним присоединены дополнительные атомы водорода.

** II пиррольное кольцо восстановлено; между третьим и четвертым углеродными атомами связь насыщена, к третьему атому углерода дополнительно присоединен атом водорода.

Фитол — C₂₀H₃₉OH; фарнезол — C₁₅H₂₅OH; геранил-гераниол — C₂₀H₃₃OH.

Строение и спектральные свойства основных фикобилипротеидов цианобактерий

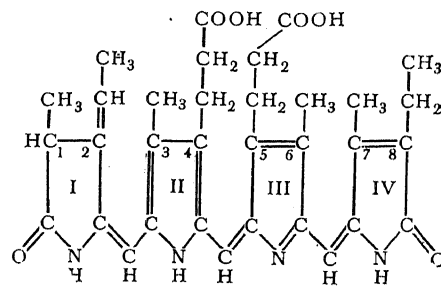
Фикобилипротеид	Субъединичный состав мономера	Число и тип молекул хромофоров, связанных с субъединицами*		Состояние пигмента в клетке	Основной максимум поглощения, нм
		α	β		
Фикоэритрин	$\alpha\beta$	2ФЭБ	4ФЦБ	$(\alpha\beta)_6$	565
Фикоцианин	$\alpha\beta$	1ФЦБ	2ФЦБ	$(\alpha\beta)_6$	620
Аллофикоцианин Аллофикоцианин В	$\alpha\beta$	1ФЦБ 1ФЦБ	1ФЦБ 1ФЦБ	$(\alpha\beta)_3$ $(\alpha\beta)_3$	654 671

* ФЭБ — фикоэритробилин; ФЦБ — фикоцианобилин.

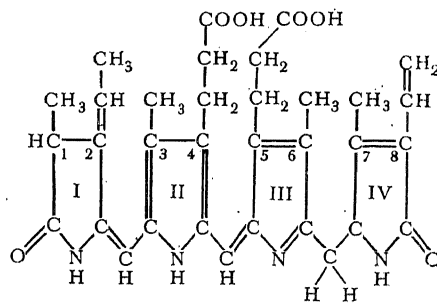
каждой из которых ковалентно присоединены хромофорные группы: фикоэритробилин или фикоцианобилин. Некоторые данные относительно строения и спектральных свойств фикобилипротеидов цианобактерий приведены в табл. 22.

Различия в спектральных свойствах фикобилипротеидов определяются аминокислотной последовательностью α - и β -полипептидов, числом и типом присоединенных к ним хромофорных групп, а также степенью агрегирования. Так, переход аллофикоцианина из мономерного состояния в тримерное сопровождается изменением максимума поглощения от 616 до 654 нм. Степень агрегирования зависит от вида и возраста культуры, а также от внешних факторов: pH, ионной силы раствора, температуры. В основе агрегирования молекул фикобилипротеидов лежат гидрофобные взаимодействия между мономерами. Значение способности фикобилипротеидов к агрегированию становится понятным при формировании ими фикобилисом — структур, в которых эти пигменты организованы в агрегаты высокого порядка.

Фикобилипротеиды обеспечивают в клетках цианобактерий поглощение света в области 450—700 нм и с высокой эффективностью (больше 90%) передают поглощенный свет на хлорофилл, при этом основное количество энергии передается на хлорофилл, связанный со II фотосистемой. Все цианобактерии содержат небольшие количества



Фикоцианобилин



Фикоэритробилин

Рис. 73. Химическая структура хромофорных групп фикоэритрина (фикоэритробилин), фикоцианина и аллофикоцианинов (фикоцианобилин). Римскими цифрами указаны пиррольные кольца (по Charman, 1973)

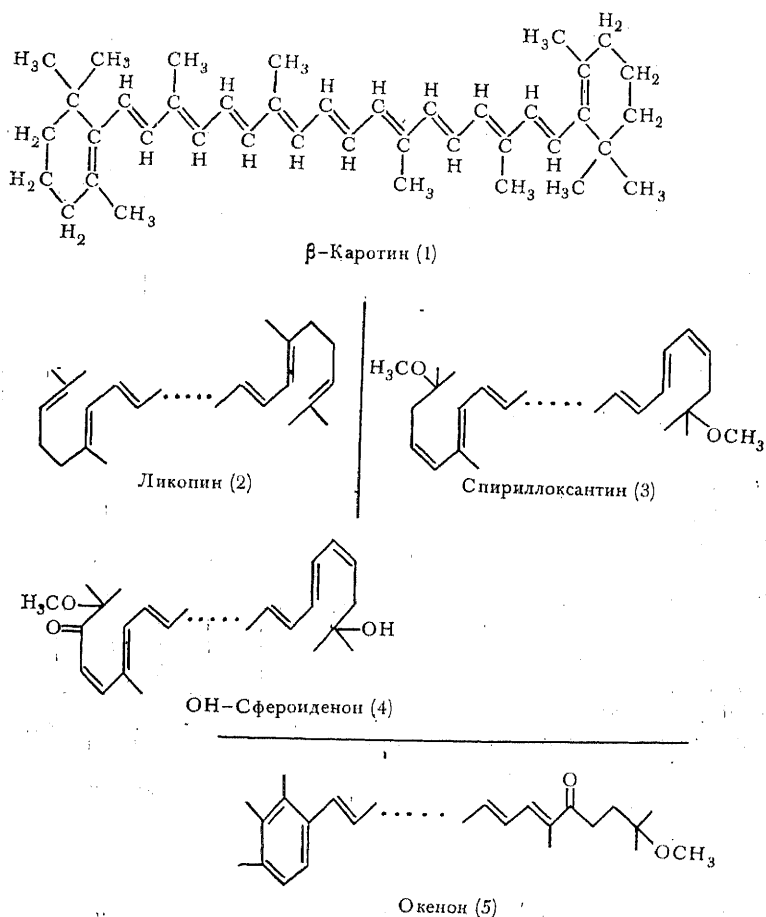
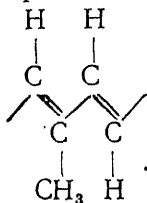
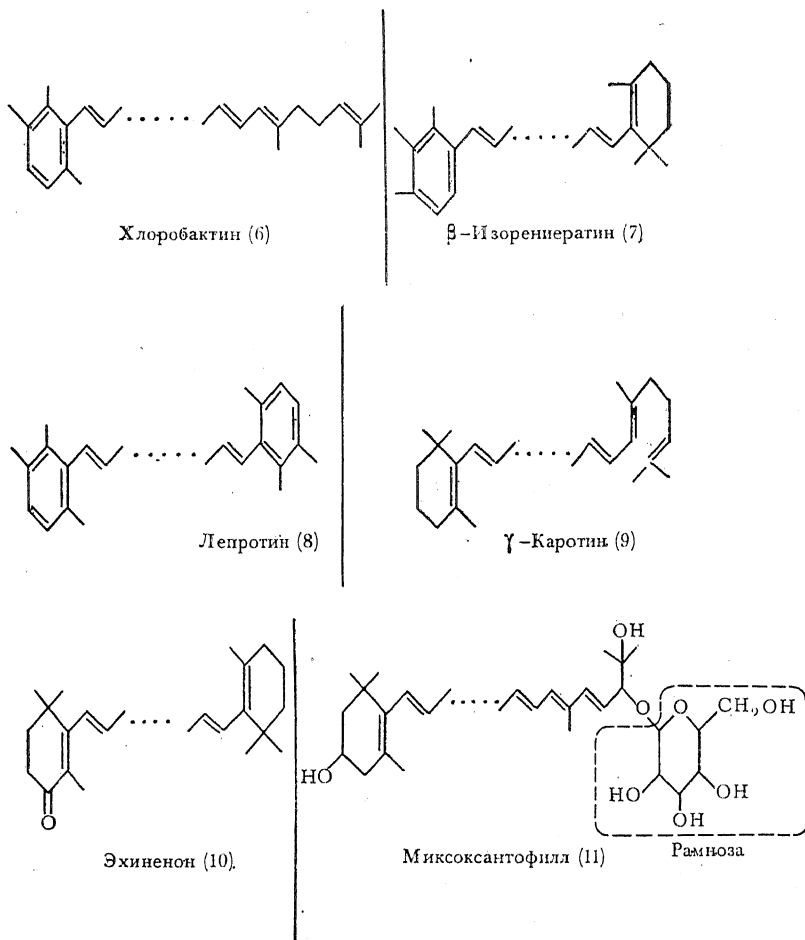


Рис. 74. Структурные формулы некоторых каротиноидов фотосинтеза аллофикоцианина и его длинноволновой формы — аллофикоцианина В, а также значительные количества фикоцианина, одного из основных клеточных пигментов, содержание которого в условиях низкой освещенности может достигать 60% от общего уровня растворимых белков клетки. Некоторые цианобактерии содержат также второй основной фикобилипротеид — фикоэритрин. Способность синтезировать фикоэритрин может быть конститутивным свойством организма или индуцироваться в определенных условиях освещения.

Каротиноиды

К вспомогательным фотосинтетическим пигментам, которые содержат все фотосинтезирующие организмы, относятся каротиноиды, большая группа химических соединений, представляющих собой продукт конденсации остатков изопрена:





рующих прокариот (по Кондратьевой, 1972; Nichols, 1973)

Большинство каротиноидов построено на основе конденсации 8 изопреноидных остатков. У некоторых каротиноидов полиизопреноидная цепь открыта и не содержит циклических группировок. Такие каротиноиды называются алифатическими. У большинства на одном или обоих концах цепи расположено по ароматическому или β-иононовому кольцу. Каротиноиды первого типа относятся к арильным, второго — к алициклическим. Выделяют также каротиноиды, не содержащие в молекуле кислорода, и кислородсодержащие каротиноиды, общее название которых ксантофиллы.

Состав каротиноидов фотосинтезирующих прокариот весьма разнообразен. Наряду с пигментами, одинаковыми у разных групп, для каждой из них обнаружены определенные каротиноиды или наборы последних.

Наиболее разнообразен состав каротиноидных пигментов у пурпурных бактерий, из которых к настоящему времени выделено свыше 20 каротиноидов. В клетках большинства пурпурных бактерий содержатся только алифатические каротиноиды, многие из которых принадлежат к группе ксантофиллов. Типичными каротиноидами пурпурных бактерий являются ликопин, спириллоксантин, сфероиденон. У некоторых пурпурных серобактерий обнаружен арильный моноциклический

каротиноид окенон, а у двух видов несерных пурпурных бактерий (*Rhodomicrobium vannielii* и *Rhodopseudomonas acidophila*) найдено небольшое количество β -каротина, алициклического каротиноида, распространенного у цианобактерий и фотосинтезирующих эукариотных организмов. Структурные формулы некоторых характерных для пурпурных бактерий каротиноидов представлены на рис. 74, 2—5. Набор и количества отдельных каротиноидов определяют окраску пурпурных бактерий, густые суспензии которых имеют пурпурно-фиолетовый, красный, розовый, коричневый, желтый цвет.

Зеленые бактерии по составу каротиноидов отличаются от пурпурных. Основные каротиноиды зеленых серобактерий, выделяемых в семейство Chloobiaceae, — арильные, содержащие 1 или 2 ароматических кольца (хлоробактин, β -изорениератин, лепротин), а также алициклический каротиноид γ -каротин (рис. 74, 6—9). Иной состав каротиноидов у зеленых бактерий, относимых к семейству Chlooflexaceae. Эта группа прокариот, цианобактерии и прохлорофиты содержат алициклические каротиноиды с одним или двумя β -иононовыми кольцами. Основной пигмент — β -каротин, составляющий иногда больше 70% общего количества каротиноидов клетки. Специфическим ксантофиллом этих групп является эхиненон, а также гликозидные производные некоторых кислородсодержащих каротиноидов типа миксоксантофилла (рис. 74, 1, 10, 11).

Каротиноидные пигменты поглощают свет в синем и зеленом участках спектра, т. е. в области длин волн 400—550 нм. Эти пигменты, как и хлорофиллы, локализованы в мембранах и связаны с мембранными белками без участия ковалентных связей. По современным представлениям, функции каротиноидов фотосинтезирующих прокариот многообразны. В качестве вспомогательных фотосинтетических пигментов каротиноиды поглощают кванты света в коротковолновой области спектра, которые затем передаются на хлорофилл. У цианобактерий энергия света, поглощенная каротиноидами, поступает в основном в I фотосистему. Эффективность передачи энергии для разных каротиноидов колеблется от 30 до 90%. Для некоторых галофильных бактерий показана способность каротиноида ретиналя в комплексе с белком осуществлять особый бесхлорофилльный тип фотосинтеза. Известно участие каротиноидов в осуществлении реакций фототаксиса, а также в защите клетки от токсических эффектов синглетного кислорода.

Спектры поглощения клеток разных групп фотосинтезирующих прокариот

Пигментные наборы фотосинтезирующих прокариот позволяют им использовать весь диапазон длин волн падающей на Землю солнечной энергии (рис. 75; см. рис. 30). Обращает внимание большое различие в спектрах поглощения у представителей разных групп фотосинтезирующих организмов и прежде всего существенные сдвиги в максимумах поглощения хлорофиллов в красной области спектра. Несомненно экологическое значение этого явления, позволяющего избежать конкуренции за свет между разными группами фотосинтезирующих организмов. Что же касается эволюции спектров поглощения хлорофиллов, то очевидна тенденция к перемещению в более коротковолновую часть спектра с более высоким энергетическим уровнем.

Структурная организация фотосинтетического аппарата прокариот

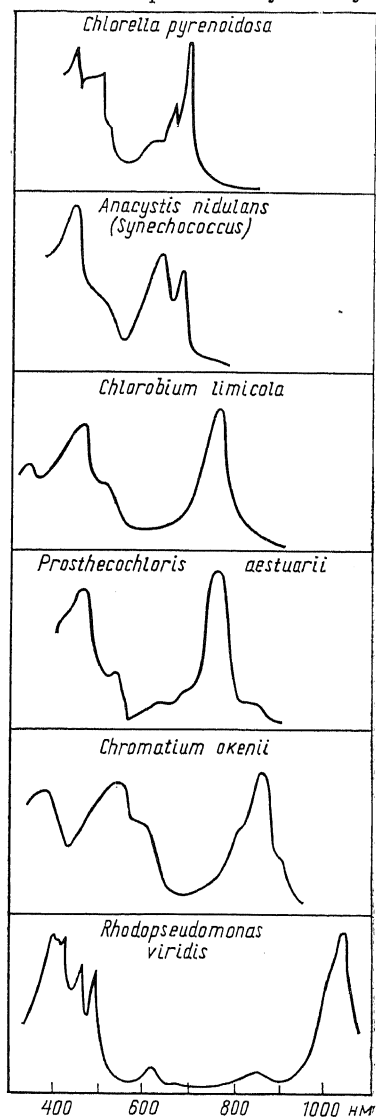
У каждой из основных групп прокариот фотосинтетический аппарат организован по-разному. Это проявляется как в химической природе составляющих его компонентов (набор пигментов, состав переносчиков электронов), так и в структурной организации в клетке.

Фотосинтетический аппарат состоит из трех основных компонентов: 1) светособирающих пигментов, поглощающих энергию света и передающих ее в реакционные центры; 2) фотохимических реакционных центров, где происходит трансформация электромагнитной формы энергии в химическую; 3) фотосинтетических электронтранспортных систем, обеспечивающих перенос электронов, сопряженный с запасанием энергии в молекулах АТФ. В фотохимической реакции участвуют хлорофиллы или бактериохлорофиллы *a* в модифицированной форме. Эти же виды хлорофиллов, наряду с другими (бактериохлорофиллы *c*, *d*, *e*, хлорофилл *b*), а также пигментами иных типов (фикобилипотеиды, каротиноиды) выполняют функцию антенны. У некоторых пурпурных бактерий, содержащих только бактериохлорофилл *b*, он выполняет обе функции (табл. 23).

Два компонента фотосинтетического аппарата — реакционные центры и электронтранспортные системы — всегда локализованы в клеточных мембранах, представленных ЦПМ и у большинства фотосинтезирующих прокариот развитой системой внутрицитоплазматических мембран — производных ЦПМ (см. рис. 4). Локализация светособирающих пигментов в разных группах фотосинтезирующих прокариот различна (табл. 24). У пурпурных бактерий и прохлорофит светособирающие пигменты в виде комплексов с белками интегрированы в мембранах (рис. 76, А). В клетках зеленых бактерий и цианобактерий основная масса светособирающих пигментов находится в особых структурах, прикрепленных к поверхности мембраны, но не являющихся ее компонентом. Это хлоросомы зеленых бактерий и фикобилисомы цианобактерий (см. рис. 4).

В хлоросомах зеленых бактерий содержится весь бактериохлорофилл

Рис. 75. Спектры поглощения клеток эукариотной зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* и представителей разных групп фотосинтезирующих прокариот: цианобактерии *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*), зеленых (*Chlorobium limicola*, *Prosthecochloris aestuarii*) и пурпурных (*Chromatium okenii*, *Rhodospseudomonas viridis*) бактерий



Функции различных пигментов в фотосинтезе

	Пигменты	Пурпурные бактерии	Зеленые бактерии	Цианобактерии	Прохлорофиты
Свет собирающие пигменты	хлорофиллы	бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i>	бактериохлорофиллы <i>a + c</i> , <i>a + d</i> , <i>a + e</i>	хлорофилл <i>a</i>	хлорофиллы <i>a + b</i>
	фикобилипротеиды	нет	нет	фикоцианин, аллофикоцианин, фикоэритрин	нет
	основные каротиноиды	алифатические и арильные	арильные и алициклические	алициклические	алициклические
	Хлорофиллы, входящие в состав реакционного центра	бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i>	бактериохлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>a</i>

c, *d* или *e* (в зависимости от вида), а также небольшое количество бактериохлорофилла *a*, служащего промежуточным звеном при переносе энергии света от основного светособирающего бактериохлорофилла к бактериохлорофиллу *a*, локализованному в ЦПМ. С этой фор-

Таблица 24

Локализация фотосинтетического аппарата в клетках разных групп прокариот

Компоненты фотосинтетического аппарата	Пурпурные бактерии	Зеленые бактерии	Цианобактерии	Прохлорофиты
Светособирающие пигменты	ЦПМ и ее производные	хлоросомы и ЦПМ	фикобилисомы, ЦПМ и тилакоидные мембраны	ЦПМ и тилакоидные мембраны
Фотохимические реакционные центры и электронтранспортные системы	там же	ЦПМ	ЦПМ и тилакоидные мембраны	там же

мы пигмента энергия света передается на модифицированную форму бактериохлорофилла *a* реакционного центра. Локализованные в хлоросомах светособирающие бактериохлорофиллы организованы в виде палочковидных структур диаметром 5—10 нм, расположенных параллельно длинной оси хлоросомы (рис. 76, Б). Высокоупорядоченная их организация и упаковка осуществляется с помощью белковых молекул. В основании хлоросомы, примыкающем к ЦПМ, расположен слой молекул бактериохлорофилла *a*.

В группе цианобактерий обнаружены два типа структурной организации фотосинтетического аппарата. У единственного представителя этой группы — одноклеточной цианобактерии *Gloeobacter violaceus* — нет тилакоидных мембран и типичных для всех остальных видов фикобилисом. Единственной мембраной является ЦПМ, не образующая никаких впячиваний в цитоплазму. В ЦПМ локализованы реакционные центры и электронтранспортные системы фотосинтеза. Фико-

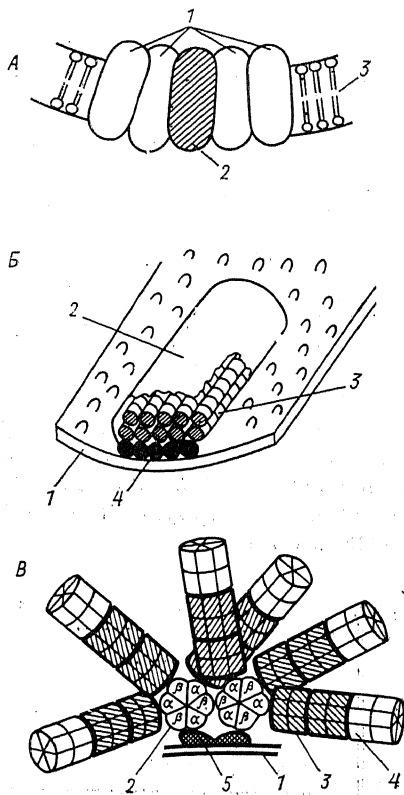
билипротеиды (фикоцианин, аллофикоцианин и фикоэритрин) в виде слоя толщиной 50—70 нм прилегают к внутренней поверхности ЦПМ. Слой образован палочковидными структурами диаметром 12—14 нм, ориентированными перпендикулярно ЦПМ. Палочки состоят из 8—10 сегментов длиной около 6 нм каждый и объединены в агрегаты, состоящие из 6 таких параллельно расположенных структур. Вероятно, эти агрегаты и есть фикобилисомы *Gloeobacter*.

Рис. 76. Структурная организация и локализация светособирающих пигментов в разных группах фотосинтезирующих прокариот.

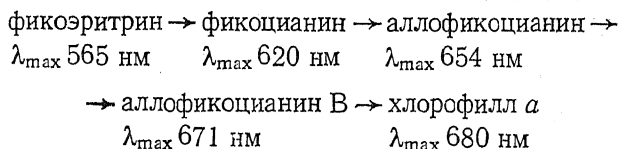
А. Локализованные в мембране светособирающие комплексы пурпурных бактерий: 1 — светособирающие пигмент-белковые комплексы; 2 — комплекс реакционного центра; 3 — мембрана.

Б. Модель хлросомы зеленых бактерий: 1 — ЦПМ; 2 — хлросома; 3 — палочковидные структуры, образованные молекулами бактериохлорофилла *c*, *d* или *e*; 4 — слой молекул бактериохлорофилла *a*.

В. Модель типичной фикобилисомы цианобактерий: 1 — мембрана тилакоида; 2 — аллофикоцианиновое ядро; 3 — фикоцианин; 4 — фикоэритрин; 5 — белок, обеспечивающий прикрепление фикобилисомы к тилакоидной мембране.



Клетки всех остальных цианобактерий содержат развитую систему внутрицитоплазматических мембран — тилакоидов, к наружным поверхностям которых прикреплены регулярно расположенные дискретные гранулы — фикобилисомы. Их форма, размеры и количество на единицу поверхности мембраны могут меняться в значительных пределах. На электронных микрофотографиях фикобилисомы обычно выглядят как полусферические структуры 28—55 нм в диаметре, реже имеют вид цилиндров, но всегда в клетках каждого вида содержатся фикобилисомы одного типа. Организация фикобилипротеина в фикобилисомах показана на рис. 76, В. Молекулы аллофикоцианина и аллофикоцианина В составляют внутреннее ядро фикобилисомы. К нему примыкают расходящиеся в разные стороны палочковидные образования, построенные из агрегированных молекул фикоцианина и фикоэритрина, при этом фикоэритрин располагается на периферической части этих структур. У видов, у которых фикоэритрин отсутствует, палочковидные образования состоят только из фикоцианина. Такая организация фикобилисомы в наилучшей степени обеспечивает перенос энергии возбуждения в направлении:



Помимо пигментов в составе фикобилисом найдены неокрашенные полипептиды, необходимые для высокоупорядоченной пространст-

венной организации фикобилипротеидов в фикобилисоме, а также для прикрепления ее к мембране.

Фотофизические процессы, лежащие в основе фотосинтеза

Известно, что энергия молекулы в основном определяется электронной энергией, а последняя в свою очередь зависит от расположения электронов на энергетических орбитах. Электрон, находящийся на более удаленной от ядра орбите, обладает большим запасом энергии, т. е. его энергетический уровень выше, чем у электрона, располагающегося на орбите ближе к ядру. Электроны могут переходить с одной электронной орбиты на другую, и это сопровождается потерей или поглощением извне энергии молекулой, т. е. изменением ее энергетического состояния. Подобные переходы имеют место и при поглощении или испускании молекулой кванта света. Способность вещества поглощать свет определенной длины волны зависит от его молекулярного строения и в первую очередь от расположения электронов на энергетических орбитах.

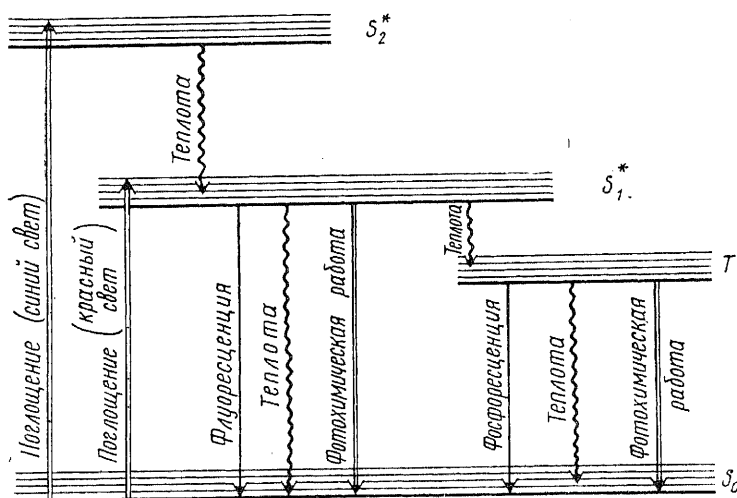


Рис. 77. Схема электронных переходов между энергетическими уровнями молекулы хлорофилла при поглощении и испускании света: S_0 — основной энергетический уровень S_1^* и S_2^* — первый и второй синглетные уровни; T — триплетный уровень (по Рубину, 1976)

Каким требованиям должен удовлетворять свет как фактор для «возбуждения» электронов? Кванты света должны обеспечивать переходы электронов с низкоэнергетических на высокоэнергетические уровни. Это возможно в том случае, когда разница между энергетическими уровнями при переходе электрона с орбиты на орбиту равна энергии кванта света. Должны были образоваться такие вещества, в молекулах которых эти электронные переходы соответствуют энергии поглощенного кванта света. Подобным требованиям отвечают молекулы хлорофиллов и других пигментов у которых переход электронов в возбужденное высокоэнергетическое состояние происходит под действием квантов света с длиной волны в диапазоне 300—1100 нм.

Рассмотрим процессы, происходящие при поглощении кванта света молекулой хлорофилла (рис. 77). В темноте молекула хлорофилла находится в стабильном невозбужденном состоянии, а ее электроны — на основном энергетическом уровне. Когда квант света попадает на молекулу хлорофилла, порция энергии этого кванта поглощается

одним из электронов, который переходит на новый, более богатый энергией уровень, а молекула хлорофилла переходит при этом в возбужденное состояние. В зависимости от того, какова энергия поглощенного кванта, электрон может перейти на разные энергетические уровни: квант синего света поднимает электрон на второй синглетный уровень, квант красного света — на первый. Время жизни молекулы хлорофилла в возбужденных синглетных состояниях очень коротко (на втором синглетном уровне — 10^{-12} — 10^{-13} с, на первом — 10^{-9} — 10^{-7} с), после чего молекула возвращается в исходное стабильное состояние. Возвращение молекулы в исходное состояние возможно разными путями, и энергия, поглощенная электроном, теряется им в виде тепла, флюоресценции или фосфоресценции.

Перечисленные выше пути перехода молекулы хлорофилла из возбужденного состояния в основное не исчерпывают всех возможностей. В клетке молекулы хлорофилла в норме достаточно жестко сопряжены друг с другом, образуя единую систему. Поэтому перешедшая в возбужденное состояние молекула пигмента может передавать энергию поглощенного кванта света соседней молекуле, переводя ее в возбужденное состояние. Основная масса хлорофилла и других фотосинтетических пигментов клетки представляет собой антенну, улавливающую световую энергию. Светособирающие пигменты организованы в виде комплексов, в которых они связаны с молекулами белка. Энергия возбуждения мигрирует в направлении от пигментов, поглощающих свет более коротких длин волн, к более длинноволновым формам и от последних поступает в реакционные центры. Для передачи энергии электронного возбуждения необходимо, чтобы среднее расстояние между молекулами пигментов составляло около 10—15 Å.

Поглощение и миграция энергии света у зеленой бактерии *Chloroflexus aurantiacus* схематически изображены на рис. 78. Порция энер-

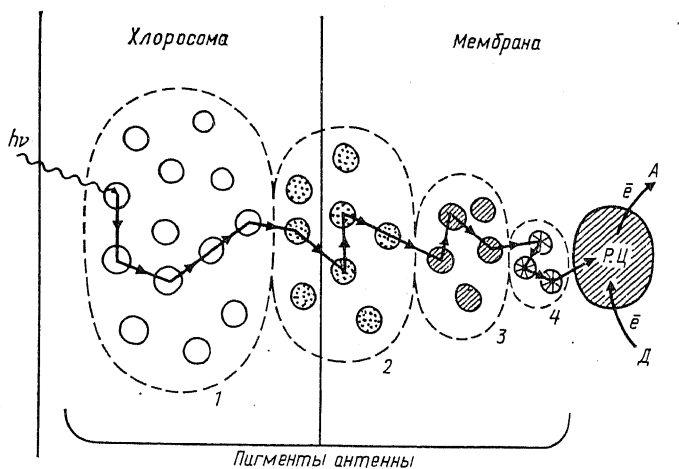
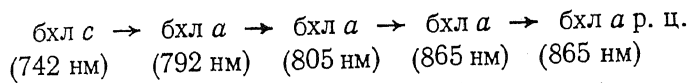


Рис. 78. Миграция энергии света у зеленой бактерии *Chloroflexus aurantiacus*:

1 — бактериохлорофилл с; 2—4 — разные формы бактериохлорофилла а; Д — первичный донор электрона; А — первичный акцептор электрона; р. ц — реакционный центр

гии, поглощенная молекулой локализованного в хлоросоме бактериохлорофилла с (максимум поглощения пигмента — 742 нм), передается на форму бактериохлорофилла а с максимумом поглощения при

792 нм. Эта форма пигмента локализована как в хлоросоме, так и в мембране. С нее через расположенные в мембране более длинноволновые формы бактериохлорофилла *a* (максимумы поглощения 805 и 865 нм) энергия поступает на модифицированную форму бактериохлорофилла *a* реакционного центра, поглощающую при 865 нм. Таким образом, процесс переноса энергии электронного возбуждения у *S. aurantiacus* может быть представлен в виде следующей цепочки:



В процессе миграции энергии происходит ее «фокусирование», и в конечном итоге она поступает в фотохимические реакционные центры. Молекулы антенны, поставляющие энергию в реакционный центр, вместе с последним формируют фотосинтетическую единицу. У зеленых серобактерий, например, на один реакционный центр приходится 1000—2000 молекул бактериохлорофилла *c*, *d* или *e* и около 100 молекул бактериохлорофилла *a*.

Фотохимические процессы и пути электронного транспорта при фотосинтезе. Фотофосфорилирование

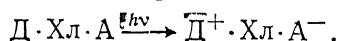
В то время как основная масса фотосинтетических пигментов способна только поглощать энергию света и передавать ее соседним молекулам, небольшая часть молекул хлорофилла участвует в осуществлении фотохимической реакции, т. е. преобразовании электромагнитной энергии в химическую. Последнее связано с тем, что энергия электронного возбуждения, достигнув молекулы хлорофилла определенного вида, приводит к отрыву от них электронов, т. е. фотоокислению этих молекул, сопровождающемуся изменением их способности поглощать свет определенной длины волны.

У прокариот фотохимически активными являются разные длинноволновые формы хлорофилла: у пурпурных бактерий, содержащих бактериохлорофилл *a*, это P_{870} ; у тех пурпурных бактерий, которые содержат бактериохлорофилл *b* — P_{960} ; у зеленых серобактерий — P_{840} ; скользящих зеленых бактерий — P_{865} . Цианобактерии и прохлорофиты содержат два типа фотохимически активных форм хлорофилла *a*: P_{700} и P_{680} ⁶. Эти формы хлорофилла входят в состав фотохимических реакционных центров — структур, в которых осуществляется превращение световой энергии в химическую. Помимо молекул модифицированного хлорофилла в составе реакционных центров обнаружены также молекулы феофитина (не содержащие магния формы хлорофилла), каротиноидов, первичного акцептора и донора электронов, специфических белков. В реакционных центрах молекулы хлорофилла тесно сопряжены с остальными компонентами и в первую очередь с соединениями, служащими первичными акцепторами электронов, и соединениями — донорами электронов, необходимых для заполнения образовавшейся в результате отрыва электрона «вакансии» в молекуле пигмента.

Таким образом, возбужденная молекула определенного вида хлорофилла может отдавать электрон подходящему акцептору, подвер-

⁶ Фотохимически активные формы хлорофилла принято обозначать буквой *P* с указанием той длины волны, при которой происходит индуцированное светом изменение поглощения пигмента.

гаясь при этом фотоокислению. Отдав электрон, т. е. выступив как донор электрона, молекула хлорофилла приобретает способность акцептировать электрон. Реакции обратимого окисления-восстановления хлорофилла под действием света лежат в основе фотохимических процессов фотосинтеза. В целом под действием поглощенного кванта света в комплексе, включающем хлорофилл или бактериохлорофилл реакционного центра (Хл), первичный донор (Д) и акцептор (А) электронов, происходит начальное разделение зарядов:



Путь электрона от молекулы хлорофилла на первичный акцептор происходит против градиента окислительно-восстановительного потенциала. В реакционных центрах пурпурных бактерий за счет поглощенной энергии света электрон поднимается приблизительно от +500 до —200 мВ, зеленых бактерий — от +250 до —450 мВ. В обоих случаях «подъем» составляет около 700 мВ. У фотосинтезирующих прокариот, имеющих два типа фотохимических реакционных центров, движение электрона в реакционном центре II фотосистемы происходит от +900 до порядка —200 мВ, а в I фотосистеме — от +500 до —500 мВ. Диапазон перемещения электрона в этом случае превышает или равен 1000 мВ. Эти значения отражают величину энергии, запасенной в процессе фотохимического акта в реакционном центре. Итог фотохимической реакции — перенос электрона за счет энергии поглощенного кванта света против градиента окислительно-восстановительного потенциала и акцептирование его соединением, выполняющим функцию первичного акцептора электронов. Это соединение в восстановленной форме является первым химическим продуктом, в котором аккумулируется энергия поглощенного кванта света.

У фотосинтезирующих прокариот первичными акцепторами электронов служат соединения разной химической природы. Способность выполнять эту функцию определяется окислительно-восстановительным потенциалом акцептора, который должен быть приблизительно того же уровня, на который «поднят» электрон в результате фотохимической реакции. У пурпурных бактерий первичным акцептором электронов предположительно служит прочно связанный с мембраной хинон, образующий комплекс с железом; у зеленых бактерий эту функцию выполняют FeS-содержащие белки. В реакционных центрах II фотосистемы цианобактерий электрон акцептируется особой формой пластохинона, а в реакционных центрах I фотосистемы эту функцию, как и у зеленых бактерий, выполняют молекулы негемового FeS-белка.

Что происходит после того, как первичный акцептор захватывает электрон? В фотосинтетической мембране в непосредственной близости от первичного акцептора локализованы определенным образом ориентированные переносчики электрона, и по этим переносчикам электрон может возвращаться на «свое» место в молекуле хлорофилла. Последним переносчиком, т. е. непосредственным донором, с которого электроны поступают на хлорофилл реакционного центра, у фотосинтезирующих организмов в большинстве случаев служат цитохромы типа *c*. Возвращение электрона — темновой процесс. Электрон перемещается по цепи переносчиков в соответствии с электрохимическим градиентом. Все ступени процесса экзергонические, т. е. при этом происходит уменьшение свободной энергии. Имеет место так называемый циклический транспорт электронов.

Циклическим электронным транспортом у фотосинтезирующих прокариот не исчерпываются все возможные пути переноса электро-

нов. Электрон, «оторванный» от молекулы хлорофилла реакционного центра, с первичного акцептора может по цепи, состоящей из других переносчиков, не возвращаясь к молекуле хлорофилла, а передаваться на такие клеточные центроболиты, как НАД(Ф)⁺ или окисленный ферредоксин, которые используются в реакциях, требующих восстановителя. Таким образом, электрон, покинувший молекулу хлорофилла, выводится из «системы». Возникает однонаправленный незамкнутый электронный поток, получивший название нециклического пути переноса электронов.

У пурпурных бактерий функционирует только циклический светозависимый поток электронов. У остальных групп прокариот фотоиндуцируется как циклический, так и нециклический перенос электронов, при этом у зеленых бактерий оба пути электронного транспорта связаны с функционированием одной фотосистемы, а у цианобактерий и прохлорофит циклический перенос электронов зависит от активности I фотосистемы, а для нециклического потока электронов необходимо функционирование обеих фотосистем.

Поток электронов по цепи переносчиков при фотосинтезе на определенных этапах сопряжен с направленным перемещением протонов через мембрану, что приводит к созданию протонного градиента. В качестве наиболее простого примера на рис. 79 изображена сокращен-

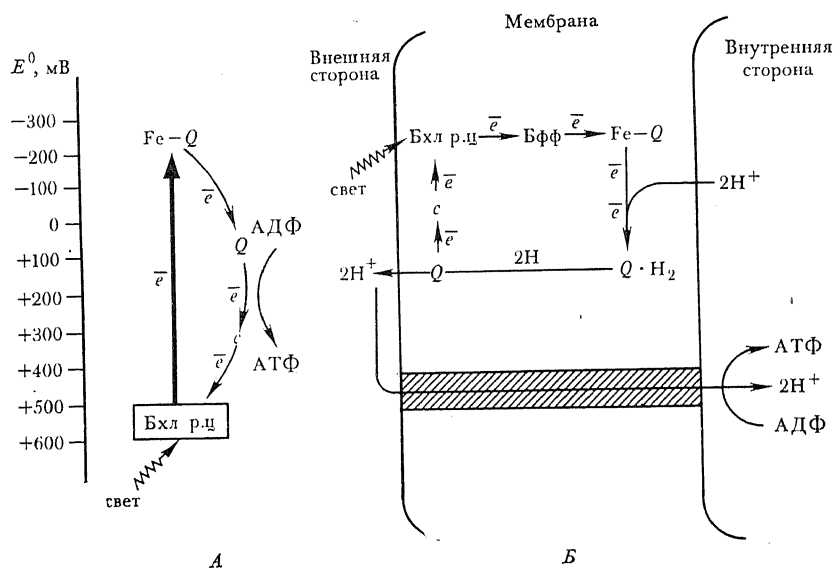


Рис. 79. Схематическое изображение циклического потока электронов (А) и связанного с ним переноса протонов через мембрану (Б):

Бхл р. ц — бактериохлорофилл реакционного центра; БФФ — бактериофеофитин; $Fe-Q$ — первичный акцептор электронов; Q — переносчик хиноновой природы; c — цитохром c

ная цепь циклического переноса электронов, полученного в модельных опытах, и сопряженного с этим ориентированного поперек мембраны переноса протонов. Возникающий при фотосинтетическом электронном транспорте трансмембранный электрохимический градиент протонов используется для синтеза АТФ. Фосфорилирование, сопряженное с циклическим потоком электронов, получило название циклического фотофосфорилирования. Соответственно, нецик-

лическим фотофосфорилированием называют синтез АТФ, сопряженный с нециклическим электронным транспортом.

Образование восстановителя при фотосинтезе

Для протекания процессов биосинтетической природы необходима не только энергия в форме АТФ, но и восстановитель. Особенно четко потребность в восстановителе проявляется, если основным или единственным источником углерода для конструктивных процессов служит CO_2 — предельно окисленное углеродное соединение. Для превращения углекислоты в структурные компоненты клетки и клеточные метаболиты необходимо ее восстановление до уровня углеводов, белков, липидов. Это же справедливо и при использовании в качестве источника углерода органических соединений более окисленных, чем вещества тела, например ацетата.

При циклическом электронном транспорте восстановитель как конечный продукт фотоиндуцированного процесса не образуется, поскольку электрон, покинувший молекулу хлорофилла, в конечном итоге вновь возвращается к ней. Образование восстановителя возможно только на путях нециклического переноса электронов.

Отсутствие у пурпурных бактерий светозависимого восстановления НАД^+ или ферредоксина связано с тем, что электроны, образующиеся в результате фотохимической реакции, акцептируются на железо-хиноновом комплексе, окислительно-восстановительный потенциал которого (≈ -200 мВ) недостаточно отрицателен для непосредственного восстановления НАД^+ или ферредоксина (см. табл. 13). В этой группе фотосинтезирующих прокариот восстановитель образуется в результате темнового переноса электронов от экзогенных доноров (H_2S , тиосульфат, органические соединения) против электрохимического градиента, так называемого обратного переноса электронов (рис. 80, А). Последний осуществляется с участием электронтранспортной цепи, в состав которой входят флавопротеиды и цитохромы типа *b*, за счет энергии, генерируемой в процессе циклического электронного транспорта.

У зеленых бактерий в фотохимических реакционных центрах под действием поглощенного кванта света «подъем» электронов осуществляется до уровня порядка -450 мВ, что делает возможным прямое восстановление НАД^+ или ферредоксина путем переноса электронов с первичного акцептора на эти соединения. В этой группе фотосинтезирующих прокариот восстановитель образуется в фотохимической реакции. Таким образом, у зеленых бактерий в результате фотохимической реакции одного типа индуцируется как циклический транспорт электронов, приводящий к образованию АТФ, так и нециклический, при котором возникает восстановитель (рис. 80, Б).

У цианобактерий и прохлорофит в результате двух фотохимических реакций электроны поднимаются до уровня приблизительно -500 мВ, что делает возможным их прямой перенос на молекулы ферредоксина и НАДФ^+ (рис. 80, В). В группах прокариот, осуществляющих кислородный фотосинтез, фотоиндуцируются два потока электронов: циклический и нециклический. Циклический перенос электронов, связанный с активностью I фотосистемы, приводит к получению только энергии. При нециклическом электронном транспорте, обеспечиваемом активностью двух последовательно функционирующих фотохимических реакций, на конечном этапе электронного переноса образуется восстановитель, а на отрезке электронтранспортной цепи между

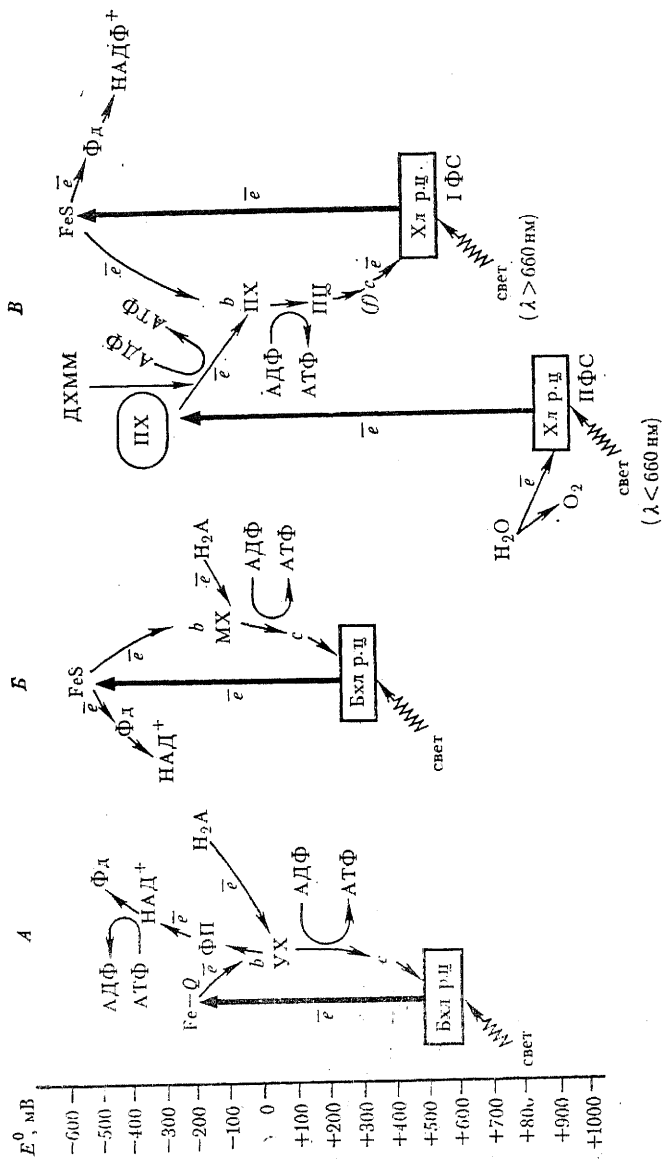


Рис. 80. Электронтранспортная система и пути образования восстановителя при фотосинтезе у различных групп прокариот. А — пурпурные бактерии; В — зеленые бактерии; С — цианобактерии. Бхл (Хл) р. ц — бактериохлорофилл (хлорофилл) реакционного центра; ФС — фотосистема; Fe-Q — железо-хиноновый комплекс; FeS — железосеросодержащий белок; ФП — флавопротеид; ПХ — пластохинон (обладает особой формой пластохинона); УХ — убихинон; МХ — менахион; ПЦ — пластоцианин; Фд — ферредоксин; b, c, f (c) — цитохромы; H_2A — экзогенный донор электронов; ДХММ — дихлорофенилдиметилмочевина (по Кондратьевой, 1981)

двумя фотосистемами, где электроны переносятся по электрохимическому градиенту, имеет место запасание энергии в молекулах АТФ.

Природа экзогенных доноров электронов в бескислородном фотосинтезе

Нециклический транспорт электронов приводит к тому, что электрон, «оторвавшийся» от молекулы хлорофилла, не возвращается к ней, а переходит от первичного акцептора на другие переносчики, с которых потом используется в системе реакций восстановительной природы. В результате в молекуле хлорофилла возникает электронная «вакансия», которую необходимо заполнить, чтобы молекула пигмента могла функционировать. Для этой цели сформировался поток электронов, донорами которых являются легко окисляемые экзогенные вещества.

В качестве веществ — экзогенных доноров электронов — используются как органические, так и неорганические соединения. В последнем случае это в основном различные восстановленные соединения серы (H_2S , сульфит, молекулярная сера, тиосульфат, тетратионат, тиогликолят), а также молекулярный водород.

Что представляют собой сформировавшиеся у пурпурных и зеленых бактерий пути переноса электронов от экзогенных доноров? Окислительно-восстановительные потенциалы органических и неорганических соединений, используемых в качестве экзогенных доноров электронов, таковы, что эти соединения не могут осуществлять темновое восстановление НАД⁺. В то же время они достаточно отрицательны, чтобы обеспечить донирование электронов на молекулы бактериохлорофилла реакционного центра⁷.

У пурпурных бактерий, у которых функционирует только светозависимый циклический электронный транспорт, нет надобности в выполнении электронной «вакансии» в молекуле хлорофилла. В то же время проблема получения фотохимическим путем восстановителя не решена. Поэтому электроны от экзогенных доноров с помощью определенных переносчиков в темновом энергозависимом процессе переносятся против электрохимического градиента на молекулы НАД⁺ и ферредоксина.

Функционирование фотохимического пути образования восстановителя у зеленых бактерий ставит их перед проблемой заполнения возникающих электронных «вакансий» в молекулах бактериохлорофилла реакционного центра. Это достигается путем переноса электронов по электрохимическому градиенту от экзогенного донора к молекулам пигмента.

Таким образом, на определенном этапе эволюции прокариот сформировался тип жизни, в основе которого лежит использование энергии света, и для функционирования этого пути необходимы определенные экзогенные вещества. Можно только предполагать, как складывались механизмы для более эффективного использования этого вида энергии. На первых этапах формирования клеткой аппарата для улавливания световой энергии, когда в окружающей среде содержалось достаточное количество восстановленных органических соединений, свет, вероятно, использовался в качестве дополнительного к субстрат-

⁷ Исключение составляет молекулярный водород, окислительно-восстановительный потенциал которого (—420 мВ) достаточен для темнового восстановления НАД⁺.

ному фосфорилированию источника энергии, обеспечивающего их фотоассимиляцию. Чтобы осуществить эту функцию, необходимо трансформировать энергию света в химическую энергию в форме АТФ. Для этого достаточно было сформирования фотоиндуцированного циклического электронного транспорта, приводящего только к синтезу АТФ. Потребность в восстановителе обеспечивалась за счет органических соединений, содержащихся во внешней среде. Сейчас неизвестно существование какой-либо группы прокариот, у которых функционировал бы в «чистом» виде такой тип метаболизма. Наиболее близки к описанному типу несерные пурпурные бактерии.

Постепенное уменьшение содержания в среде восстановленных органических субстратов привело существовавшие тогда фототрофные организмы к необходимости расширить круг используемых источников углерода. Они приобрели способность усваивать в качестве источника углерода углекислоту. Возникновение этой способности остро поставило вопрос об источнике электронов, необходимых для восстановления углекислоты до уровня восстановленности углеродсодержащих соединений клетки. Световая энергия стала использоваться не только для получения АТФ, но и для образования восстановителя, т. е. сформировался нециклический путь переноса электронов. Отток электронов на конструктивные процессы необходимо было компенсировать притоком электронов, способных заполнять электронную «вакансию» в молекуле хлорофилла. Такая схема фотоиндуцированного электронного транспорта имеет место в группе зеленых бактерий.

Происходил постоянный поиск в окружающей среде соединений, которые могли бы выполнять функцию экзогенных доноров электронов. Определенным шагом вперед была большая независимость от органических соединений внешней среды, выразившаяся в способности использовать в качестве экзогенных доноров электронов восстановленные соединения серы, как это имеет место у пурпурных и зеленых серобактерий.

Возникновение второй фотосистемы

Выбор в качестве экзогенных доноров электронов восстановленных соединений серы обусловил определенную привязанность возникших фототрофных прокариот к местам обитания, где эти соединения имеются. Колоссальное преимущество форм, которые, сохранив положительные моменты сформированного фотосинтетического аппарата, могли бы в качестве экзогенного донора электронов использовать повсеместно распространенное вещество, очевидно. Таким веществом является вода. Поэтому следующий принципиально важный шаг на пути эволюции фотосинтеза и фотосинтезирующих организмов — способность использовать воду в качестве донора электронов.

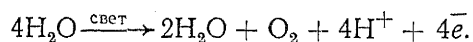
Однако окислительно-восстановительный потенциал системы вода — молекулярный кислород равен +820 мВ, из чего следует, что электронная «вакансия», возникающая, например, в молекуле бактериохлорофилла реакционного центра зеленых серобактерий при нециклическом транспорте электронов, не может быть заполнена электроном воды (фотоокисленная форма бактериохлорофилла реакционного центра зеленых серобактерий — пигмента P_{840} — имеет окислительно-восстановительный потенциал порядка +250 мВ). Чтобы использование электронов воды стало возможным, необходимо, во-первых, их «оторвать» от молекулы H_2O , термодинамически очень невыгодного

донора электронов, и, во-вторых, «поднять» на более высокий энергетический уровень, позволяющий включаться в фотосистему, описанную выше. Природа решила эти проблемы путем создания дополнительной пигментной системы, обозначаемой как фотосистема II. Возникновение II фотосистемы, сделавшее возможным использование молекул воды в качестве экзогенных доноров электрона, произошло на определенном этапе эволюции прокариотных форм.

В настоящее время известны две группы прокариот, у которых фотосистема II уже сформировалась и процесс фотосинтеза функционирует на качественно ином уровне. Это цианобактерии и прохлорофиты. Формирование II фотосистемы у этих групп прокариот связано с появлением новых фоторецепторов и образованием новых типов фотохимических реакционных центров. У цианобактерий и прохлорофит это привело к появлению нового вида хлорофилла — хлорофилла *a*, функционирующего как светсобирающий пигмент и в модифицированных формах входящего в состав реакционных центров: II фотосистемы — P_{680} , I фотосистемы — P_{700} . У прокариот с двумя фотосистемами возникли и новые пигменты антенны: фикобилипротеиды и хлорофилл *b*.

Обнаружено, что в фотоокисленном состоянии хлорофилл *a* реакционного центра II фотосистемы имеет окислительно-восстановительный потенциал порядка $+1000 - +1300$ мВ, т. е. настолько положительный, что в этом состоянии P_{680} может быть восстановлен за счет электронов воды. Механизм реакций, связанных с переносом электронов от молекул воды на P_{680} , неизвестен. Установлено, что необходимым компонентом системы разложения воды является марганец. Очевидно также, что путь электронов от воды до P_{680} включает больше, чем один этап. Таким образом, фотосистема II была построена к фотосистеме I для того, чтобы стало возможным использование воды в качестве донора электронов. Побочный продукт этого процесса — молекулярный кислород. Фотосинтез, осуществляемый при координированном функционировании двух фотосистем и сопровождающийся выделением кислорода из воды, стал одним из основных типов энергетического метаболизма у высших форм жизни и в настоящее время занимает доминирующее положение в энергетической системе живого мира.

Общая схема фотосинтеза цианобактерий представляет определенную серию реакций, включающую две последовательно действующие фотореакции (рис. 80, B). Свет, поглощаемый фоторецепторами II фотосистемы — фикобилипротеидами, хлорофиллом *a*, каротиноидами, — передается на хлорофилл реакционного центра (P_{680}). Поглощение кванта света этим пигментом приводит к отрыву от него электрона, «подъему» его до уровня приблизительно -200 мВ и акцептированию молекулой первичного акцептора — особой формой пластохинона. Окисленная молекула P_{680} восстанавливается за счет электронов воды, подвергающейся фотоокислению в реакционных центрах фотосистемы II:



Электрон от первичного акцептора II фотосистемы проходит через цепь переносчиков и поступает в реакционный центр I фотосистемы, на фотоокисленную форму хлорофилла *a* — пигмент P_{700} ($E_0 \approx +500$ мВ), заполняя электронную «вакансию» аналогично тому, как это происходит при фотосинтезе зеленых бактерий. Перенос электронов от первичного акцептора электронов II фотосистемы до реак-

ционного центра I фотосистемы — темновой процесс, состоящий из серии этапов, в которых участвуют переносчики с понижающимися восстановительными потенциалами, такие как цитохромы разного типа, пластоцианин (медьсодержащий белок), пластохинон. Электронный транспорт на этом участке на определенных этапах сопровождается ориентированным поперек мембраны переносом протонов и, следовательно, генерированием $\Delta\mu_{H^+}$, разрядка которого с помощью протонной АТФ-синтетазы приводит к синтезу АТФ.

Поглощение еще одного кванта света молекулой хлорофилла реакционного центра I фотосистемы (P_{700}) приводит к отрыву от нее электрона, перемещающегося против электрохимического градиента, до уровня приблизительно -500 мВ и акцептированию его молекулой FeS-белка, функционирующего у цианобактерий в качестве первичного акцептора электронов I фотосистемы. От FeS-центра электрон проходит через цепь переносчиков (ферредоксин, флавопротеид) и акцептируется молекулой НАДФ⁺ ($E_0 = -320$ мВ). Восстановленные молекулы НАДФ далее используются как доноры электронов в различных биосинтетических процессах и в первую очередь для восстановления CO_2 .

Итогом двух фотохимических реакций у цианобактерий является образование «ассимиляционной силы» — НАДФ· H_2 и АТФ. Как можно видеть, конечные продукты фотосинтеза цианобактерий в принципе аналогичны продуктам, образующимся при фотосинтезе пурпурных и зеленых бактерий, за исключением того, что у двух последних групп восстановитель образуется в форме НАДФ· H_2 .

I фотосистема цианобактерий (как и прокариот, имеющих только одну фотосистему) фотоиндуцирует также циклический перенос электронов (рис. 80, В), обеспечивающий клетку энергией. В циклическом потоке электроны, акцептированные FeS-белком, через цепь переносчиков вновь возвращаются к месту своего старта и заполняют электронную «вакансию» в молекуле P_{700} . Циклический электронный транспорт сопровождается генерированием протонного градиента и синтезом АТФ.

По проведенным измерениям, для восстановления 1 молекулы CO_2 у фототрофов, имеющих две фотосистемы, необходима энергия 8—10 квантов поглощенного света. Эта величина складывается из следующих значений. В соответствии с приведенной схемой фотосинтеза, в основе которой лежит последовательность из двух фотохимических реакций, перенос одного электрона от воды на НАДФ⁺ требует 2 квантов света. Восстановление молекулы НАДФ⁺ происходит с использованием 2 электронов, т. е. 4 квантов света. Для ассимиляции 1 молекулы CO_2 в цикле Кальвина необходимы 2 молекулы НАДФ· H_2 , т. е. 8 квантов света. Кроме восстановителя в процессе ассимиляции CO_2 используется энергия в виде АТФ. В нециклическом электронном транспорте наряду с НАДФ· H_2 при переносе 2 электронов синтезируются предположительно 1—2 молекулы АТФ.

Для ассимиляции 1 молекулы CO_2 в цикле Кальвина необходимы 3 молекулы АТФ (2 молекулы используются в реакции восстановления 2 молекул фосfogлицериновой кислоты и 1 — в реакции фосфорилирования рибулозо-5-фосфата). Таким образом, нециклическая электронтранспортная система способна или целиком обеспечивать ассимиляцию CO_2 в цикле Кальвина энергией, или для этого нужны дополнительные молекулы АТФ. Последние могут быть получены в циклическом процессе при затратах дополнительных квантов света.

Определение квантового расхода при восстановлении CO_2 у пур-

пурпурных и зеленых бактерий обнаружило такую же величину независимо от окислительно-восстановительного потенциала экзогенных доноров электрона. В соответствии с общепринятой точкой зрения о существовании у этих бактерий только одной фотосистемы для активирования электрона и акцептирования его первичным акцептором необходимо 1 квант света. Поэтому восстановление молекулы НАД⁺ требует только 2 квантов света и, следовательно, общий квантовый расход для ассимиляции CO₂ у прокариот с одной фотосистемой должен быть значительно ниже, чем у организмов с двумя фотосистемами. Чтобы объяснить экспериментально полученные данные, высказываются следующие предположения. У пурпурных бактерий, у которых фотоиндуцируется только циклический транспорт электронов, квантовый расход отражает величину световой энергии, затрачиваемой на осуществление обратного транспорта электронов, приводящего к восстановлению НАД⁺, а также на ассимиляцию CO₂. У зеленых бактерий фотоиндуцируемый нециклический перенос электронов (в отличие от цианобактерий) не связан с получением клеточной энергии. Энергия вырабатывается только в процессе циклического переноса электронов.

Пути использования CO₂ фотосинтезирующими прокариотами

В этом разделе нам придется вернуться несколько назад и напомнить, что согласно современным представлениям наиболее древние формы жизни, источником энергии для которых служили процессы субстратного фосфорилирования, использовали органические углеродсодержащие соединения внешней среды одновременно по двум каналам: в качестве источника энергии и источника углерода. Постепенное истощение таких соединений из окружающей среды поставило организмы перед двумя проблемами: поиском новых источников энергии и новых источников углерода. В первом случае это привело к использованию энергии света, во втором — к использованию углекислоты.

Как предельно окисленное соединение углекислота не может служить источником энергии, эта же ее особенность делает углекислоту и «дорогостоящим» источником углерода. И только обеднение среды восстановленными углеродсодержащими соединениями на начальном этапе развития жизни поставило организмы перед необходимостью использовать углекислоту в качестве источника углерода ценой больших энергетических затрат, т. е. сформировать механизмы автотрофной фиксации CO₂ и выработать способность синтезировать все углеродные соединения из углерода углекислоты. Однако было бы неверным считать, что до этого углекислота была инертным соединением и никак не вовлекалась в метаболизм анаэробных хемогетеротрофных прокариот. Наоборот, все имеющиеся данные говорят о том, что углекислота весьма активно использовалась в конструктивном и энергетическом метаболизме разных групп первично анаэробных хемогетеротрофов.

Использование углекислоты хемогетеротрофными прокариотами

Сейчас хорошо известно, что все гетеротрофные организмы (низшие и высшие) с помощью определенных ферментативных реакций активно включают углекислоту в метаболизм, при этом у прокариот

пути использования CO_2 намного многообразнее, чем у эукариот⁸. Углекислота у прокариотных организмов активно используется по путям как конструктивного, так и энергетического метаболизма. В конструктивном метаболизме она выполняет две основные функции: присоединение углекислоты в качестве C_1 -группы к молекуле клеточного метаболита приводит к удлинению ее углеродного скелета; кроме того, при этом происходит регулирование общего уровня окисленности-восстановленности клеточных метаболитов, поскольку включение CO_2 -группы в молекулу какого-либо вещества приводит к заметному повышению степени ее окисленности. В этом случае CO_2 входит в состав веществ клетки.

Свойство предельной окисленности молекулы CO_2 используется в энергетическом метаболизме ряда анаэробных прокариот, получающих энергию в процессе брожения, где CO_2 служит для удаления избытка

Таблица 25

Включение CO_2 в клеточные метаболиты у хемогетеротрофных прокариот

Фермент	Катализируемая реакция
Пируваткарбоксилаза	пировиноградная кислота + CO_2 + АТФ → ЩУК + АДФ + F_H
ФЕП-карбоксикиназа	ФЕП + CO_2 + АДФ → ЩУК + АТФ
ФЕП-карбоксилаза	ФЕП + CO_2 → ЩУК + F_H
ФЕП-карбокситрансфосфорилаза	ФЕП + CO_2 + F_H → ЩУК + F_H
Малатдегидрогеназа (малик-фермент)	пировиноградная кислота + CO_2 + НАДФ · H_2 → яблочная кислота + НАДФ ⁺
Изоцитратдегидрогеназа	α -кетоглутаровая кислота + CO_2 + НАД(Ф) · H_2 → изолимонная кислота + НАД(Ф) ⁺
Пируватсинтаза	ацетил-КоА + CO_2 + $\text{F}_{\text{Двосст}}$ → пировиноградная кислота + $\text{F}_{\text{Докисл}}$ + КоА-SH
α -Кетобутиратсинтаза	пропионил-КоА + CO_2 + $\text{F}_{\text{Двосст}}$ → α -кетобутират + $\text{F}_{\text{Докисл}}$ + КоА-SH
α -Кетоглутаратсинтаза	сукцинил-КоА + CO_2 + $\text{F}_{\text{Двосст}}$ → α -кетоглутарат + $\text{F}_{\text{Докисл}}$ + КоА-SH
Пропионил-КоА-карбоксилаза	пропионил-КоА + CO_2 + АТФ → метилмалонил-КоА + АТФ + F_H
Ацетил-КоА-карбоксилаза	ацетил-КоА + CO_2 + АТФ → малонил-КоА + АДФ + F_H

Сокращения: ЩУК — шавелевоуксусная кислота; ФЕП — фосфоенолпировиноградная кислота; $\text{F}_\text{Д}$ — ферредоксин.

⁸ Предположение о том, что использование CO_2 является, вероятно, общим свойством всех организмов, было высказано еще в 1908 г. А. Ф. Лебедевым. Впервые фиксацию CO_2 наблюдали в 1936 г. у пропионовых бактерий Х. Вуд и К. Веркман.

восстановителя, т. е. как конечный акцептор электронов. Это же свойство молекулы CO_2 используется и в энергетическом метаболизме группы строго анаэробных метанобразующих бактерий, но у них электроны на CO_2 поступают через цепь связанных с мембраной переносчиков электронного транспорта. CO_2 , участвующая в реакциях энергетического метаболизма, не включается в вещества клетки, а в восстановленной форме (в составе молекул формиата, ацетата, метана) накапливается в среде.

В наибольшей степени способность вовлекать CO_2 в метаболизм среди первично анаэробных хемогетеротрофных прокариот проявляется в группе кластридиев.

Основным путем включения CO_2 в вещества клетки у хемогетеротрофных прокариот служат реакции карбоксилирования. К настоящему времени обнаружено несколько десятков таких реакций. В табл. 25 приведены некоторые реакции включения CO_2 в клеточные метаболиты у хемогетеротрофных прокариот. Можно полагать, что к тому времени, когда возникла необходимость шире использовать CO_2 как источник углерода для построения веществ клетки, уже были сформированы различные ферментативные реакции включения CO_2 в хемогетеротрофный метаболизм. Обращает внимание, что акцепторами углекислоты служили органические кислоты, используемые в большинстве случаев в активированной форме. Поэтому основа для перехода к более интенсивному использованию CO_2 в конструктивном метаболизме, приведшая в конечном итоге к автотрофии, была заложена в недрах хемогетеротрофного метаболизма.

Кажется вполне вероятным, что автотрофный тип конструктивного метаболизма формировался параллельно с формированием аппарата для использования энергии света, поскольку на первом этапе эволюции энергетические и конструктивные процессы зависели от одних и тех же органических источников и, следовательно, прокариотные организмы одновременно были поставлены перед проблемой поиска новых источников энергии и углерода.

Пути ассимиляции CO_2 зелеными серобактериями. Цикл Арнона

У зеленых серобактерий рода *Chlorobium* обнаружен циклический механизм фиксации CO_2 , в основе которого лежат реакции восстановительного карбоксилирования органических кислот. Этот циклический механизм получил название восстановительного цикла карбоновых кислот, или цикла Арнона (рис. 81). В цикле Арнона углекислота фиксируется в четырех ферментативных реакциях, две из которых идут при участии фотохимически восстановленного ферредоксина, а одна — таким же путем образованного НАД $\cdot\text{H}_2$. В результате одного оборота цикла из 4 молекул CO_2 , 10 [H] с использованием энергии (3 молекулы АТФ) синтезируется молекула щавелевоуксусной кислоты — конечный продукт цикла.

Описан и более «короткий» вариант цикла, являющийся по существу обращенным ЦТК, в результате которого фиксируются 2 молекулы CO_2 с использованием для их восстановления 8 [H] и энергии в форме АТФ. Конечным продуктом в этом случае является ацетат в виде ацетил-КоА, использующийся для построения веществ клетки.

Прежде всего обращает внимание, что все реакции, в которых происходит фиксация CO_2 в цикле Арнона, функционируют как механизмы хемогетеротрофной фиксации CO_2 или аналогичны им

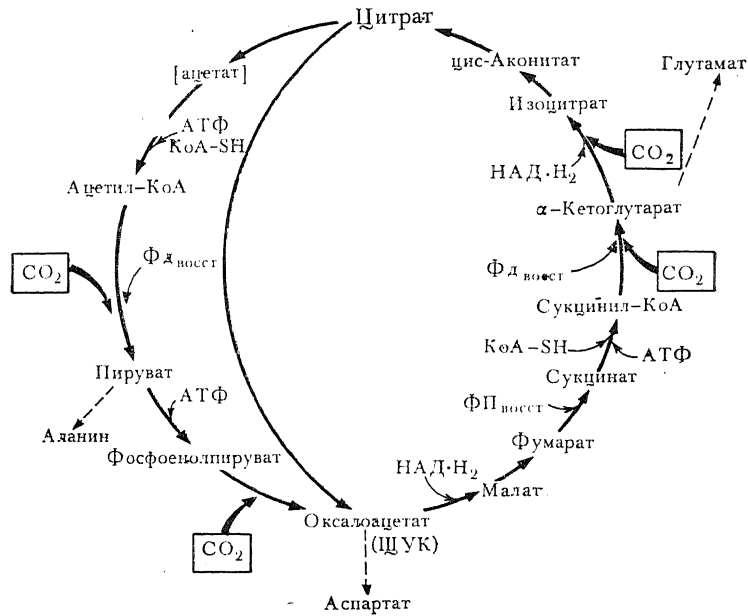
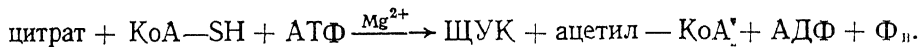


Рис. 81. Цикл Арнона. Объяснение см. в тексте (по Кондратьевой, 1981)

(табл. 25). Таким образом, собственно реакции фиксации CO_2 принципиально не новы, они заимствованы из гетеротрофного метаболизма. Эволюционным приобретением на этом этапе можно считать создание определенной последовательности ферментативных реакций, замыкающихся в цикл (для функционирования любого метаболического пути необходимо постоянное поддержание определенного уровня промежуточных метаболитов и молекул-акцепторов; это хорошо обеспечивается именно циклическим механизмом).

Длительное время существовали сомнения относительно функционирования у зеленых серобактерий разобранной выше последовательности реакций в виде циклического механизма. Для существования цикла необходима реакция: цитрат \rightarrow ЩУК + ацетил-КоА, позволяющая замыкать цикл, приводя, с одной стороны, к регенерации исходного метаболита, запускающего очередной оборот цикла, с другой — к образованию конечного продукта, поступающего в клеточный метаболизм. Недавно у *Chlorobium limicola* обнаружен фермент, катализирующий эту реакцию. Для его активности необходим АТФ. Таким образом, ключевая реакция цикла, катализируемая цитратлиазой, протекает в соответствии со следующим уравнением:



Фиксация CO_2 по механизму, обнаруженному Д. Арноном (D. Arnon) с сотрудниками, не получила широкого распространения среди фотосинтезирующих прокариот. К настоящему времени этот механизм действует у зеленых серобактерий рода *Chlorobium*. У зеленых скользких бактерий рода *Chloroflexus* и пурпурных бактерий обнаружен другой механизм фиксации CO_2 — так называемый восстановительный пентозофосфатный цикл, или цикл Кальвина.

Цикл Кальвина — основной путь фиксации CO₂ фотосинтезирующими прокариотами

Цикл Кальвина, являющийся основным путем фиксации CO₂ у всех высших фотосинтезирующих организмов, функционирует уже в группе пурпурных бактерий. У цианобактерий и прохлорофит это также основной путь фиксации CO₂. Последовательность ферментативных реакций, приводящих к фиксации углекислоты и образованию из нее молекулы гексозы, была расшифрована М. Кальвином (М. Calvin) с сотрудниками в 50-х гг. (рис. 82). Что в цикле Кальвина нового,

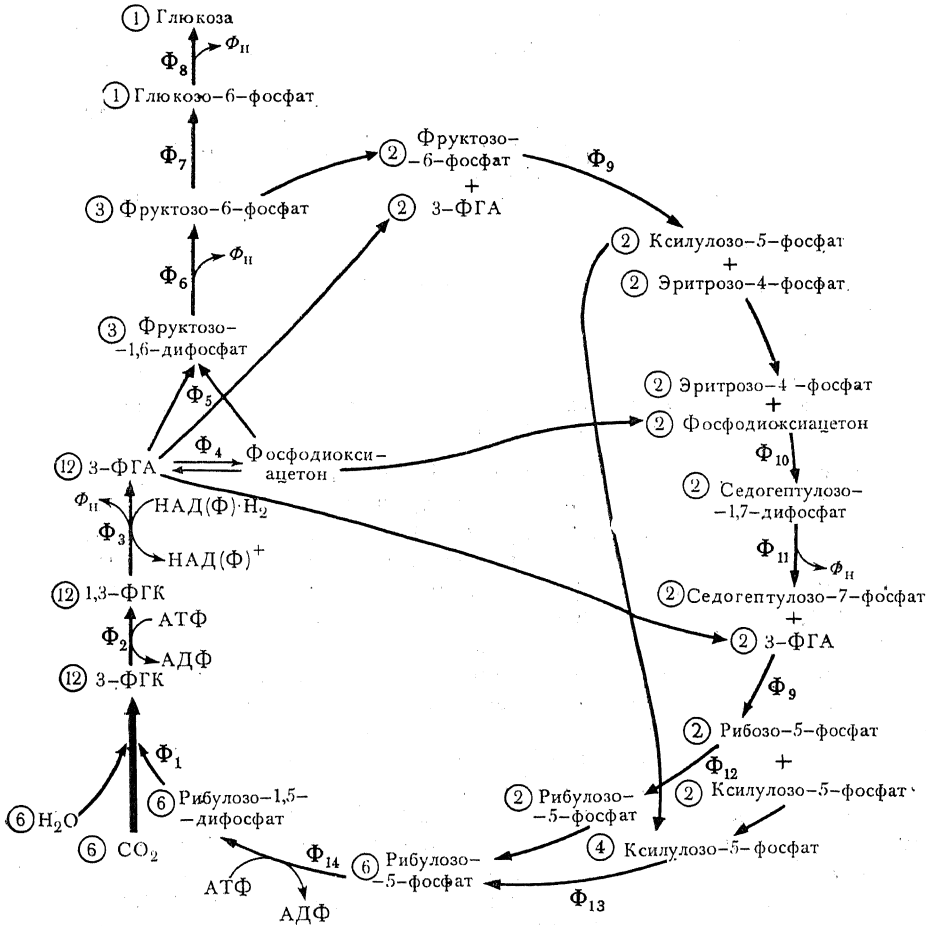


Рис. 82. Цикл Кальвина:

Φ₁ — рибулозидифосфаткарбоксилаза; Φ₂ — 3-фосфоглицераткиназа; Φ₃ — глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; Φ₄ — триозофосфат-изомераза; Φ₅ — фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза; Φ₆ — 1,6-фосфофруктозофосфатаза; Φ₇ — глюкозофосфат-изомераза; Φ₈ — глюкозо-6-фосфатаза; Φ₉ — транскетолаза; Φ₁₀ — альдолаза; Φ₁₁ — дифосфатаза; Φ₁₂ — фосфопентозоизомераза; Φ₁₃ — фосфопентозоэпимераза; Φ₁₄ — фосфорибулкиназа. Цифры, заключенные в кружок, обозначают число молекул, участвующих в реакциях (по Dagley, Nicholson, 1973)

существенно отличающего его от всех изложенных выше реакций фиксации CO₂ как гетеротрофной природы, так и функционирующих в цикле Арнона? Новая химическая природа акцептора. Акцепторами CO₂ во всех до сих пор описанных реакциях были органические кисло-

ты в обычной или активированной форме. В цикле Кальвина впервые акцептором CO_2 выступает вещество углеводной природы — активированная молекула пентозы.

Ферментативные пути, ведущие к синтезу пентозофосфатов, уже формировались в окислительном пентозофосфатном пути. Для цикла Кальвина уникальными являются два фермента, не участвующие в других мегаболических путях: фосфорibuлокиназа и рибулозодифосфаткарбоксилаза. Первый из них связан с активированием молекулы акцептора путем вторичного фосфорилирования, а второй катализирует реакцию акцептирования рибулозо-1,5-дифосфатом молекулы CO_2 и последующее гидролитическое расщепление образовавшейся гексозы на 2 молекулы 3-ФГК, одна из которых в карбоксильной группе содержит углерод из CO_2 (рис. 83).

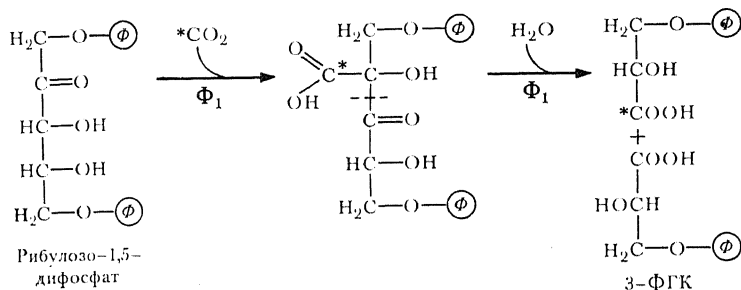
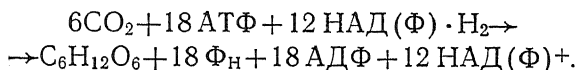


Рис. 83. Механизм реакции карбоксилирования, катализируемой рибулозодифосфаткарбоксилазой

Образовавшиеся молекулы 3-ФГК затем подвергаются серии последовательных ферментативных превращений, ведущих к образованию молекулы глюкозы. Эти превращения включают реакции, известные в гликолитическом пути, но идущие теперь в обратном направлении (реакции, катализируемые ферментами Ф_2 — Ф_5 и Ф_7 на рис. 82), и реакции, сформировавшиеся у гетеротрофов на пути синтеза глюкозы из C_2 - и C_3 -соединений для обхода необратимых реакций гликолитического пути (реакции, катализируемые ферментами Ф_6 и Ф_8 на рис. 82). Примечательно, что реакция восстановления 1,3-ФГК до 3-ФГА, катализируемая глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой, у пурпурных и зеленых бактерий зависит от $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$, а у цианобактерий и высших растений — от $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$.

Такова биосинтетическая часть цикла Кальвина, ведущая к фиксации CO_2 и образованию из нее молекулы гексозы. Однако, чтобы функционировал этот механизм, необходимо постоянное воспроизведение молекул — акцепторов CO_2 . Остальные ферментативные реакции цикла служат для регенерации акцептора CO_2 — рибулозо-1,5-дифосфата. Исходными субстратами в этом случае являются фосфодиоксиацетон, 3-ФГА и фруктозо-6-фосфат, а превращения, которым они подвергаются, катализируются ферментами, большинство из которых функционирует в окислительном пентозофосфатном пути. Это транскетолаза, фосфопентозоизомераза, фосфопентозоэпимераза, а также альдолаза и фосфатаза (ферменты Ф_9 — Ф_{13} на рис. 82). Последняя реакция цикла Кальвина — фосфорилирование рибулозо-5-фосфата за счет АТФ, катализируемое специфическим для этого метаболического пути ферментом фосфорibuлокиназой и приводящее к образованию акцептора CO_2 — молекулы рибулозо-1,5-дифосфата. Суммарное уравнение цикла Кальвина можно изобразить следующим образом:



Для синтеза 1 молекулы глюкозы из CO_2 необходимо 6 оборотов цикла. Таким образом, сформировавшийся для автотрофной ассимиляции CO_2 механизм базируется на ферментативных реакциях, которые уже функционировали к тому времени у хемотротрофных прокариот. Для работы цикла необходимо было создать только две новые ферментативные реакции, связанные с подготовкой акцептора и собственно акцептированием CO_2 .

В настоящее время общепризнано, что цикл Кальвина является основным механизмом автотрофной ассимиляции углекислоты. Последняя у большинства фотосинтезирующих прокариот восстанавливается с помощью фотохимически образованной «ассимиляционной силы» — АТФ и восстановителя. Однако и АТФ, и восстановитель ($\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ или $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$) — центроболиты, образующиеся на разных метаболических путях. Поэтому нельзя рассматривать восстановительный пентозофосфатный цикл ассимиляции CO_2 строго привязанным только к фотосинтезу. У большой группы хемотротрофных прокариот этот путь фиксации CO_2 сочетается с темновыми окислительными процессами получения энергии. Важно отметить только, что это основной путь ассимиляции CO_2 , если последняя служит единственным или главным источником углерода для организма.

Группы фотосинтезирующих прокариот

В настоящее время известно пять групп прокариот, обладающих способностью преобразовывать световую энергию в химическую. Механизмы, с помощью которых эта способность реализуется, принадлежат к трем различным типам (табл. 26). До недавнего времени счи-

Таблица 26

Группы фототрофных прокариот и осуществляемые ими типы фотосинтеза

Характеристика фотосинтеза		Прокариоты, осуществляющие фотосинтез определенного типа
Пигмент, связанный с превращением энергии	Особенность процесса	
Хлорофилл	не сопровождается выделением O_2	пурпурные бактерии, зеленые бактерии
	сопровождается выделением O_2	цианобактерии, прохлорофиты
Каротиноид	не сопровождается выделением O_2	галобактерии

тали, что обязательным для превращения световой энергии в химическую является участие в этом процессе хлорофилльных пигментов. Однако в 1971 г. были обнаружены галофильные бактерии, содержащие особый каротиноид, фотохимические превращения которого сопряжены с синтезом АТФ. Зависимый от хлорофилла фотосинтез делится на два типа: не сопровождающийся выделением молекулярного кислорода (бескислородный фотосинтез) и сопровождающийся выделением O_2 (кислородный фотосинтез). Фотосинтез первого типа осуществляют две группы прокариот: пурпурные и зеленые бактерии. Кислородный

фотосинтез, связанный со способностью использовать в качестве донора электронов молекулы воды, присущ большой группе цианобактерий и обнаруженным в 1975 г. прохлорофитам.

В сравнении с фотосинтезом, обнаруженным у галобактерий, зависимые от хлорофилла типы фотосинтеза, несмотря на значительные различия, представляются эволюционно взаимосвязанными. Тенденция к сближению всех групп фототрофных прокариот, осуществляющих фотосинтез с участием хлорофилла, нашла свое отражение в предложенной недавно системе их классификации, согласно которой эти организмы отнесены к классу Photobacteria (рис. 84). Последний разде-

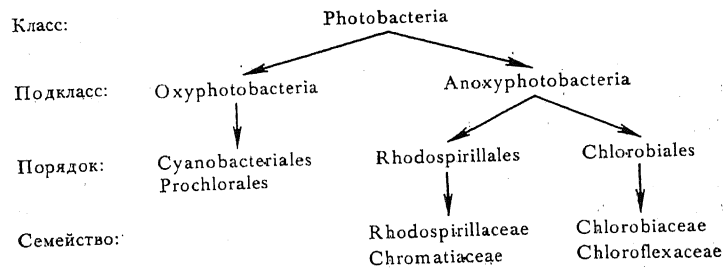


Рис. 84. Систематика прокариот, осуществляющих фотосинтез хлорофилльного типа

лен на два подкласса: Оухурphotobacteria и Анохурphotobacteria. Первый подкласс, куда вошли прокариоты, фотосинтез которых сопровождается выделением молекулярного кислорода, в свою очередь, делится на два порядка: Cyanobacteriales (цианобактерии) и Prochlorales (прохлорофиты). В основу деления положены различия в пигментном составе и тонком строении фотосинтетического аппарата между организмами из обеих таксономических групп (табл. 27). Подкласс Анохурphotobacteria, объединяющий прокариоты с бескислородным типом фотосинтеза, делится на два порядка: Rhodospirillales (пурпурные бактерии) и Chlorobiales (зеленые бактерии). В основе деления в этом случае также лежат четкие различия в тонком строении и пигментном составе фотосинтетического аппарата между организмами (табл. 28). Подразделение на таксоны более низкого ранга дано при характеристике каждой из выделенных четырех групп.

Таблица 27

Основные различия между прокариотными организмами, относимыми к порядкам Cyanobacteriales и Prochlorales

Признак	Cyanobacteriales	Prochlorales
Организация тилакоидов	одиночные	спаренные
Фикобилисомы	+	—
Хлорофилл <i>b</i>	—	+
Фикобилипротеиды	+	—

Различия, положенные в основу деления фототрофных прокариот подкласса *Apoxyphotobacteria* на порядки *Rhodospirillales* и *Chlorobiales*

Признак	<i>Rhodospirillales</i>	<i>Chlorobiales</i>
Локализация пигментов антенны	ЦПМ и ее производные	хлоросомы и ЦПМ
Пигменты антенны	бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i>	бактериохлорофилл <i>a + c</i> ; <i>a + d</i> , или <i>a + e</i>
Пигменты реакционного центра	бактериохлорофилл <i>a</i> или <i>b</i>	бактериохлорофилл <i>a</i>

Пурпурные бактерии

Группа пурпурных бактерий в настоящее время насчитывает более 40 видов, объединенных в 15 родов.

Все пурпурные бактерии — одноклеточные организмы разной морфологии (рис. 85). Размеры их колеблются от 1 до 20 мкм в длину

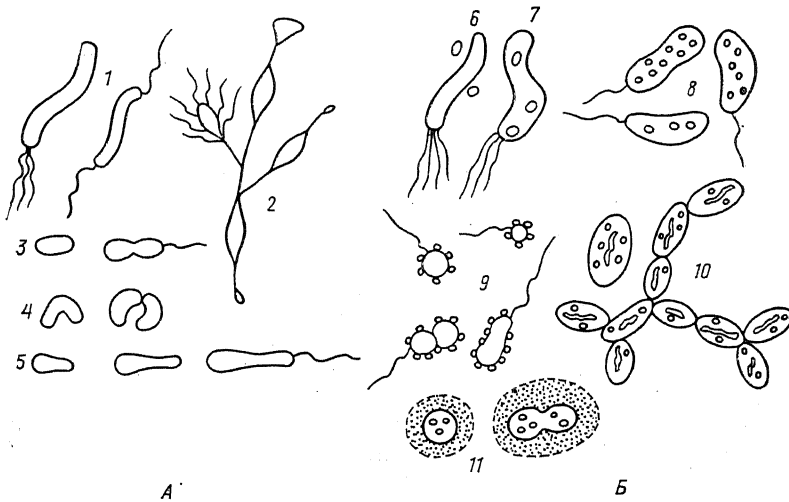


Рис. 85. Основные морфологические типы пурпурных бактерий.
 А — несерные пурпурные бактерии: 1 — *Rhodospirillum*; 2 — *Rhodomicrobium*; 3 — *Rhodopseudomonas spheroides*; 4 — *Rhodocyclus*; 5 — *Rhodopseudomonas palustris*.

Б — пурпурные серобактерии: 6 — *Ectothiorhodospira*; 7 — *Thiospirillum*; 8 — *Chromatium*; 9 — *Thiocystis*; 10 — *Thiodictyon*; 11 — *Thiocapsa* (по Горленко, Дубининой, Кузнецову, 1977)

и от 0,3 до 6 мкм в ширину. Некоторые виды образуют выросты. Среди пурпурных бактерий есть неподвижные и подвижные формы. Движение осуществляется с помощью одного или пучка жгутиков, расположенных обычно полярно. Перитрихальное жгутикование характерно только для вида *Rhodomicrobium vannielii*. Большинство пурпурных бактерий размножаются бинарным делением, некоторые виды — почкованием. Клетки неподвижных форм, размножающихся поперечным делением в разных плоскостях, имеют тенденцию формировать агрегаты правильной геометрической формы.

Один из представителей пурпурных бактерий — *Rhodomicrobium vannielii* — в процессе развития может образовывать морфологически дифференцированные формы: дочерняя клетка, возникающая в результате почкования, способна превращаться в неподвижную клетку, подобную материнской, подвижную, снабженную жгутиками, и покоящуюся клетку — экзоспору.

Все пурпурные бактерии окрашиваются отрицательно по Граму и, следовательно, имеют сложное строение клеточной стенки. Для клеток характерна хорошо развитая система внутрицитоплазматических фотосинтетических мембран (тилакоидов), являющихся производными ЦПМ и сохранивших с ней отчетливо наблюдаемую связь. Тилакоиды имеют вид отдельных пузырьков, трубок или пластинок (ламелл), располагающихся по периферии клетки (см. рис. 4), и представляют вместе с ЦПМ единую мембранную систему. Подобно многим обитающим в толще воды прокариотам, в клетках некоторых неподвижных пурпурных бактерий содержатся газовые вакуоли. В качестве запасных веществ обнаружены углевод типа гликогена и поли- β -оксимасляная кислота. Группа пурпурных бактерий довольно гетерогенна в отношении нуклеотидного состава ДНК. Молярное содержание ГЦ-оснований колеблется от 45 до 73%, хотя у большинства представителей оно находится в пределах 61—73%.

Все пурпурные бактерии характеризуются сходным строением и функционированием фотосинтетического аппарата. Они могут расти на свету в анаэробных условиях, осуществляя фотосинтез бескислородного типа.

Однако по целому ряду физиологических особенностей, в том числе и в отношении использования разных соединений в качестве доноров электронов при фотосинтезе, между отдельными представителями пурпурных бактерий были обнаружены различия. Еще Х. Молиш (H. Molisch) в 1907 г. разделил все пурпурные бактерии на два семейства на том основании, что представители первого в присутствии H_2S содержали в клетках гранулы молекулярной серы, а представители второго — нет. Деление пурпурных бактерий на два семейства сохраняется и до сих пор, однако получение новых данных относительно этих прокариот привело к выработке иных критериев, на основе которых осуществляется деление. В настоящее время пурпурные бактерии, объединенные в порядок Rhodospirillales, делятся на семейства Rhodospirillaceae (несерные пурпурные бактерии) и Chromatiaceae (пурпурные серобактерии). В основе различий между семействами лежит механизм окисления сульфида.

Все представители пурпурных серобактерий могут расти при освещении в анаэробных условиях на минеральной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода CO_2 . Все они используют H_2S в качестве донора электронов, окисляя его последовательно до молекулярной серы (S^0) и далее до сульфата (SO_4^{2-}), при этом капли серы, окруженные белковой мембраной, временно откладываются внутри клетки. Это происходит в результате того, что скорость окисления H_2S до S^0 превышает скорость последующего окисления S^0 до SO_4^{2-} . Отложение серных гранул, видимое под микроскопом, и дало в свое время Х. Молишу основание назвать эти пурпурные бактерии серными. Исключение составляют виды рода *Ectothiorhodospira*, окисляющие сульфид и тиосульфат до молекулярной серы, но не накапливающие последнюю внутри клеток. Представители этого рода выделяют серу в среду, а затем опять поглощают ее и в клетке окисляют до SO_4^{2-} . Таким образом, независимо от того, накапливается сера вне или внутри клеток, она всегда образуется внутриклеточно.

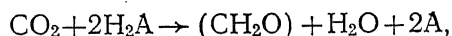
Некоторые типичные несерные пурпурные бактерии, принадлежащие к семейству Rhodospirillaceae, также способны расти при освещении на минеральной среде, используя H_2S в качестве донора электронов. Но в отличие от пурпурных серобактерий представители этой таксономической группы используют H_2S в качестве донора электронов, окисляя его только до молекулярной серы, не накапливающейся в клетках, или до сульфата, минуя в последнем случае стадию образования молекулярной серы. Таким образом, подчеркивается, что несерные пурпурные бактерии молекулярную серу не окисляют.

Однако недавно выделены пурпурные бактерии, на основании морфологических и ряда физиологических свойств отнесенные к семейству Rhodospirillaceae, способные расти на минеральной среде при достаточно высоких концентрациях H_2S и окислять его сначала до молекулярной серы, а последнюю — до сульфата.

Таким образом, положенный в основу классификации порядка Rhodospirillales признак обнаружен у представителей обеих таксономических групп. Тем не менее можно назвать ряд свойств, типичных для представителей либо серных, либо несерных пурпурных бактерий. Однако, как правило, признак, характерный для организмов одной группы, можно найти у представителей другой. Это затрудняет проведение четкой разграничительной линии между двумя семействами.

Пурпурные несерные бактерии имеют склонность к фотооргано-гетеротрофному образу жизни, предпочитая в качестве доноров электронов и источников углерода в процессе фотосинтеза простые органические соединения: жирные кислоты, спирты, сахара, аминокислоты. Кроме того, для этих бактерий характерна потребность в витаминах группы В. Некоторые из несерных пурпурных бактерий нуждаются в восстановленных соединениях серы для биосинтетических процессов.

Многие виды семейства Rhodospirillaceae способны расти фотоавтотрофно, используя молекулярный водород в качестве донора электронов для восстановления CO_2 . Некоторые виды для этих целей могут окислять тиосульфат. Таким образом, фотосинтез, осуществляемый этой группой прокариот, в общем виде может быть изображен следующим уравнением:



где H_2A — экзогенный донор электронов, в качестве которого могут выступать разные органические соединения, молекулярный водород, восстановленные соединения серы; (CH_2O) — символическое изображение продукта ассимиляции CO_2 .

Работами последнего времени в группе несерных пурпурных бактерий обнаружено большое разнообразие метаболических путей, в первую очередь связанных с получением энергии. Несерные пурпурные бактерии способны расти в темноте в аэробных или микроаэробных условиях. В этом случае они получают энергию в процессе дыхания за счет окисления тех органических соединений, которые используются этими организмами как доноры электронов или источники углерода при фотосинтезе. У несерных пурпурных бактерий, растущих в темноте в аэробных условиях, установлено наличие полного набора ферментов ЦТК, осуществляющих окисление органических субстратов, электроны с которых через электронтранспортную цепь поступают на O_2 .

Представители рода *Rhodospseudomonas* способны к хемоавтотрофии. Они растут на минеральной среде в темноте при пониженной концентрации O_2 , используя энергию, получаемую при окислении молекулярного водорода, для ассимиляции CO_2 .

У несерных пурпурных бактерий развиты контакты с молекулярным кислородом. У них имеются ферментные системы защиты от токсических форм молекулярного кислорода. Все несерные пурпурные бактерии способны расти хемотрофно в микроаэробных условиях, хотя не все из них могут расти при атмосферном содержании O_2 . При концентрации O_2 от 0,5 до 5% фотосинтез и окислительный метаболизм могут функционировать одновременно. Молекулярный кислород у несерных пурпурных бактерий (как и у всех прокариот, осуществляющих бескислородный фотосинтез) выступает как мощный фактор, регулирующий их метаболизм. Уже в достаточно низких концентрациях O_2 специфически ингибирует синтез фотосинтетических пигментов (бактериохлорофиллов), внутрицитоплазматических мембран и рибулозодифосфаткарбоксилазы — ключевого фермента цикла Кальвина. В то же время в присутствии O_2 наблюдается увеличение активности ферментов ЦТК.

Недавно обнаружены бактерии, выделенные в новый род *Erythrobacter*, по ряду свойств сходные с несерными пурпурными бактериями, но отличающиеся от них отношением к O_2 . Это грамтрицательные палочки, перемещающиеся с помощью жгутиков. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 63,4%. Фотосинтетические пигменты представлены бактериохлорофиллом *a* и каротиноидами, основной из которых — сфероиденон. Система внутрицитоплазматических мембран везикулярного типа весьма сходна с таковой несерных пурпурных бактерий. Однако в отличие от последних эти бактерии не могут расти анаэробно ни на свету, ни в темноте. Не растут они также на свету в аэробных условиях за счет неорганических субстратов, но хорошо растут в тех же условиях в присутствии разнообразных органических соединений.

Молекулярный кислород у *Erythrobacter* индуцирует синтез бактериохлорофилла *a* и фотосинтетическую фиксацию CO_2 . Таким образом, обнаруженные бактерии от известных фототрофных прокариот, осуществляющих бескислородный фотосинтез, отличаются облигатной зависимостью от молекулярного кислорода. Природа этой зависимости пока не ясна.

Среди представителей рода *Rhodopseudomonas* обнаружена способность расти в анаэробных условиях за счет окисления органических соединений, сопряженного с транспортом электронов на нитраты. Процесс переноса электронов по дыхательной цепи не на O_2 , а на другие конечные акцепторы, которыми могут быть различные органические или неорганические соединения, получил не совсем удачное название «анаэробного дыхания». Наконец, в последние годы для ряда несерных пурпурных бактерий показана способность расти анаэробно в темноте, осуществляя сбраживание органических субстратов, таких как сахара, пируват.

Таким образом, в группе несерных пурпурных бактерий обнаружены разные биосинтетические способности, сочетающиеся с разнообразными способами получения энергии. Источниками углерода могут быть CO_2 или органические соединения, а источниками энергии — фотосинтез, аэробное и анаэробное дыхание, брожение.

В отличие от несерных для пурпурных серобактерий основной способ существования — фотолитоавтотрофия. Все представители этой группы могут расти на среде с CO_2 в качестве единственного источника углерода, используя как донор электронов сульфид. Многие виды могут использовать для этой цели молекулярную серу, сульфит, тиосульфат, молекулярный водород.

Представители этой физиологической группы обнаруживают весьма ограниченную способность использовать органические соединения. В большинстве случаев последние служат дополнительными источниками углерода и редко — донорами электронов. Все виды могут фотометаболизировать ацетат и пируват. Показателем зависимости от

органических соединений может быть найденная у многих пурпурных серобактерий потребность в витамине В₁₂. Кроме того, большинство видов не способно к ассимиляционной сульфатредукции, и для биосинтетических целей им необходима сера в восстановленной форме. Только некоторые пурпурные серобактерии могут существовать полностью фотоорганогетеротрофно.

В течение длительного времени пурпурные серобактерии считались строгими анаэробами и облигатными фототрофами. Недавно было показано, что спектр отношения к молекулярному кислороду в этой группе достаточно широк. В большинстве пурпурные серобактерии высоко чувствительны к O₂, однако и среди них есть виды, растущие в темноте в аэробных условиях на минеральной среде или с использова-

Таблица 29

Основные физиолого-биохимические различия между семействами порядка Rhodospirillales (по Кондратьевой, Горленко, 1978)

Признак	Сем. Rhodospirillaceae	Сем. Chromatiaceae
Доноры электронов при фотосинтезе: H ₂ S S ⁰ Na ₂ S ₂ O ₃ H ₂ органические соединения	±* ± ± ± +	+ ± ± ± ±
Источники углерода: CO ₂ органические соединения	± +	+ +**
Рост в темноте на органических средах за счет: аэробного дыхания анаэробного дыхания брожения	+ ± ±	± — ±
Цикл трикарбоновых кислот	«замкнут»	«разорван»
Способность к хемоавтотрофии	±	±
Способность к ассимиляционной сульфатредукции	±	±
Отношение к O ₂ воздуха	факультативные анаэробы	в большинстве — строгие анаэробы; отдельные виды — факультативные анаэробы
Способность к азотфиксации	±	±

* Признак обнаружен у всех (+), большинства (±), некоторых (±) представителей группы; (—) — признак отсутствует.

** Количество фотоассимилируемых органических соединений и степень их использования невелики.

нием органических соединений. Хемолитоавтотрофный рост при низком содержании O_2 обнаружен к настоящему времени у целого ряда пурпурных серобактерий, ассимилирующих CO_2 в цикле Кальвина, а энергию получающих в процессе дыхания в результате окисления сульфида, тиосульфата, молекулярной серы или H_2 . Для *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* и *Thiocapsa roseopersicina* показан аэробный хемоорганогетеротрофный рост. Органические вещества в этом случае используются как источники углерода и энергии. Последняя запасается в процессе дыхания. Некоторые пурпурные серобактерии оказались также способными расти в темноте в анаэробных условиях (в атмосфере аргона или молекулярного водорода), сбраживая некоторые сахара или органические кислоты. Метаболизирование органических соединений пурпурными серобактериями связано с функционированием у них незамкнутого ЦТК, у которого, как правило, отсутствуют малат- и α -кетоглутаратдегидрогеназы, а также иногда глиоксилатного цикла и гликолитического пути. Основные физиолого-биохимические различия между семействами порядка Rhodospirillales представлены в табл. 29.

Большинство пурпурных бактерий не могут использовать нитраты в качестве источника азота. Источником азота для них служат аммоний, мочевины или аминокислоты. Многие пурпурные бактерии проявляют способность к азотфиксации. Исключение составляют некоторые виды, имеющие крупные клетки. Способность к азотфиксации у пурпурных бактерий сочетается со способностью к фотовыделению молекулярного водорода. Вероятно, этот процесс происходит при участии нитрогеназы в условиях, когда азотфиксация по каким-то причинам не происходит или масштабы ее ограничены. Помимо нитрогеназы выделение H_2 пурпурными бактериями катализируется гидрогеназой, однако ее основная функция, по современным представлениям, заключается в поглощении молекулярного водорода и его последующем активировании, необходимом для использования в качестве донора электронов при фотоассимиляции CO_2 .

Таким образом, с точки зрения энергетических и конструктивных возможностей, группа пурпурных бактерий достаточно многолика. На одном полюсе располагаются формы, обладающие большой независимостью от органических соединений внешней среды, на другом — организмы, облигатно привязанные к использованию органических соединений. Получение энергии возможно за счет световых (бескислородный фотосинтез) и темновых (дыхание, брожение) процессов.

Зеленые бактерии

В течение длительного времени зеленые бактерии принимали за зеленые или сине-зеленые водоросли (цианобактерии). Начало их изучения как бактерий связано с именами С. Н. Виноградского и К. ван Нилы. Сейчас эта небольшая группа прокариот, осуществляющих фотосинтез бескислородного типа, на основании особенностей пигментного состава и строения фотосинтетического аппарата выделена в порядок Chloobiales и насчитывает более 15 видов, объединенных в 8 родов.

В последнее время в изучении зеленых бактерий достигнуты большие успехи. Выделены новые оригинальные организмы. Это дало основание разделить порядок на два семейства на основе следующих признаков: зеленые серобактерии, отнесенные к семейству Chloobiaceae, — одноклеточные формы, строгие анаэробы, не способные использовать органические соединения в качестве доноров электронов при фотосин-

тезе; в семейство Chloroflexaceae выделены нитчатые, передвигающиеся скольжением формы, факультативные анаэробы, способные использовать органические соединения как доноры электронов при фототрофном росте.

Все зеленые серобактерии — грамтрицательные одноклеточные неподвижные формы (рис. 86, А). Клетки мелкие ($0,3-1,2 \times 0,5-$

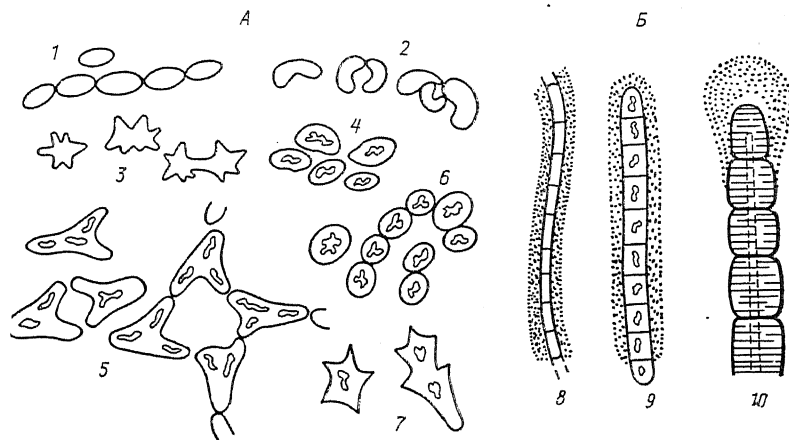


Рис. 86. Основные морфологические формы зеленых бактерий.

А — зеленые серобактерии: 1 — *Chlorobium limicola*; 2 — *Chlorobium vibrioforme*; 3 — *Prosthecochloris aestuarii*; 4 — *Pelodiction luteolum*; 5 — *Pelodiction clathratiforme*; 6 — *Clathrochloris sulfurica*; 7 — *Ancalochloris perfilievii*.

Б — зеленые скользкие бактерии: 8 — *Chloroflexus aurantiacus*; 9 — *Chloronema giganteum*; 10 — *Oscillochloris chrysea* (по Горленко, Дубининой, Кузнецову, 1977)

2,7 мкм), палочковидные, яйцеобразные или слегка изогнутые. Недавно в новые роды *Ancalochloris* и *Prosthecochloris* выделены бактерии, имеющие непостоянную клеточную форму. Она может меняться от сферической до звездобразной за счет образования выростов. При выращивании в чистой культуре часто образуют цепочки, клубки или сетчатые структуры. Размножение бинарным делением.

В качестве запасного вещества зеленые серобактерии накапливают гликогенподобный полисахарид. Поли-β-оксимасляная кислота не обнаружена. Группа достаточно однородна по нуклеотидному составу ДНК: молярное ГЦ-содержание колеблется от 48 до 58%.

Зеленые бактерии, входящие в состав семейства Chloroflexaceae, — это нитчатые формы, состоящие из множества палочковидных клеток (рис. 86, Б), размеры которых зависят от вида ($0,5-5+2-6$ мкм). Длина трихомов *Chloroflexus aurantiacus* и *Chloronema giganteum* достигает 100—300 мкм, *Oscillochloris chrysea* — 2,5 мм. У *Chloroflexus* и *Chloronema* трихомы окружены слизистым чехлом. Все описанные представители семейства Chloroflexaceae имеют типичную грамтрицательную клеточную стенку, но не ригидную, а гибкую, обеспечивающую скользкое движение со скоростью порядка 0,1—0,4 мкм/с. Клетки внутри трихома размножаются поперечным бинарным делением. Кроме того, как и все нитчатые формы, зеленые скользкие бактерии размножаются путем отделения небольшой части трихома.

Первая зеленая нитчатая бактерия *Chloroflexus aurantiacus* была выделена из термального серного источника. Оптимальные температурные условия для роста — 55° , а верхняя граница — около 70° .

Позднее были выделены мезофильные варианты этого вида.

Все зеленые серобактерии — облигатные фотолитоавтотрофы и строгие анаэробы (гораздо более строгие, чем пурпурные серобактерии). В присутствии O_2 они не растут. Основным источником углерода — углекислота. Как доноры электронов для фотоассимиляции CO_2 могут использовать только неорганические соединения: H_2S , S^0 , $Na_2S_2O_3$, H_2 . Характерный для зеленых серобактерий процесс фотосинтеза может быть изображен в виде следующего уравнения:



Окисление сульфида на первом этапе приводит к образованию молекулярной серы, откладывающейся вне клетки. Первоначально капля серы, окруженная ЦПМ, образующей специализированное впячивание, выделяется в периплазматическое пространство клетки. По мере окисления сероводорода увеличившаяся в размере серная капля растягивает клеточную стенку, а затем и разрывает ее, высвобождаясь наружу. Истощение H_2S из среды приводит к поглощению клетками серы и последующему ее окислению до сульфата. Изучение механизма промежуточного образования молекулярной серы у разных групп фототрофных и хемотрофных H_2S -окисляющих прокариот привело к заключению о его однотипности. Во всех случаях сера образуется внутриклеточно, но у мелких организмов из-за ограниченности объема цитоплазмы она выделяется наружу, а у крупных — остается в клетке.

Способность использования представителями семейства *Chlorobiaceae* органических соединений ограничена несколькими сахарами, аминокислотами и органическими кислотами (глюкоза, формиат, ацетат, пируват и др.). Добавление этих соединений в среду приводит к некоторому стимулированию роста культуры и сводится к тому, что они в ограниченной степени используются как дополнительные источники углерода. Ни в одном случае органические соединения не могли служить донорами электронов или основным источником углерода. Их использование было возможно только при наличии в среде H_2S и CO_2 . Включение органических соединений в метаболизм зеленых серобактерий происходит по путям, сходным для большинства прокариот. Определенная роль отводится обнаруженному в этой группе организмов «разорванному» ЦТК, функционирующему в системе конструктивного метаболизма. Начальные этапы метаболизирования некоторых органических кислот связаны с их карбоксилированием.

Все представители семейства *Chlorobiaceae* для синтеза серосодержащих компонентов клетки требуют серу в восстановленной форме, т. е. не способны к ассимиляционной сульфатредукции. Не могут они также использовать азот в окисленной форме, т. е. в виде нитратов. Для большинства зеленых серобактерий показана способность к фиксации N_2 . Многие штаммы нуждаются в витамине B_{12} .

Физиолого-биохимическая характеристика нитчатых зеленых бактерий основана в основном на данных, полученных для одного из представителей этой группы — *Chloroflexus aurantiacus*, поскольку остальные, выделенные в отдельные роды *Chloronema* и *Oscillochloris*, не получены в отдельному времени в чистой культуре. Нитчатая зеленая бактерия *C. aurantiacus* может быть охарактеризована как факультативный анаэроб и фототроф. На свету она растет в аэробных и анаэробных условиях в присутствии разнообразных органических соединений: сахаров, спиртов, органических кислот и аминокислот. Обнаруживает потребность в ряде витаминов, в том числе витамине B_{12} . В темноте рост возможен только в аэробных условиях. Таким образом,

использование органических соединений этим организмом происходит по нескольким путям: в качестве источников углерода, источников энергии и доноров электронов.

На свету *Chloroflexus* может окислять H_2S , что приводит к образованию молекулярной серы и отложению ее в среде в виде аморфной массы. Молекулярная сера в очень незначительной степени затем окисляется до сульфата. Другие восстановленные соединения серы этот организм при фототрофном росте не окисляет. Для одного из штаммов показана способность к фотолитоавтотрофии, т. е. росту на свету в анаэробных условиях с использованием в качестве единственного донора электронов H_2S , а источника углерода — CO_2 . В аэробных условиях в отсутствие сульфида в минеральной среде рост за счет фотосинтетической ассимиляции CO_2 не происходит. Следовательно, для фотосинтеза *Chloroflexus* необходимы экзогенные доноры электронов, в качестве которых используются различные органические соединения или H_2S . В темноте в анаэробных условиях на среде с различными органическими соединениями рост также не обнаружен. Таким образом, *Chloroflexus* получает энергию в процессе фотосинтеза или дыхания при окислении в последнем случае только органических субстратов.

Фотоассимиляция CO_2 у *Chloroflexus* происходит, вероятно, в цикле Кальвина, на что указывает обнаруженная у него активная рибулосодифосфаткарбоксилаза. Метаболизм органических углеродных соединений осуществляется в результате функционирования полного ЦТК и гликосилатного цикла. Используемые источники азота для *Chloroflexus* — ионы аммония и некоторые аминокислоты. Нитраты не поддерживают роста. Попытки обнаружить способность к фиксации молекулярного азота пока не дали положительных результатов.

Хотя *Chloroflexus* растет в присутствии молекулярного кислорода, последний репрессирует синтез бактериохлорофиллов и образование хлоросом. В природных условиях популяции этих бактерий часто имеют оранжевый цвет из-за высокого содержания каротиноидов (β - и γ -каротинов и гликозидов последнего) и низкого содержания бактериохлорофиллов в клетке. Поэтому первоначально *Chloroflexus* принимали за гетеротрофный организм. Только в фотолитоавтотрофных условиях при высоком содержании сульфида в среде и низких интенсивностях света лабораторные культуры или природные популяции *Chloroflexus* имеют зеленый цвет, обусловленный высоким содержанием бактериохлорофилла *c*. Данные, сравнивающие по некоторым признакам оба семейства порядка Chlogobiales, суммированы в табл. 30.

Скользящие зеленые бактерии интересны чертами сходства с представителями других групп фототрофных прокариот: пурпурными бактериями, зелеными серобактериями и цианобактериями. Наличие двух типов бактериохлорофиллов и хлоросом, где локализована основная масса светособирающих бактериохлорофиллов, послужили основанием для объединения зеленых скользящих бактерий с зелеными серобактериями. По составу каротиноидов Chlogoflexaceae обнаруживают сходство как с зелеными серобактериями, так и цианобактериями. С пурпурными бактериями скользящие зеленые формы сближают первичные фотохимические процессы и отношение к органическим соединениям, а с цианобактериями — целый ряд морфологических черт (многоклеточная трихомная организация, скользящий механизм движения).

Сравнительная характеристика семейств порядка Chlorobiales
(по Кондратьевой, Горленко, 1978)

Признак	Семейство Chlorobiaceae	Семейство Chloroflexaceae*
Организация	одноклеточная	многоклеточная
Подвижность	неподвижные	подвижные (скольжение)
Газовые вакуоли	±**	±
Запасное вещество	гликогеноподобный полисахарид	поли-β-оксимасляная кислота
Молярное ГЦ-содержание ДНК, %	48—58	53—55
Отношение к температуре	мезофилы	мезофилы и термофилы
Доноры электронов при фотосинтезе	H ₂ S, S ⁰ , Na ₂ S ₂ O ₃ , H ₂	H ₂ S, органические соединения
Механизм ассимиляции CO ₂ при фотосинтезе	цикл Арнона	цикл Кальвина
Источники углерода	CO ₂ , органические соединения	органические соединения, CO
Рост в темноте на органических средах за счет: аэробного дыхания анаэробного дыхания брожения	— — —	+ — —
Цикл трикарбонных кислот	«разорван»	«замкнут»
Способность к хемоавтотрофии	—	—
Способность к ассимиляционной сульфатредукции	—	+
Отношение к O ₂	облигатные анаэробы	факультативные анаэробы
Способность к азотфиксации	±	—

* Физиолого-биохимические свойства изучены в основном только у одного представителя группы — *Chloroflexus aurantiacus*, полученного в чистой культуре.

** Обозначения см. в табл. 29.

Цианобактерии

К цианобактериям относится большая группа организмов, сочетающих прокариотное строение клетки, характерное для всех бактерий, со способностью осуществлять фотосинтез, сопровождающийся выделением O_2 , что свойственно разным группам водорослей и высших растений. Объединение черт, присущих организмам, относящимся к разным царствам живой природы, сделало цианобактерии объектом борьбы за принадлежность к низшим растениям (водорослям) или бактериям (прокариотам).

История изучения. Вопрос о положении цианобактерий (сине-зеленых водорослей) в системе живого мира имеет долгую и противоречивую историю. В течение длительного времени они рассматривались как одна из групп низших растений. Их систематика осуществлялась в соответствии с правилами Ботанического кода. И только в 60-х гг. XX в., когда было установлено четкое различие между прокариотным и эукариотным типами клеточной организации и на основании этого К. ван Нилем и Р. Стейниером сформулировано определение бактерий, встал вопрос о пересмотре положения сине-зеленых водорослей в системе живых организмов. Единственное, что объединяет все без исключения известные бактерии, — это прокариотный тип клеточной организации. Тогда на вопрос: «Что такое бактерии?» можно дать четкий ответ: «Бактерии — это организмы с прокариотной клеточной организацией». Таким образом, термины «бактерии» и «прокариоты» становятся синонимами.

Изучение цитологии клеток сине-зеленых водорослей с помощью современных методов привело к неоспоримому выводу о том, что эти организмы также являются типичными прокариотами. Следовательно, данное выше определение делает необходимым включение в состав бактерий и сине-зеленых водорослей. Из него же вытекает и другое логическое следствие: любой обнаруженный в природе организм, имеющий прокариотный тип строения клетки, только на основании этого должен быть отнесен к бактериям. Как следствие этого Р. Стейниером предложено отказаться от названия «сине-зеленые водоросли» и называть данные организмы цианобактериями — термином, отражающим их истинную биологическую природу.

Воссоединение цианобактерий с остальными бактериями поставило исследователей перед необходимостью пересмотра существующей классификации этих организмов, проводившейся в течение длительного времени в соответствии с правилами Международного кода ботанической номенклатуры, и подчинении ее правилам Международного кода номенклатуры бактерий. Согласно правилам Ботанического кода определение вида может быть основано на описании природного материала или гербарийного образца, т. е. образца в «неживом» состоянии. Из такого материала применительно к цианобактериям можно извлечь мало информации. Международный код номенклатуры бактерий предусматривает необходимость наличия «живого» материала, полученного в виде чистой культуры, и его всестороннего изучения в лабораторных условиях. Принадлежность цианобактерий к прокариотам делает необходимым их классификацию на тех же признаках, что и остальных бактерий.

В течение длительного времени альгологами было описано около 170 родов и больше 1000 видов сине-зеленых водорослей. Р. Стейниером и группой его сотрудников в 70-х гг. начата большая работа по созданию новой систематики цианобактерий, основанной на изучении

чистых культур. К настоящему времени уже получено больше 300 чистых штаммов цианобактерий. Их изучение в лаборатории показало, что многие морфологические и культуральные признаки, использовавшиеся альгологами для классификации этих организмов, являются непостоянными и, следовательно, не могут быть использованы для таксономии. Стало очевидным, что из-за вариабельности ряда морфологических и культуральных свойств, проявляющихся в зависимости от природных условий, часто один и тот же вид, выделенный из разных мест обитания, относили к различным родам и даже семействам. Начатая работа по пересмотру систематики цианобактерий, в основу которой положено изучение чистых штаммов в определенных условиях культивирования, привела к подразделению всех изученных цианобактерий на 5 больших групп, пока не имеющих таксономического статуса, и выделению более 20 родов.

Для классификации использованы постоянные морфологические признаки, закономерности развития культуры, особенности клеточной ультраструктуры, величина и нуклеотидная характеристика генома, особенности углеродного и азотного метаболизма и ряд других.

Морфологическая характеристика. Цианобактерии — морфологически разнообразная группа грамотрицательных прокариот, включающая одноклеточные, колониальные и многоклеточные формы. Клетки — сферические, палочковидные или изогнутые; одиночные или образующие скопления, удерживаемые после ряда делений вместе с помощью окружающего их общего чехла. Многоклеточные формы имеют нитевидное строение. Единицей их структуры служит нить (трихом, или филамент). Нити бывают простые или ветвящиеся. Простые нити состоят из одного ряда клеток (однорядные трихомы), имеющих одинаковые размеры, форму и строение, или клеток, различающихся по этим параметрам. Ветвящиеся трихомы возникают в результате разных причин, в связи с чем различают ложное и истинное ветвление. К истинному ветвлению приводит способность клеток трихома делиться в разных плоскостях, в результате чего возникают многорядные трихомы или однорядные нити с однорядными же боковыми ветвями. Ложное ветвление трихомов не связано с особенностями деления клеток внутри нити, а есть результат прикрепления или соединения разных нитей под углом друг к другу.

В процессе жизненного цикла некоторые цианобактерии формируют дифференцированные единичные клетки или короткие нити, служащие для размножения (баеоциты, гормогонии), выживания в неблагоприятных условиях (споры, или акинеты) или азотфиксации в аэробных условиях (гетероцисты). Более подробная характеристика дифференцированных форм цианобактерий дана ниже при описании их систематики и процесса азотфиксации. Краткая характеристика акинет представлена в гл. 4.

Для разных представителей этой группы прокариот характерна способность к скользящему движению, осуществляющемуся по твердому субстрату без помощи жгутиков. Оно свойственно как нитчатым формам (трихомы и/или гормогонии), так и одноклеточным (баеоциты).

Известны разные способы размножения цианобактерий. Деление клеток происходит путем равновеликого бинарного деления, сопровождающегося образованием поперечной перегородки или перетяжки; неравновеликого бинарного деления (почкования); множественного деления (см. рис. 20, А—Г). Бинарное деление может происходить только

в одной плоскости, что у одноклеточных форм приводит к образованию цепочки клеток, а у нитчатых — к удлинению однорядного трихома. Деление в нескольких плоскостях ведет у одноклеточных цианобактерий к формированию скоплений правильной (кубической) или неправильной формы, а у нитчатых — к возникновению многорядного трихома (если к такому делению способны почти все вегетативные клетки нити) или однорядного трихома с боковыми однорядными ветвями (если способность к делению в разных плоскостях обнаруживают только отдельные клетки нити). Размножение нитчатых форм цианобактерий осуществляется также с помощью обрывков трихома, состоящих из одной или нескольких клеток, у некоторых — также гормогониями, отличающимися по целому ряду признаков от трихомов, и в результате прорастания акинет в благоприятных условиях.

Систематика. Начатая работа по реклассификации цианобактерий на принципах Бактериологического кода привела к выделению 5 основных групп, различающихся морфологическими признаками (табл. 31). Для характеристики выделенных родов привлечены также:

Таблица 31

Основные группы цианобактерий
(по Rippka, Waterbury, Stanier, 1981)

Одноклеточные формы		Многоклеточные формы		
I группа	II группа	III группа	IV группа	V группа
Одиночные клетки или колонии		Нитчатые формы		
Размножение бинарным делением в одной или более плоскостях или почкованием	Размножение только множественным делением или чередованием бинарного деления в одной или более плоскостях и множественного	Трихомы неветвящиеся, состоят из одного ряда только вегетативных клеток. Рост трихома интеркалярным делением клеток в одной плоскости. Размножение обрывками трихомов	В неветвящихся однорядных трихомах помимо вегетативных клеток образуются дифференцированные клетки: гетероцисты и иногда акинеты. Рост трихома — интеркалярным делением клеток в одной плоскости. Размножение — обрывками трихомов, у некоторых культур также с помощью гормогониев и в результате прорастания акинет	Те же признаки, что и у представителей IV группы. Отличительный признак: способность вегетативных клеток зрелого трихома к интеркалярному делению более чем в одной плоскости

данные, полученные при изучении клеточной ультраструктуры, генетического материала, физиолого-биохимических свойств.

К I группе отнесены одноклеточные цианобактерии, существующие в виде одиночных клеток или формирующие колонии (рис. 87). Для большинства представителей этой группы характерно образование чехлов, окружающих каждую клетку и, кроме того, удерживающих вместе группы клеток, т. е. участвующих в формировании колоний. (*Gloeobacter*, *Gloeothese*, *Gloeocapsa*). Цианобактерии, клетки которых не образуют чехлов, легко распадаются до одиночных клеток (*Synechococcus*, *Synechocystis*). Размножение осуществляется бинарным делением в одной (*Gloeobacter*, *Cyanobacterium*, *Synechococcus*, *Gloeothese*) или нескольких (*Gloeocapsa*, *Synechocystis*) плоскостях, а также почкованием (*Chamaesiphon*). Изучение ультраструктуры и физиолого-биохимических свойств цианобактерий, отнесенных к I группе, приве-

Характеристика родов цианобактерий, включенных в состав первой группы

Род	Краткая характеристика	Отличительный признак
<i>Gloeobacter</i>	Клетки палочковидной формы (1,5×2—3 мкм), неподвижные. Размножение бинарным делением в одной плоскости. После деления клетки с помощью чехлов остаются соединенными в массы неправильной формы. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 64%; величина генома — 2,7·10 ⁹ Д. Клетки не содержат тилакоидов и типичных для цианобактерий фикобилисом. Способность к азотфиксации не обнаружена	Отсутствие тилакоидов и типичных фикобилисом
<i>Gloeothece</i>	Клетки имеют вид коротких палочек шириной 5—6 мкм; окружены чехлом. Размножение бинарным делением в одной плоскости. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 40—43%; величина генома — 5,0—5,2·10 ⁹ Д. Среди одноклеточных форм выделяются уникальным свойством — способностью фиксировать N ₂ в аэробных условиях	Способность к аэробной азотфиксации
<i>Synechococcus</i>	Клетки палочковидной формы шириной 1,2—3,5 мкм; не образуют чехла. Размножение бинарным делением в одной плоскости. Молярное ГЦ-содержание ДНК — 47—56%; величина генома — 1,6—3,1·10 ⁹ Д. Способность к азотфиксации не обнаружена	Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 47—56%
<i>Cyanobacterium</i>	Новый род, выделенный из рода <i>Synechococcus</i> . Включены клетки палочковидной формы шириной 1,7—2,3 мкм; неподвижные. Размножение бинарным делением в одной плоскости. Чехла не образуют. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 39—41%, величина генома — 2,5—4,2·10 ⁹ Д	Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 39—41%
<i>Cyanobium</i>	Род так же выделен из состава рода <i>Synechococcus</i> . Палочковидные клетки шириной 0,8—1,4 мкм; неподвижные. Чехла не образуют. Размножение бинарным делением в одной плоскости. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 67—71%; величина генома — 2,0—2,6·10 ⁹ Д	Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 67—71%
<i>Cyanothece</i>	Клетки палочковидной формы шириной 4—6 мкм; неподвижные, чехла не образуют. Размножаются бинарным делением в одной плоскости. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 42%. Показана способность к фиксации N ₂ в анаэробных условиях	Способность к азотфиксации в анаэробных условиях
<i>Gloeocapsa</i>	Клетки сферической формы; образуют чехол. Размножение бинарным делением в двух или трех плоскостях. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 40—46%; величина генома — 2,9—3,5·10 ⁹ Д	
<i>Synechocystis</i>	Клетки сферической формы; чехла не образуют. Размножение бинарным делением в нескольких плоскостях. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — от 35 до 48%; величина генома — 1,8—3,5·10 ⁹ Д	
<i>Chamaesiphon</i>	Клетки яйцеобразной формы; не образуют чехла. Размножение почкованием. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 47%; величина генома — 3,6—3,7·10 ⁹ Д	Размножение почкованием

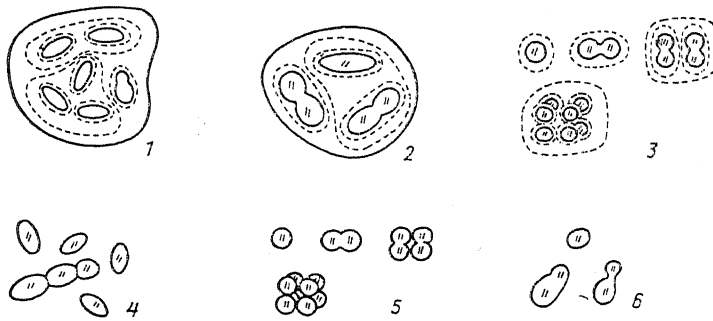


Рис. 87. Схематическое изображение цианобактерий, отнесенных к первой группе:
 1 — *Gloeobacter*; 2 — *Gloeotheca*; 3 — *Gloeocapsa*; 4 — *Synechococcus*; 5 — *Synechocystis*; 6 — *Chamaesiphon*. Прерывистой линией обозначены чехлы, черточками — наличие тилакоидов

ло к пересмотру списка существующих родов: ликвидации тех из них, признаки которых при выращивании в чистой культуре оказались непостоянными, и выделении новых родов на основании выявленных, значимых для таксономии признаков. Характеристика родов цианобактерий, отнесенных к I группе, представлена в табл. 32.

Во II группу выделены одноклеточные цианобактерии, способные к размножению путем множественного деления. Они существуют в виде одиночных клеток или скоплений, удерживаемых вместе с помощью внешнего (по отношению к наружной мембране) фибриллярного слоя клеточной стенки. Скопления могут состоять всего из нескольких клеток разной формы, иметь кубическую или неправильную форму. Входящие в эту группу цианобактерии различаются способностью размножаться только множественным делением (*Dermocarpa*, *Xenococcus*) или чередованием процессов бинарного и множественного деления (*Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Chroococcidiopsis*). Освобождающиеся в результате множественного деления бациллы могут быть подвижными (*Dermocarpa*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*) или неподвижными (*Xenococcus*, *Chroococcidiopsis*). У подвижных бацилл при освобождении из материнской клетки отсутствует дополнительный фибриллярный слой клеточной стенки. Подвижность их теряется, когда этот слой синтезируется. У неподвижных форм к моменту выхода из материнской клетки дополнительный слой клеточной стенки уже сформирован. Цикл развития цианобактерий II группы, размножающихся только множественным делением или чередованием бинарного и множественного деления, схематически представлен на рис. 88. Характеристика основных родов этой группы дана в табл. 33.

В отличие от рассмотренных выше групп в III—V группы включены многоклеточные цианобактерии, имеющие нитчатое строение. Особенностью цианобактерий III группы является недифференцированность трихома (последний состоит только из вегетативных клеток) и его рост путем интеркалярного деления клеток в одной плоскости. Отнесенные в III группу цианобактерии различаются строением трихомов и отдельных клеток, особенностями соединения клеток в трихоме, наличием или отсутствием чехла, способностью к движению и некоторыми другими морфологическими признаками (рис. 89). Для большинства представителей этой группы характерны прямые трихомы, клетки в которых, дисковидные или цилиндрические, плотно прилегают друг к другу (*Oscillatoria*) или разделены глубокой перетяжкой (*Pseudoanabaena*). Трихомы могут быть окружены общим чехлом разной толщи-

Характеристика основных родов цианобактерий II группы

Род	Краткая характеристика
<i>Dermocarpa</i>	Вегетативные клетки сферической формы разной величины. Размножение только множественным делением. Беоциты подвижны. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 38—44%; величина генома — $3,1-4,4 \cdot 10^9$ Д
<i>Xenococcus</i>	Те же морфологические характеристики, что у предыдущего рода. Отличительная особенность — образование неподвижных беоцитов. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 44%; величина генома — $4 \cdot 10^9$ Д
<i>Dermocarpella</i>	Включает цианобактерии, размножающиеся чередованием бинарного и множественного деления. Бинарное деление вегетативной клетки приводит к появлению скоплений из 2—3 клеток разной формы. Одна из клеток подвергается множественному делению. Освобождающиеся беоциты — подвижны. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 45%; величина генома — $3,3 \cdot 10^9$ Д
<i>Myxosarcina</i>	Ряд последовательных бинарных делений в трех плоскостях приводит к образованию клеточных скоплений кубической формы. Часть клеток в колонии подвергается множественному делению, сопровождающемуся освобождением подвижных беоцитов. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 43—44%; величина генома — $3,5 \cdot 10^9$ Д
<i>Chroococidiopsis</i>	Цианобактерии, включенные в этот род, отличаются от отнесенных к предыдущему роду образованием к моменту выхода из материнской клетки неподвижных беоцитов. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 40—46%; величина генома — $3,3-4,7 \cdot 10^9$ Д

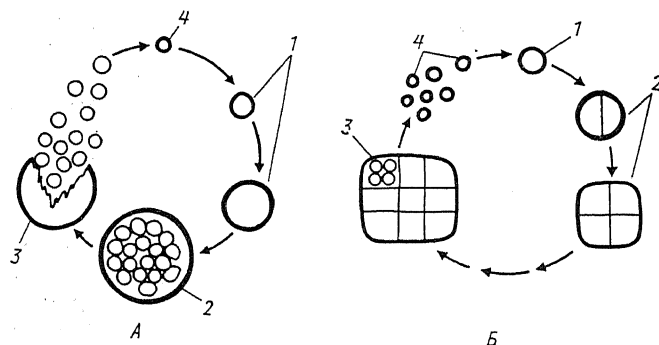


Рис. 88. Схематическое изображение циклов развития некоторых цианобактерий, включенных во II группу.

А. Цикл развития цианобактерий рода *Dermocarpa*: 1 — увеличение объема беоцита до размеров вегетативной клетки; 2 — множественное деление, приводящее к образованию беоцитов; 3 — разрыв материнской клетки и освобождение подвижных беоцитов, не содержащих внешнего фибриллярного

слоя клеточной стенки; 4 — синтез внешнего слоя клеточной стенки и потеря беоцитом подвижности.

Б. Цикл развития цианобактерий рода *Chroococidiopsis*: 1 — увеличение объема беоцита до размеров вегетативной клетки; 2 — серия бинарных делений больше чем в одной плоскости; 3 — множественное деление части клеток колонии; 4 — освобожденные неподвижные беоциты.

Подвижные беоциты, у которых отсутствует дополнительный фибриллярный слой клеточной стенки, обведены сплошной тонкой линией; неподвижные беоциты, синтезирующие дополнительный слой клеточной стенки, обведены сплошной жирной линией.

ны. Характерно, что скользящее движение свойственно цианобактериям, не образующим чехла или со слабым развитием последнего. К этой же группе относятся цианобактерии, имеющие подвижные спиралевидные трихомы, состоящие из клеток разной формы, не окруженные чехлом (*Spirulina*) и ряд других культур, дальнейшее изучение которых позволит выяснить, принадлежат ли они к одной или разным таксономическим группам. Краткая характеристика выделенных родов цианобактерий этой группы представлена в табл. 34.

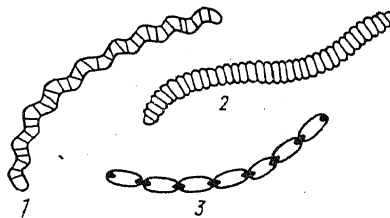


Рис. 89. Схематическое изображение цианобактерий, включенных в III группу:
1 — *Spirulina*; 2 — *Oscillatoria*; 3 — *Pseudoanabaena*

Таблица 34

Характеристика родов цианобактерий, включенных в состав III группы

Род	Краткая характеристика
<i>Oscillatoria</i>	Трихом прямой, подвижный, не окруженный чехлом. Клетки дисковидные, не разделенные перетяжкой. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 40—50%; величина генома — 2,5—4,4 · 10 ⁹ Д
<i>Pseudoanabaena</i>	Трихом прямой, подвижный, не окруженный чехлом. Клетки нити цилиндрические с закругленными концами; содержат у обоих концов газовые вакуоли; разделены глубокой перетяжкой. Молярное содержание ГЦ-оснований — 44—52%; величина генома — 2,1—3,8 · 10 ⁹ Д
<i>Spirulina</i>	Трихом спиралевидный, подвижный, не окруженный чехлом. Форма клеток непостоянная. Клетки не разделены перетяжкой. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 44—53%; величина генома — 2,5 · 10 ⁹ Д

Дальнейший шаг по пути морфологического усложнения сделан цианобактериями, отнесенными к IV группе. Они представлены одноклеточными неветвящимися нитями, рост которых происходит путем интеркалярного деления клеток в одной плоскости (под прямым углом к длинной оси трихома). При культивировании на среде без связанного азота некоторые вегетативные клетки дифференцируются в гетероцисты — центры азотфиксации в аэробных условиях. Ряд представителей группы образует акинеты — единственный тип покоящихся форм у цианобактерий. Размножение происходит короткими обрывками трихомов, морфологически не отличающимися от зрелых длинных нитей, и в результате прорастания акинет, если последние образуются (*Anabaena*, *Nodularia*, *Cylindrospermum*). У некоторых цианобактерий в дополнение к описанным выше способам размножения для этой цели служат гормогонии (*Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*). Последние представляют собой короткие нити, отличающиеся рядом морфологических признаков от родительского трихома: они состоят из небольшого числа мелких активно движущихся вегетативных клеток, иногда иной формы, чем клетки родительского трихома; могут содержать газовые вакуоли; никогда не окружены чехлом. Основное отличие гормогониев от зрелых и молодых трихомов — отсутствие гетероцист, даже если культура находится в среде, не содержащей связанного азота.

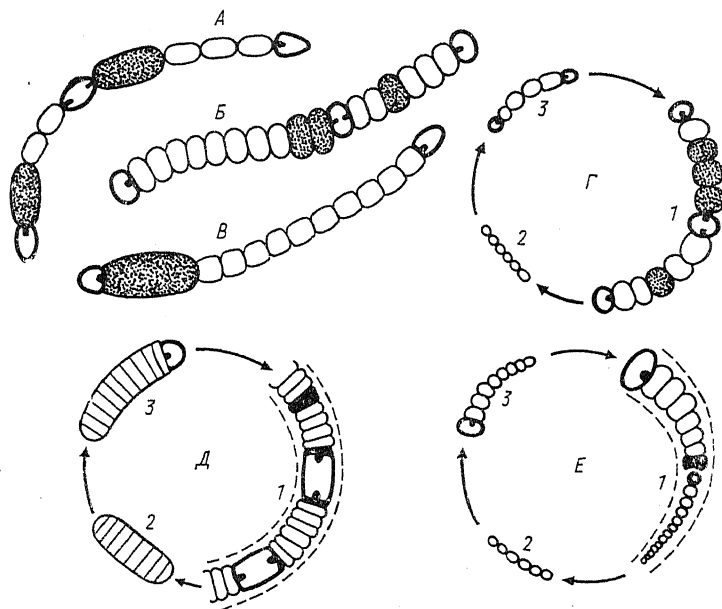


Рис. 90. Цианобактерии, отнесенные к IV группе:
 А — *Anabaena*; Б — *Nodularia*; В — *Cylandrospermum*; Г — *Nostoc*; Д — *Scytonema*; Е — *Calothrix*: 1 — трихом в зрелом состоянии; 2 — гормогоний; 3 — молодой трихом.
 Гетероцисты изображены в виде клеток с толстой клеточной стенкой и полярными гранулами; акинеты — в виде темных клеток. Прерывистой линией вдоль трихома обозначен чехол

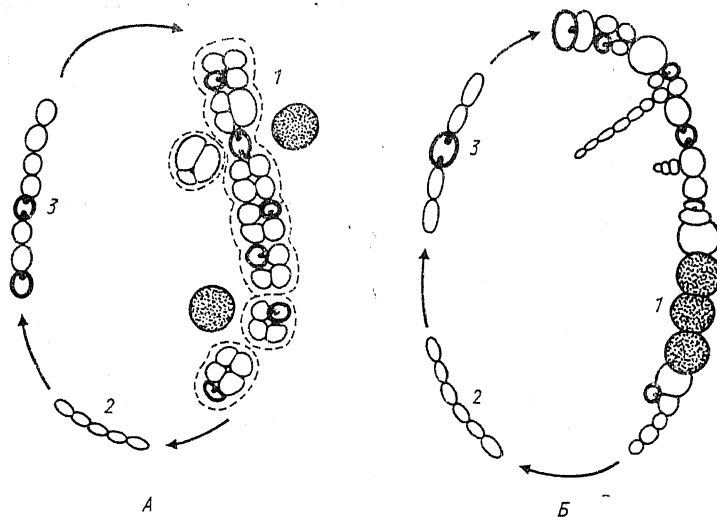


Рис. 91. Схематическое изображение родов цианобактерий V группы.
 А — *Chlorogloeopsis*; Б — *Fischerella*: 1 — зрелый трихом; 2 — гормогоний; 3 — молодой трихом. Обозначение гетероцист, акинет и чехла см. рис. 90

Для выделения отдельных родов использованы такие признаки, как расположение гетероцист и акинет в нити, форма вегетативных клеток. В частности, трихом цианобактерий рода *Calothrix* образован

Характеристика родов цианобактерий, включенных в состав IV группы

Род	Краткая характеристика
<i>Anabaena</i>	Размножение прорастанием акинет и обрывками трихомов, не отличающихся морфологически от родительских. Vegetативные клетки сферической, яйцевидной или цилиндрической формы. Расположение гетероцист интеркалярное (между вегетативными клетками нити) или терминальное (на конце нити). Положение акинет в нити различное. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 38—44%; величина генома — $3,2-3,9 \cdot 10^9$ Д
<i>Nodularia</i>	Характеризуется теми же морфологическими признаками, что и представители рода <i>Anabaena</i> . Отличительная особенность — вегетативные клетки дискообразной формы. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 41%; величина генома — $3,3 \cdot 10^9$ Д
<i>Cylindrospermum</i>	Размножение прорастанием акинет и обрывками трихомов. Расположение гетероцист только терминальное: на обоих концах трихома. Акинеты всегда примыкают к гетероцистам. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 42—47%; величина генома — $5,7-6,1 \cdot 10^9$ Д
<i>Nostoc</i>	Размножение обрывками трихомов, прорастанием акинет, а также с помощью гормогониев. Последние дают начало молодым трихомам, на обоих концах которых расположены гетероцисты. В зрелых трихомах гетероцисты могут возникать интеркалярно. Акинеты (иногда по несколько сразу) образуются приблизительно посередине фрагмента трихома между гетероцистами. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 39—46%; величина генома — $4,0-6,2 \cdot 10^9$ Д
<i>Scytonema</i>	Размножение обрывками трихомов, с помощью акинет и гормогониев. Последние дают начало молодым трихомам, на одном конце которых развивается терминальная гетероциста. В зрелых трихомах, окруженных развитым чехлом, гетероцисты расположены преимущественно интеркалярно. Вегетативные клетки в трихоме дисковидные, сферические или цилиндрические, одинаковой ширины. Характерна склонность к ложному ветвлению. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 44%; величина генома — $7,4 \cdot 10^9$ Д
<i>Calothrix</i>	Основное отличие представителей этого рода от предыдущего в формировании асимметричных трихомов, содержащих дисковидные, сферические или цилиндрические клетки разной ширины. Молодые и зрелые трихомы суживаются от основания, несущего терминальную гетероцисту, к вершине. Гормогонии состоят из вегетативных клеток одинаковой формы и размеров. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 40—44%; величина генома — $5,1-8,6 \cdot 10^9$ Д

клетками разной ширины, т. е. имеет асимметричное строение. Основные представители IV группы цианобактерий схематически изображены на рис. 90, а их краткая характеристика дана в табл. 35.

В V группе объединены цианобактерии, отличающиеся от представителей IV группы одним существенным признаком: способностью вегетативных клеток зрелого трихома к интеркалярному делению более чем в одной плоскости. К этой группе отнесены два рода, различающихся картинами развития, расположением гетероцист в молодых трихомах и некоторыми другими признаками (рис. 91; табл. 36).

Строение клетки. Электронно-микроскопическое изучение вегетативных клеток цианобактерий обнаружило принципиальное сходство

Характеристика родов цианобактерий V группы

Род	Краткая характеристика
<i>Chlorogloeopsis</i>	Однорядные гормогонии состоят из мелких цилиндрических клеток, которые, увеличиваясь в размерах, превращаются в сферические. Гетероцисты в молодом трихоме расположены интеркалярно и терминально. Вегетативные клетки в зрелом трихоме делятся более чем в одной плоскости, что приводит к возникновению клеточных скоплений неправильной формы, содержащих в основном терминальные и латеральные гетероцисты (латеральные гетероцисты образуются из вегетативных клеток, возникших в результате деления в плоскости, параллельной длинной оси трихома). Быстрое деление некоторых клеток зрелого трихома в одной плоскости дает начало гормогониям. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 42—43%; величина генома — $4,2-5,2 \cdot 10^9$ Д
<i>Fischerella</i>	Гормогонии состоят из мелких цилиндрических клеток, увеличение размеров которых дает начало молодому трихому, содержащему интеркалярные гетероцисты. Некоторые клетки зрелого трихома делятся более чем в одной плоскости, что приводит к возникновению частично многорядного трихома с боковыми однорядными ветвями. Гетероцисты в зрелых трихомах расположены преимущественно терминально и латерально. Гормогонии формируются на конце трихома или из боковых ветвей. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК — 42—46%; величина генома — $3,6-4,7 \cdot 10^9$ Д

их строения с клетками грамотрицательных бактерий. К ЦПМ примыкает клеточная стенка, состоящая из пептидогликанового слоя и трехслойной наружной мембраны. Часто клетки окружены чехлом, участвующим в образовании одноклеточными цианобактериями скоплений разной формы. У нитчатых форм чехол окружает трихом и относится в большей степени к трихоми в целом, чем к отдельным клеткам. Некоторые цианобактерии синтезируют дополнительный слой клеточной стенки, примыкающий извне к наружной мембране (цианобактерии II группы, размножающиеся множественным делением).

В цитоплазме локализован генетический аппарат, внутрицитоплазматические мембраны и многочисленные включения. Хромосомная ДНК находится в виде комплекса с гистоноподобным белком и РНК. Такая организация ДНК была ранее обнаружена у *Escherichia coli* и, возможно, характерна для всех прокариот. Помимо хромосомы у цианобактерий ДНК содержится также в плазидах, имеющих молекулярную массу от 3 до $80 \cdot 10^6$ Д. В одной клетке может быть несколько плазмид разного нуклеотидного состава, генетические функции которых пока неизвестны.

Более чем у 200 чистых культур цианобактерий определен состав оснований хромосомной ДНК. По этому признаку цианобактерии обнаруживают гетерогенность (молярное содержание ГЦ-оснований в ДНК от 35 до 71%), сравнимую только с остальными прокариотами (25—75%). Анализ нуклеотидного состава ДНК разных групп выявил наибольший диапазон значений ГЦ-показателя для цианобактерий, включенных в I (35—71%) и III (40—67%) группы. У остальных групп он достаточно узок (38—47%), хотя цианобактерии, входящие в их состав, значительно различаются морфологическими признаками. Это указывает на отсутствие у цианобактерий II, IV, V групп видимой связи между нуклеотидным составом ДНК и их структурно-функциональными особенностями и, как следствие, на неинформативность этого признака для последующей классификации цианобактерий этих групп.

В то же время у одноклеточных цианобактерий, входящих в состав I группы, ГЦ-показатель может быть использован для последующей классификации (см. табл. 32).

В качестве одной из примечательных особенностей генетического материала цианобактерий отмечают значительные различия величины цианобактериальной хромосомы, т. е. объема заключенной в ней информации. Размеры геномов, изученные более чем у 100 штаммов из разных групп, располагаются в диапазоне $1,6—8,6 \cdot 10^9$ Д, при этом просматривается определенная корреляция между степенью морфологической сложности и величиной генома. Размеры геномов большинства одноклеточных цианобактерий I группы лежат в области $1,6—2,7 \cdot 10^9$ Д, что сходно с таковыми большинства прокариот ($1—3,6 \cdot 10^9$ Д). Геномы цианобактерий остальных четырех групп имеют большую величину (см. табл. 33—36), в целом коррелирующую со степенью их морфологической сложности и достигающую максимальных значений в группе гетероцистных цианобактерий со сложной организацией трихомов и циклами развития. В группе цианобактерий сформирован самый крупный геном, обнаруженный до сих пор у прокариот. В то же время некоторые цианобактерии в отношении морфологической сложности также достигли вершины в мире прокариот и не имеют равных среди других граммотрицательных бактерий.

Высказывается предположение, что эволюция генома цианобактерий происходила в результате удвоения (дупликации) некоего предкового генома, и характерная для большинства из них сложная морфологическая организация, требующая нового генетического материала для своего кодирования, могла возникнуть на базе появляющейся таким путем избыточной ДНК. В отношении связи между морфологией и величиной генома цианобактерий для такой гипотезы есть определенные основания. В то же время вопрос о корреляции между физиолого-биохимическими свойствами этих организмов и объемом заключенной в них генетической информации остается открытым.

Клетки цианобактерий, за исключением принадлежащих к роду *Gloeobacter*, характеризуются развитой системой внутрицитоплазматических мембран (тилакоидов), в которых локализованы компоненты фотосинтетического аппарата (реакционные центры и электронтранспортные цепи). Единственная энергопреобразующая мембрана *Gloeobacter* — цитоплазматическая, где локализованы процессы фотосинтеза и дыхания. Вопрос о структурно-функциональной дифференциации цитоплазматической и тилакоидных мембран у цианобактерий не выяснен.

К числу особенностей строения цианобактериальной клетки относится наличие фикобилисом. В цитоплазме много включений, типичных для клеток прокариот. Уникально для цианобактерий запасание азота и, возможно, энергии в форме полипептида цианофичина.

Физиологические особенности. Большой интерес представляет группа цианобактерий с точки зрения сосредоточения в ней разнообразных физиологических возможностей.

В недрах этой группы, вероятно, сформировался и в целом оформился тот тип энергетики, который потом стал одним из двух господствующих способов получения энергии у высших организмов. Это фотосинтез, основанный на функционировании двух фотосистем, характеризующийся использованием H_2O в качестве донора электронов и сопровождающийся выделением молекулярного кислорода. Образующиеся в процессе фотосинтеза АТФ и НАДФ· H_2 используются далее в темновых реакциях для фиксации CO_2

в цикле Кальвина. В качестве первого стабильного продукта этого цикла идентифицирован гликоген. Помимо этого пути у цианобактерий обнаружена активность фосфоенолпируваткарбоксилазы (ФЕП-карбоксилазы), что позволяет предполагать включение CO_2 путем карбоксилирования фосфоенолпировиноградной кислоты. Вклад этого пути ассимиляции CO_2 на фоне активно функционирующего цикла Кальвина может составлять всего несколько процентов, но в условиях, когда активность рибулозодифосфаткарбоксилазы подавлена, значение фиксации CO_2 в реакции карбоксилирования фосфоенолпирувата возрастает. Образующиеся при этом C_4 -соединения используются для синтеза определенных клеточных метаболитов: аминокислот, тетрапиролов.

С помощью ингибитора дихлорофенилдиметилмочевины (ДХММ) оказалось возможным у ряда цианобактерий отключить II фотосистему при сохранении активности I фотосистемы (см. рис. 80, В). В этих условиях функционирование фотосинтетического аппарата претерпевает определенные изменения: 1) фотосинтез становится бескислородным; 2) возникает потребность в экзогенных донорах электронов; 3) так как поток электронов между двумя фотосистемами прерывается, синтез АТФ сопряжен только с циклическим электронным транспортом, связанным с I фотосистемой. В качестве экзогенных доноров электронов цианобактерии могут использовать некоторые восстановленные соединения серы (H_2S , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), молекулярный водород, ряд органических соединений (сахара, кислоты). Предполагают, что процесс бескислородного фотосинтеза у цианобактерий может протекать несколькими путями: 1. Первая фотосистема индуцирует как циклический, так и нециклический транспорт электронов. Вследствие функционирования обоих электронных потоков фотохимическим путем образуются АТФ и НАДФ· H_2 , используемые для ассимиляции CO_2 в цикле Кальвина. В этом случае процесс бескислородного фотосинтеза цианобактерий сходен с таковым зеленых бактерий (см. рис. 80, Б). 2. Функция I фотосистемы сводится к получению клеточной энергии в процессе циклического фотофосфорилирования. Восстановитель образуется в темновых реакциях. Этот вариант наиболее близок к схеме фотосинтеза, осуществляемого пурпурными бактериями (см. рис. 80, А).

В настоящее время способность к бескислородному фотосинтезу обнаружена у многих цианобактерий из разных групп, но активность фиксации CO_2 за счет этого процесса низка, составляя, как правило, несколько процентов от скорости ассимиляции CO_2 в условиях функционирования обеих фотосистем. Только некоторые цианобактерии могут расти за счет бескислородного фотосинтеза, например *Oscillatoria limnetica*, выделенная из озера с высоким содержанием сероводорода, термофильный штамм *Spirulina*, компонент микрофлоры термального сероводородного источника.

Благоприятное влияние на рост цианобактерий восстановительных условий, создающихся в результате присутствия в среде H_2S , было отмечено еще в 30-х гг. нашего века. Позднее способность ряда цианобактерий расти фотоавтотрофно при высоких концентрациях сульфида наблюдали как в природных условиях, так и в лаборатории. Однако механизм осуществляемого при этом фотосинтеза был не известен. Способность цианобактерий к бескислородному фотосинтезу, зависящему только от активности I фотосистемы, была экспериментально показана в 1975 г. при изучении культуры *O. limnetica*, выделенной из водоема, где она активно растет в анаэробной зоне с максимальной для этого водоема концентрацией сульфида.

Как и все цианобактерии, *O. limnetica* может расти за счет кислородного фотосинтеза. Помещение культуры в условия с 4 мМ H_2S приводит к полному ингибированию II фотосистемы и немедленному прекращению ассимиляции CO_2 . После неко-

того периода ассимиляция CO_2 возобновляется, но теперь этот процесс оказывается стехиометрически сопряженным с окислением H_2S до молекулярной серы, откладывающейся вне трихома. Процесс нечувствителен к действию ингибитора II фотосистемы, поэтому не может быть объяснен восстановлением ее активности.

Было выяснено, что сульфид оказывает двойное действие на метаболизм *O. limnetica*: одно из них заключается в немедленном ингибировании II фотосистемы, другое — в последующей индукции ферментной системы, катализирующей окисление H_2S .

Обнаружение у цианобактерий факультативного бескислородного типа фотосинтеза позволяет ликвидировать «разрыв», существующий между фотосинтезом пурпурных и зеленых бактерий и кислородным фотосинтезом цианобактерий, прохлорофит и эукариотных организмов. Способность цианобактерий переключаться при изменении условий с одного типа фотосинтеза на другой служит иллюстрацией гибкости их светового метаболизма, имеющей важное экологическое значение.)

Хотя подавляющее большинство цианобактерий могут расти, используя только энергию света, т. е. являются облигатными фототрофами, в природе они часто находятся длительное время в условиях темноты. В темноте у цианобактерий обнаружен активный эндогенный метаболизм, энергетическим субстратом которого служит запасенный на свету гликоген. В качестве основного пути катаболизирования последнего идентифицирован окислительный пентозофосфатный цикл, обеспечивающий полное окисление молекулы глюкозы. На двух этапах этого пути с НАДФ-зависимых дегидрогеназ водород (электроны) поступает в дыхательную цепь. Транспорт электронов на конечный акцептор — молекулярный кислород, сопровождающийся на определенных этапах переносом протонов через мембрану, сопряжен с окислительным фосфорилированием. Синтезируемые в этом процессе молекулы АТФ используются для поддержания в темноте жизнедеятельности облигатно фототрофных цианобактерий.

O. limnetica — цианобактерия, способная к активному фотосинтезу бескислородного типа, оказалась также способной в анаэробных темновых условиях при наличии в среде серы осуществлять перенос электронов на молекулярную серу, восстанавливая ее до сульфида. Полное окисление молекулы глюкозы сопровождается образованием 5—9 молекул сульфида. Таким образом, анаэробное дыхание также может поставлять цианобактериям в темноте энергию. Однако, насколько широко распространена такая способность среди цианобактерий, неизвестно. Не исключено, что она свойственна культурам, осуществляющим бескислородный фотосинтез.

Другой возможный путь получения цианобактериями в темноте энергии — гликолиз. У *O. limnetica* и одного из штаммов *Synechococcus* найдены все ферменты, необходимые для сбраживания глюкозы до молочной кислоты, однако образование последней, а также активности гликолитических ферментов низки. Кроме того, содержание АТФ в клетке в анаэробных условиях резко падает, так что, вероятно, жизнедеятельность цианобактерий только за счет субстратного фосфорилирования поддерживаться не может.

У всех изученных цианобактерий ЦТК из-за отсутствия α -кетоглутаратдегидрогеназы «не замкнут» (рис. 92). В таком виде он не функционирует в качестве пути, ведущего к получению клеткой энергии, а выполняет только биосинтетические функции. Особенности темнового метаболизирования эндогенных источников углерода определяют и отношение цианобактерий к экзогенным органическим соединениям, возможности и пути их использования.

Способность в той или иной степени использовать органические сое-

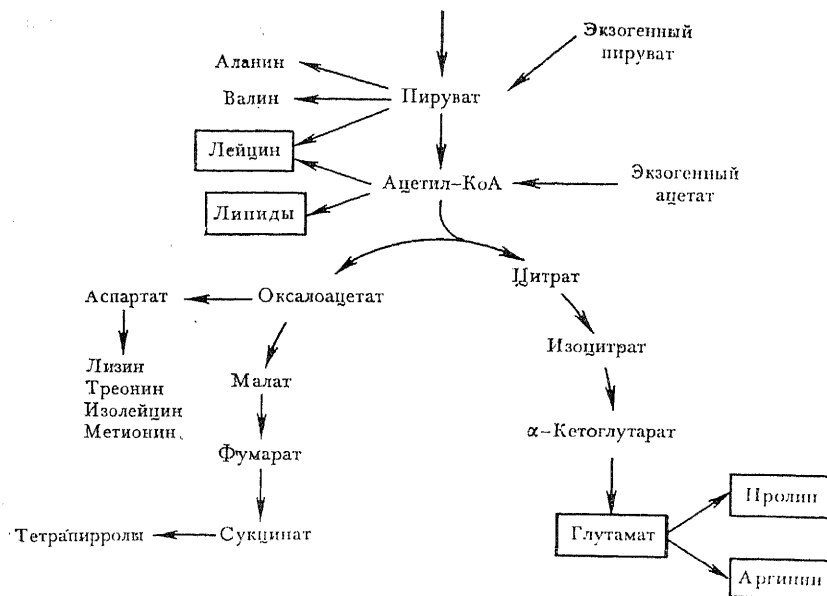


Рис. 92. «Разорванный» ЦТК и пути метаболизирования ацетата и пирувата у цианобактерий. Обведены продукты метаболизирования экзогенного ацетата

динения для биосинтетических целей присуща всем цианобактериям, но только некоторые сахара могут обеспечивать синтез всех клеточных компонентов, являясь единственным или только дополнительным к CO_2 источником углерода. В соответствии с особенностями конструктивного метаболизма у цианобактерий отмечают способность к фотогетеротрофии (все клеточные потребности в источнике углерода удовлетворяются за счет органического углерода) или облигатную привязанность к фотоавтотрофии (основным источником углерода, обеспечивающим рост цианобактерий, служит CO_2)⁹. В природных условиях часто цианобактерии осуществляют конструктивный метаболизм смешанного (миксотрофного) типа.

Цианобактерии могут ассимилировать некоторые органические кислоты, в первую очередь ацетат и пируват, но всегда только в качестве дополнительного источника углерода. Метаболизирование их связано с функционированием «разорванного» ЦТК и приводит к включению в весьма ограниченное число клеточных компонентов (рис. 92). Опыты с ^{14}C -ацетатом обнаружили накопление радиоактивного углерода только в липидах и четырех аминокислотах: лейцине, глутаминовой кислоте, пролине и аргинине. Отсутствие радиоактивности в аминокислотах семейства аспарагиновой кислоты иллюстрирует «разорванность» ЦТК.

Некоторые цианобактерии способны к хемогетеротрофному росту. Набор органических веществ, поддерживающих хемогетеротрофный рост, ограничен несколькими сахарами, включающими глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу и некоторые другие. Это связывают с функ-

⁹ Способность к фотогетеротрофии определяется выращиванием цианобактерий на свету в среде с источником органического углерода в присутствии 10^{-5} М ДХММ, полностью блокирующей активность II фотосистемы и, следовательно, возможность фиксировать CO_2 .

ционированием у цианобактерий в качестве основного катаболического пути окислительного пентозофосфатного цикла, исходным субстратом которого служит глюкоза. Поэтому только последняя или сахара, ферментативно легко превращаемые в глюкозу, могут метаболизироваться по этому пути. Другие возможные пути превращения экзогенных сахаров и их вклад в обеспечение клеток в темноте энергией аналогичны разобранным выше при изложении катаболизма эндогенного гликогена.

Одна из загадок метаболизма цианобактерий — неспособность большинства из них расти в темноте с использованием органических соединений. Невозможность роста за счет субстратов, метаболизируемых в ЦТК, связана с «разорванностью» этого цикла. Но основной путь катаболизма глюкозы — окислительный пентозофосфатный цикл — функционирует у всех изученных цианобактерий. В качестве причин, обуславливающих облигатно фотоавтотрофную природу метаболизма большинства цианобактерий, называют неактивность систем транспорта экзогенных сахаров в клетку, а также низкую скорость синтеза АТФ, сопряженного с дыхательным электронным транспортом, вследствие чего количество вырабатываемой в темноте энергии достаточно только для поддержания клеточной жизнедеятельности, но не роста культуры. В этой связи примечательно, что хемогетеротрофный рост цианобактерий всегда намного медленнее фотогетеротрофного и особенно фотоавтотрофного роста.

Цианобактерии, в группе которых, вероятно, сформировался кислородный фотосинтез, впервые столкнулись с выделением O_2 внутри клетки. Помимо создания разнообразных систем защиты от токсических форм кислорода, проявляющихся в устойчивости к высоким концентрациям O_2 , цианобактерии адаптировались к аэробному способу существования путем использования молекулярного кислорода для получения энергии. Единственным темновым энергетическим процессом, обеспечивающим рост хемогетеротрофных цианобактерий, служит дыхание.

В то же время для ряда цианобактерий показана способность расти на свету в строго анаэробных условиях. Это относится к видам, осуществляющим фотосинтез бескислородного типа, которых в соответствии с принятой классификацией следует отнести к факультативным анаэробам. (Фотосинтез любого типа по своей природе — анаэробный процесс. Это хорошо видно в случае фотосинтеза бескислородного типа и менее очевидно для кислородного фотосинтеза.) Для некоторых цианобактерий показана принципиальная возможность протекания темновых анаэробных процессов (анаэробное дыхание, молочнокислое брожение), однако низкая активность ставит под сомнение их роль в энергетическом метаболизме цианобактерий. Зависимые и не зависящие от O_2 способы получения энергии, обнаруженные в группе цианобактерий, суммированы в табл. 37.

Конструктивный метаболизм цианобактерий представляет собой шаг вперед по пути дальнейшей независимости от органических соединений внешней среды по сравнению с пурпурными и зелеными серобактериями. Для построения всех веществ клетки цианобактериям нужен минимум простых неорганических соединений: углекислота в качестве единственного источника углерода; самые простые формы азота — аммонийные, нитратные соли, молекулярный азот; минеральные соли — источники фосфора, серы, магния, железа, микроэлементов; вода. В отличие от пурпурных и зеленых бактерий цианобактерии не требуют никаких питательных компонентов в восстановленной фор-

Способы получения энергии в группе цианобактерий

Способ получения энергии	Донор электронов	Акцептор электронов	Распространенность и физиологический эффект
Фотосинтез кислородного типа	H ₂ O	НАДФ ⁺ , ферредоксин	обеспечивает рост всех цианобактерий
Фотосинтез бескислородного типа	H ₂ S, Na ₂ S ₂ O ₃ , H ₂ , органические соединения	НАДФ ⁺ , ферредоксин	обеспечивает рост некоторых изученных видов; у большинства — снабжает энергией, необходимой для поддержания жизнедеятельности
Дыхание	НАДФ·H ₂	O ₂	обеспечивает рост факультативно хемогетеротрофных цианобактерий и поддержание жизнедеятельности облигатно фототрофных видов
	H ₂ *	O ₂	может быть связано с получением энергии
Анаэробное дыхание	НАДФ·H ₂	S	поддерживает жизнедеятельность некоторых цианобактерий, способных к бескислородному фотосинтезу
Брожение	эндогенные или экзогенные сахара	пируват	обнаружено у некоторых факультативно анаэробных цианобактерий; активность недостаточна для поддержания жизнедеятельности**

* Разные представители цианобактерий оказались способными использовать в темноте молекулярный водород при наличии в качестве акцептора электронов O₂. Имеются данные в пользу того, что потребление H₂ связано с функционированием дыхательной цепи и может вести к получению энергии.

** Есть только одно сообщение о способности цианобактерий рода *Nostoc* расти в темноте в анаэробных условиях, осуществляя сбраживание некоторых сахаров.

ме. Только некоторые морские виды цианобактерий обнаруживают потребность в витамине B₁₂.

Гетероцисты и азотфиксация в группе цианобактерий. Азотфиксирующая активность выявлена более чем у 250 штаммов, принадлежащих к разным группам фототрофных прокариот. Примерно половину из них составляют цианобактерии. Способность последних к фиксации N₂, определяемая по наличию нитрогеназной активности, зависит от условий, и в первую очередь от содержания в среде связанного азота и молекулярного кислорода. Основное место действия обоих факторов — нитрогеназа. В первом случае источники связанного азота репрессируют синтез и ингибируют активность фермента, во втором — O₂ быстро инактивирует его.

Отрицательное действие O₂ на азотфиксацию связано с восстановительной природой процесса. Возникшая первоначально у анаэробных прокариот, получающих энергию за счет брожения, способность к азотфиксации проявилась и в группах прокариот с бескислородным фотосинтезом. Благоприятные условия для нее обеспечивались анаэробным типом метаболизма этих групп прокариот. И только цианобактерии столкнулись с проблемой функционирования в клетке двух процессов, один из которых имеет восстановительную природу, а дру-

гой сопровождается выделением такого сильного окислителя, как O_2 . Возникла необходимость защиты или изолирования процесса азотфиксации от молекулярного кислорода.

В настоящее время в результате изучения чистых культур стало ясно, что способность к азотфиксации широко распространена среди цианобактерий. Vegetативные клетки многих изученных культур обнаруживают нитрогеназную активность в анаэробных и микроаэробных условиях. Только для единичных культур, например представителей рода *Gloeothese*, показана способность вегетативных клеток к азотфиксации в аэробных условиях. В целом же проблема фиксации N_2 в аэробных условиях значительной частью цианобактерий решена путем формирования дифференцированных клеток определенного типа — гетероцист, в которых чувствительный к молекулярному кислороду аппарат фиксации молекулярного азота отделен от O_2 -выделяющего фотосинтетического аппарата с помощью определенных ультраструктурных и биохимических перестроек. Таким образом, способность подавляющего большинства цианобактерий к азотфиксации в аэробных условиях связана с гетероцистами.

При отсутствии в среде связанного азота некоторые вегетативные клетки (обычно 5—10%) нитчатых цианобактерий, принадлежащих к IV и V группам, превращаются в гетероцисты, образование которых происходит в течение 24 ч параллельно с развитием нитрогеназной активности и может быть разделено на два этапа. Прогетероцисты, формирующиеся на первом этапе, характеризуются неспособностью обеспечить защиту нитрогеназы от инактивирующего действия O_2 , а также тем, что процесс дифференцировки на этой стадии обратим: при внесении в среду аммонийного азота прогетероцисты дедифференцируются и превращаются в вегетативные клетки, способные к делению. На втором этапе процесс дифференцировки становится необратимым. Сформированные гетероцисты не способны к делению и не могут превращаться в вегетативные клетки.

Формирование гетероцист из вегетативных клеток сопровождается глубокими ультраструктурными и функциональными перестройками (рис. 93, А). Зрелые гетероцисты окружены тремя дополнительными слоями, внешними по отношению к клеточной стенке: контактирующим с окружающей средой фибриллярным слоем неизвестной химической природы, срединным гомогенным слоем, состоящим из полисахаридов, и внутренним пластинчатым слоем, построенным из гликолипидов, специфических только для гетероцист. Предполагается, что пластинчатый слой непроницаем для воды, ионов, нейтральных веществ гидрофильной природы, и, возможно, для растворенных газов. Дополнительные слои, окружающие гетероцисту, в местах ее контакта с вегетативной клеткой прерываются. Перегородка, отделяющая гетероцисту от вегетативной клетки, пронизана множеством мелких каналов (микроплазмодесм) не менее 40 нм длиной и около 5 нм диаметром, соединяющих цитоплазмы обеих клеток и обеспечивающих обмен клеточными метаболитами¹⁰.

В цитоплазме гетероцист в зонах контакта с вегетативными клетками располагаются светпреломляющие полярные гранулы. Терминальные гетероцисты содержат одну, а интеркалярные — две полярные гранулы. Они имеют гомогенное строение и, по последним данным, содержат запасной полипептид цианофизин.

¹⁰ Так как предполагают, что гетероциста непроницаема для газов, молекулы N_2 и O_2 поступают в нее через микроплазмодесмы.

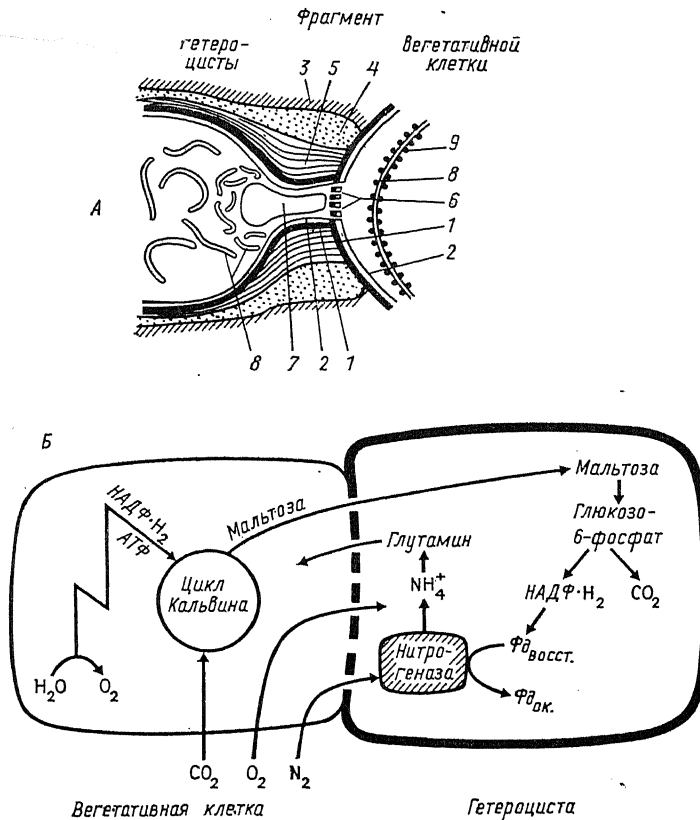


Рис. 93. Схема строения гетероцисты (А) и обмена углеродными и азотными соединениями между гетероцистой и вегетативной клеткой (Б):

1 — клеточная стенка; 2 — ЦПМ; 3 — фибриллярный слой, 4 — однородный слой, 5 — пластинчатый слой оболочки гетероцисты; 6 — микроплазмодесмы; 7 — полярная гранула; 8 — тилакоиды; 9 — фикобилисомы

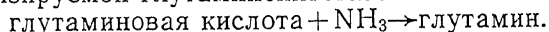
Значительную реорганизацию претерпевает в гетероцистах система фотосинтетических мембран: они укорачиваются, теряют расположение, характерное для вегетативных клеток; как правило, отмечается скопление тилакоидов вблизи полюсов гетероцисты. Морфологические изменения тилакоидов сочетаются с важными перестройками фотосинтетического аппарата на функциональном уровне. В гетероцистах не работает II фотосистема, с активностью которой связано разложение воды, сопровождающееся выделением O_2 . Следовательно, внутриклеточный O_2 в них не образуется. Потеря активности II фотосистемы коррелирует со следующими биохимическими особенностями гетероцист: 1) отсутствием основных светособирающих пигментов II фотосистемы — фикобилипротеидов и содержащих их структур — фикобилисом; 2) резко пониженным содержанием ионов марганца, необходимого компонента системы разложения воды; 3) потерей гетероцистами способности фиксировать CO_2 , связанной с отсутствием рибулозодифосфаткарбоксилазы в растворимой форме или в виде карбоксисом. Деградация II фотосистемы сопровождается сохранением активности I фотосистемы, что находит отражение в поддержании значительного уровня основного светособирающего пигмента (хлоро-

филла *a*) и увеличении числа реакционных центров (хлорофилл P_{700}) этой фотосистемы.

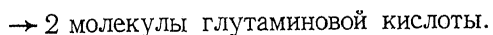
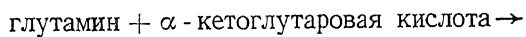
В процессе формирования гетероцист наблюдается исчезновение различных цитоплазматических включений, характерных для вегетативных клеток цианобактерий: гликогеновых, полифосфатных, цианофициновых гранул. Нерешенным остается вопрос о наличии в зрелых гетероцистах нуклеоида. Отсутствие способности к размножению и дедифференцировке ставит вопрос о содержании в зрелых гетероцистах генетического аппарата и соответственно возможности у них процессов транскрипции и трансляции. Если генетический материал в зрелых гетероцистах претерпевает глубокую деструкцию, именно с этим может быть связан относительно короткий период их жизни, определяемый скоростью распада имеющегося набора ферментов. До сих пор удалось показать, что содержание ДНК в гетероцистах значительно меньше, чем в вегетативных клетках.

Для фиксации N_2 необходим восстановитель в виде молекул восстановленного ферредоксина (иногда НАДФ· H_2) и химическая энергия в форме АТФ. Из-за отсутствия в гетероцистах нециклического транспорта электронов они не могут обеспечивать процесс азотфиксации фотохимически образованным восстановителем и зависят в этом отношении от межклеточного переноса метаболитов (рис. 93, *B*). Восстановитель может или непосредственно транспортироваться из соседних вегетативных клеток в готовом виде, или же генерироваться в гетероцистах в темновых ферментативных процессах из исходного транспортируемого субстрата. В последнем случае таким субстратом служит дисахарид мальтоза — продукт цикла Кальвина. Ее катаболизирование, осуществляемое по активно функционирующему в гетероцистах окислительному пентозофосфатному пути, приводит к образованию молекул НАДФ· H_2 , с которых водород может передаваться на ферредоксин в реакции, катализируемой ферредоксин: НАДФ-оксидоредуктазой. Источником АТФ в гетероцистах на свету служит зависимое от I фотосистемы циклическое фотофосфорилирование, в темноте — окислительное фосфорилирование.

Нитрогеназная система катализирует восстановление N_2 до аммиака. Последний включается в молекулу глутаминовой кислоты в реакции, катализируемой глутаминсинтетазой:



В таком виде фиксированный азот транспортируется из гетероцист в вегетативные клетки, где с помощью глутамин-кетоглутарат амидотрансферазы осуществляется перенос NH_2 -группы на молекулу α -кетоглутарата:



Одна из молекул глутамата возвращается в гетероцисту для очередного акцептирования NH_3 , другая поступает в метаболизм вегетативной клетки. В целом в отношении азотного метаболизма зрелые гетероцисты отличаются от вегетативных клеток активной нитрогеназой, высоким уровнем глутаминсинтетазы и низким уровнем глутамин-кетоглутарат амидотрансферазы.

Таким образом, все структурные и функциональные перестройки, происходящие в процессе формирования гетероцист, направлены на поддержание высокой активности нитрогеназы, что достигается, с одной стороны, путем эффективного ее снабжения восстановителем и энергией, с другой — защитой от молекулярного кислорода за счет

уменьшения проникновения O_2 через утолщенные оболочки гетероцист, реорганизации их фотосинтетического аппарата и высокой активности дыхания.

Прохлорофиты

В 1975 г. Р. А. Левиным (R. A. Lewin) описаны одноклеточные симбиотические организмы, названные прохлорофитами¹¹, имеющие прокариотное строение клетки, осуществляющие фотосинтез кислородного типа, но отличающиеся от цианобактерий составом пигментов и внутриклеточной организацией фотосинтетических мембран, что послужило основанием для выделения этих организмов в отдельный порядок Prochlorales наряду с Cyanobacteriales в рамках подкласса Oxyphotobacteria (см. табл. 27). Прохлорофиты — внеклеточные симбионты (экзосимбионты), обитающие на поверхности тела морских животных — колониальных асцидий¹².

В настоящее время прохлорофиты представлены одним родом *Prochloron*. Отсутствие чистых культур задерживает изучение этих организмов. И хотя штаммы, обитающие в ассоциациях с разными видами и родами асцидий, морфологически различаются, имеющихся данных недостаточно для более детальной классификации прохлорофит. Все известные культуры, объединенные в один вид *P. didemni*, — одноклеточные; клетки неподвижные, сферической формы, диаметром от 6 до 25 мкм. Размножаются бинарным делением. Клеточная стенка грамотрицательного типа, содержит пептидогликан; снаружи окружена тонким слоем материала полисахаридной природы, с помощью которого клетки, вероятно, прикреплены к телу хозяина. Нити ДНК, не отграниченные от цитоплазмы мембраной, располагаются в центральной области клетки.

Большую часть цитоплазмы занимают тилакоиды, располагающиеся обычно концентрическими кругами по периферии клетки. Тилакоиды, как и у цианобактерий, лежат в цитоплазме «свободно», т. е. не отделены от нее замкнутой мембраной, и имеют тенденцию сближаться, образуя пары или стопки, состоящие из трех и более тилакоидов. Внутренние и наружные поверхности тилакоидных мембран гладкие. Фикобилисомы и фикобилипротеиды не обнаружены.

Фотосинтетические пигменты представлены хлорофиллами *a* и *b* и каротиноидами. Основную массу последних составляют β -каротин (приблизительно 70% от суммы каротиноидов) и ксантофилл, близкий к зеаксантину (около 25%). Обнаружено также несколько каротиноидов в незначительных количествах, среди которых идентифицированы эхиненон, β -криптоксантин, изокриптоксантин и др. Все эти кароти-

¹¹ В названии, предложенном Р. А. Левиным, отражено представление об этих организмах как о возможных предшественниках эукариотных зеленых водорослей (Chlorophyta), произошедших от подобных прокариот или путем длительного процесса внутриклеточной дифференцировки, или же в результате симбиогенеза. В последнем случае прохлорофиты — предки хлоропластов.

¹² Асцидии относятся к низшим хордовым, классу Ascidiaceae, объединяющему около тысячи одиночных и колониальных видов. Обитают только в морях. Тело асцидий покрыто туникой, имеющей сложное строение. Туника обычно пропитана неорганическими солями. У одних видов асцидий она тонкая, гладкая, полупрозрачная, иногда студенистая или желеобразная, у других — толстая, бугристая. Скопления клеток прохлорофит обнаружены в области ротового или клоакального сифонов или погружены в материал туники.

ноиды найдены и у цианобактерий. По составу стеролов, жирных кислот и гликолипидов прохлорофиты также близки к цианобактериям. В цитоплазме *Prochloron* обнаружены 70S-рибосомные частицы, содержащие РНК 16S- и 23S-типов, аналогичную рибосомальным РНК прокариот и хлоропластов эукариот. Молярное ГЦ-содержание в ДНК — 39—41 %.

Изучение функционирования фотосинтетического аппарата позволило обнаружить активную фиксацию CO_2 , осуществляемую в цикле Кальвина, о чем свидетельствуют активности двух специфических ферментов этого пути: рибулозодифосфаткарбоксилазы и фосфорibuлокиназы. Первый фермент содержится в клетке в растворимой форме и в карбоксисомах и состоит из 8 больших и малых субъединиц, что характерно для рибулозодифосфаткарбоксилазы цианобактерий и зеленых водорослей. Конечным продуктом углеродного метаболизма на свету является полисахарид, схожий с гликогеном цианобактерий. Поли- β -оксимасляная кислота не найдена. В качестве одной из ферментных систем защиты от токсических форм молекулярного кислорода, образующегося внутриклеточно, обнаружена супероксиддисмутаза Fe/Mn-типа, характерная для прокариотных форм. В аэробных условиях предпринимались попытки обнаружить нитрогеназную активность, давшие отрицательный результат. Однако вопрос о способности прохлорофит к азотфиксации нельзя считать решенным, так как в анаэробных условиях подобные опыты не проводили.

Все усилия культивировать прохлорофиты в лабораторных условиях до сих пор не были положительными. Так как колониальные асцидии могут расти без прокариотного симбионта, с их стороны связь с *Prochloron*, вероятно, факультативная. В то же время неудачные попытки культивировать прохлорофиты без хозяина указывают на их облигатную зависимость от асцидий. Прохлорофиты снабжают асцидий растворимыми углеродными продуктами фотосинтеза. Конкретная роль асцидий в этой ассоциации неизвестна. Прохлорофиты обитают на поверхности колоний одних видов асцидий и внутри колоний других видов в субтропических или тропических прибрежных водах Тихого океана, имеющих температуру, редко опускающуюся ниже 20° . Асцидий, содержащих *Prochloron*, находят в затемненных местах (под камнями, в пещерах) и на глубине до 10 м, где освещенность днем обычно меньше 500 лк.

Прохлорофиты привлекают к себе большое внимание в связи с проблемами эволюции фотосинтетического аппарата и возникновения фотосинтезирующих эукариот. Сравнение прохлорофит с цианобактериями и хлоропластами зеленых водорослей и высших растений обнаруживает черты сходства как с фотосинтетическими органеллами эукариот (организация тилакоидов, состав хлорофиллов), так и с цианобактериями (клеточное строение, состав каротиноидов, липидов, стеролов, некоторые особенности метаболизма, последовательность оснований 16S-рибосомной РНК). Для ответа на вопрос, в каком отношении прохлорофиты находятся с цианобактериями (развивались ли независимо и параллельно с цианобактериями, возникли ли из их предшественников, потерявших способность синтезировать фикобилипротеиды, или наоборот цианобактерии возникли из прохлорофит), необходимо дальнейшее сравнительное изучение обеих групп прокариот с фотосинтезом кислородного типа. В настоящее время прохлорофиты рассматриваются в качестве возможных эндосимбионтов, последующая эволюция которых привела к возникновению хлоропластов зеленых водорослей и высших растений.

Галобактерии

Длительное время считали, что без участия хлорофилла фотосинтез невозможен. Способность некоторых экстремально галофильных бактерий осуществлять фотосинтез бесхлорофильного типа была обнаружена в начале 70-х гг. Д. Остерхельтом и В. Стокениусом (D. Oesterhelt, W. Stoeckenius), идентифицировавшими в ЦПМ *Halobacterium halobium* бактериородопсин — белок, ковалентно связанный с каротиноидом, и показавшими способность этого белка к светозависимому переносу протонов через мембрану, приводящему в конечном итоге к синтезу АТФ. Фотофосфорилирование, обнаруженное у галобактерий, — единственный пример превращения энергии света в химическую энергию АТФ без участия электронтранспортной цепи.

Галобактерии распространены там, где есть подходящие для этого условия с высоким содержанием NaCl и других необходимых ионов: в природных соленых водоемах, в бассейнах для выпаривания соли, в белковых материалах, консервируемых с помощью соли (рыба, мясо, шкуры). Могут расти в насыщенном растворе NaCl (около 32%, или 5,2 М); нижний предел концентрации соли для роста составляет 2—2,5 М; оптимальное содержание — между 3,5 и 5 М. Высоки потребности галобактерий и в других ионах: оптимальный уровень Mg^{2+} в среде — 0,1—0,5 М, K^+ — около 0,025 М.

Влияние ионов на галобактерии достаточно специфично. Для поддержания структуры и жесткости клетки требуются ионы Na^+ , Cl^- , Mg^{2+} , влияющие в первую очередь на клеточную стенку и ЦПМ. Основной внутриклеточный ион — K^+ , содержание которого может составлять от 30 до 40% сухого вещества клеток, а градиент между внеклеточной и внутриклеточной концентрациями достигать 1:1000. В клетке K^+ находится в связанном состоянии. Он нужен для сохранения структурной целостности рибосом и для синтеза белка. Наряду с другими ионами K^+ необходим для поддержания активности и стабильности внутриклеточных ферментов.

В восьмом издании Определителя бактерий Берги галобактерии в составе семейства Halobacteriaceae помещены в VII группу, объединяющую грамотрицательные аэробные палочки и кокки. Семейство представлено родами *Halobacterium* и *Halococcus*. Виды рода *Halobacterium* — грамотрицательные палочки (0,6—1×1—6 мкм), неподвижные или передвигающиеся с помощью пучка полярно расположенных жгутиков. Форма клеток зависит от концентрации соли в среде: в оптимальных солевых условиях клетки сохраняют палочковидную форму, при пониженной концентрации появляются плеоморфные формы, а в среде с 1,5 М NaCl клетки становятся сферическими в результате утраты клеточной стенки. Размножение бинарным делением путем образования перетяжки. Спор и других дифференцированных клеток не обнаружено. Клетки многих штаммов содержат газовые вакуоли.

Кокковидные формы (0,6—1,5 мкм диаметром) выделены в род *Halococcus*. Помимо формы галококки отличаются от представителей предыдущего рода большей устойчивостью к низким концентрациям соли в среде (не лизируются даже в воде), положительной окраской по Граму, бинарным делением путем вставания перегородки. В последнее время описаны содержащие бактериородопсин галофильные бактерии, отличающиеся морфологически от представителей родов *Halobacterium* и *Halococcus*.

Необычное строение имеют клеточные стенки галобактерий. В их

составе не обнаружено пептидогликана. ЦПМ снаружи покрыта белковыми частицами диаметром 15—20 нм. Белки, составляющие от 57 до 75% сухого вещества клеточных стенок, имеют кислую природу. Часть белков ковалентно связана с липидами и полисахаридами. Особенно много углеводов обнаружено в клеточной стенке галококков. Для поддержания ригидности клеточной стенки галофилов необходимы ионы натрия, образующие комплексы с белками; при понижении концентрации соли в среде клеточная стенка растворяется.

ЦПМ экстремальных галофилов, имеющая строение, типичное для элементарной мембраны, содержит около $\frac{1}{3}$ липидов и $\frac{2}{3}$ разных белков, включая обычные для бактериальных мембран наборы флавопротеидов и цитохромов. Основная масса липидов экстремальных галофилов отличается от характерных для прокариот липидов тем, что в их молекуле глицерин связан не с остатками жирных кислот, а с C_{20} -спиртом — дигидрофитолом. Фосфолипидные и гликолипидные производные глицеринового диэфира могут в определенных условиях составлять до 80% общего содержания липидов в клетках. Помимо уникальных липидов клеточные мембраны экстремальных галофилов содержат много каротиноидных пигментов (основной — бактериоруберин), обуславливающих окраску колоний от розового до красного цвета, что имеет для галофильных бактерий немаловажное значение как средство защиты против избыточной радиации, поскольку для их мест обитания характерна обычно высокая освещенность.

При недостатке в среде O_2 в ЦПМ галобактерий индуцируется синтез хромопротеида — бактериородопсина, белка, соединенного ковалентной связью с C_{20} -каротиноидом ретиналем (рис. 94, А). Свое название хромопротеид получил из-за сходства с родопсином — зрительным пигментом сетчатки позвоночных. Оба белка содержат в качестве хромофорной группы ретиналь, различаясь строением полипептидной цепи. Бактериородопсин откладывается в виде отдельных пурпурных областей («бляшек») на ЦПМ красного цвета, обусловленного высоким содержанием каротиноидов. При выращивании клеток на свету в условиях недостатка O_2 пурпурные участки могут составлять до 50% поверхности мембраны. В них содержится от 20 до 25% липидов и только один белок — бактериородопсин. При удалении из среды солей клеточная стенка галобактерий растворяется, а ЦПМ распадается на мелкие фрагменты, при этом участки мембраны красного цвета диссоциируют, а пурпурные «бляшки» сохраняются и могут быть получены в виде отдельной фракции.

Генетический материал всех изученных до сих пор галобактерий и галококков представлен в виде основной и сателлитных ДНК. Последние составляют от 11 до 36% всей содержащейся в клетках ДНК

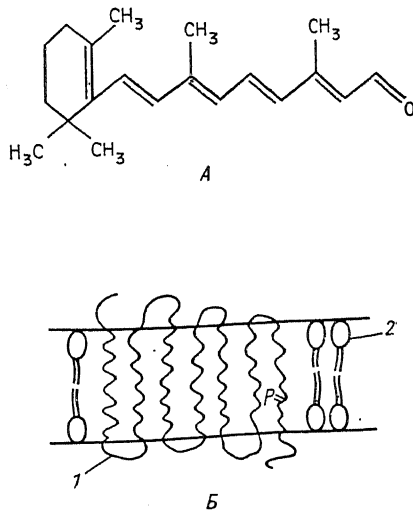


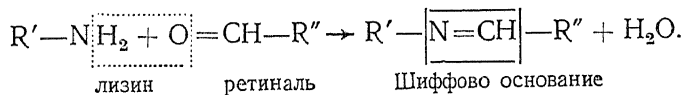
Рис. 94. Ретиналь (А) и предполагаемая организация бактериородопсина в пурпурной мембране (Б): Р — ретиналь; 1 — полипептидная цепь; 2 — липид (по Овчинникову, 1982)

и состоят из нескольких замкнутых кольцевых молекул. Основная и сателлитные ДНК различаются нуклеотидным составом: молярное ГЦ-содержание основной ДНК — порядка 66—68, а сателлитных — 57—60%. Высокий уровень сателлитных ДНК — уникальная черта организации генетического материала экстремальных галофилов, значение которой пока что неясно. Предполагается, что сателлитные ДНК — не эписомы, а составная часть генома экстремальных галофилов.

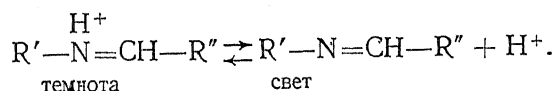
Галобактерии и галококки имеют сложные пищевые потребности. Основным источником энергии и углерода служат аминокислоты. Долгое время считали, что галобактерии не могут использовать углеводы. Недавно описаны экстремально галофильные бактерии, способные потреблять углеводы, на основании этого признака выделенные в отдельный вид *Halobacterium saccharovorum*. Метаболизм глюкозы осуществляется по пути Энтнера — Дудорова.

До недавнего времени все галобактерии относили к облигатным хемоорганотрофам и аэробам, основным источником энергии которых служит процесс дыхания. В ЦПМ галобактерий обнаружены цитохромы *b*, *c*, а также цитохромоксидаза *o*-типа. Электроны в дыхательную цепь поступают с НАД-зависимых дегидрогеназ. Свет рассматривали как дополнительный источник энергии, аппарат для использования которого подключается при недостатке молекулярного кислорода. Данные, полученные за последние годы, внесли некоторые поправки. Выделены штаммы, способные расти анаэробно, используя в качестве конечного донора электронов вместо O_2 нитраты. Для *Halobacterium halobium* в условиях высокого содержания бактериородопсина установлена способность всю энергию получать за счет процесса фотосинтеза. Для роста в фототрофных условиях галобактерии не нуждаются в O_2 .

В основе фотосинтеза бесхлорофильного типа галобактерий лежат светозависимые циклические превращения бактериородопсина. Этот хромопротеид с молекулярной массой меньше 27 000 Д содержит полипептидную цепь, построенную из 248 аминокислотных остатков и на 75% состоящую из α -спиральных участков. Последние образуют 7 тяжелей, ориентированных перпендикулярно плоскости мембраны (рис. 94, Б). Ретиналь расположен параллельно плоскости мембраны и, следовательно, перпендикулярно белковым тяжам. Связь между ретиналем и полипептидной цепью осуществляется через Шиффово основание, образованное в результате взаимодействия альдегидной группы ретиналя с ϵ -аминогруппой 216-го лизинового остатка:



Шиффово основание в темноте находится в протонированной форме. Поглощение кванта света бактериородопсином вызывает изменение конформации ретиналя и приводит к отщеплению H^+ от Шиффова основания:



Бактериородопсин, в молекуле которого Шиффово основание находится в протонированной форме, поглощает свет с длиной волны 570 нм, а в депротонированной — при 412 нм. Протон, отделившийся на свету от Шиффова основания, переходит во внеклеточное пространство, а

H^+ , протонирующий Шиффово основание, поглощается из цитоплазмы. Таким образом, под действием света бактериородопсин «перемещает» протоны с одной стороны мембраны на другую. В результате работы циклического механизма, получившего название бактериородопсиновой протонной помпы, при освещении по разные стороны мембраны возникает градиент концентрации протонов, достигающий 200 мВ, в создании которого участвуют электрический и химический компоненты. Разрядка $\Delta\mu_{H^+}$ с помощью H^+ -АТФазы приводит к синтезу АТФ (рис. 95).

Несмотря на кажущуюся простоту, очевидно, что бактериородопсиновая протонная помпа представляет собой сложную систему. Прежде всего путь, который должен пройти H^+ , чтобы пересечь мембрану, составляет не менее 5 нм, т. е. значительно превышает расстояние, на которое он может быть перенесен при любом конформационном изменении ретиналя. Это означает, что поглощение кванта света должно приводить к возникновению напряженной конформации всего бактериородопсинового комплекса, служащей в дальнейшем источником энергии для переноса H^+ против электрохимического градиента. В организации такого переноса принимают участие ориентированные поперек мембраны α -спиральные тяжи и мембранные липиды, формирующие протонные каналы, природа и механизм действия которых пока не известны.

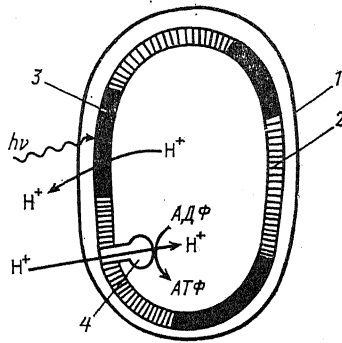


Рис. 95. Схематическое изображение работы бактериородопсиновой протонной помпы: 1 — клеточная стенка; 2 — красная мембрана; 3 — пурпурная мембрана; 4 — H^+ -АТФаза (по Stoeckenius, 1976)

Вопрос о происхождении бесхлорофильного фотосинтеза не ясен. Большинство исследователей считают, что фотосинтез галобактерий — сформированное в «кислородную эпоху» приспособление к существованию в условиях недостатка O_2 . В то же время нельзя полностью исключить возможность сохранения древней формы фотосинтеза, основанного на светозависимых превращениях каротиноидных пигментов. В этой связи примечательно отнесение экстремальных галофилов к группе архебактерий, по мнению ряда исследователей, представляющих собой особую древнюю ветвь эволюции.

Фототрофные прокариоты в природе

Три основных фактора определяют распространение фототрофных прокариот в природе: свет, молекулярный кислород и питательные вещества. Потребности в разных частях солнечного спектра для фотосинтеза определяются набором светособирающих пигментов. Прокариоты с кислородным типом фотосинтеза поглощают свет в том же диапазоне длин волн, что водоросли и высшие растения (см. рис. 75). Пурпурные и зеленые бактерии часто развиваются в водоемах под более или менее плотным поверхностным слоем, состоящим из цианобактерий и водорослей, эффективно поглощающих свет до 750 нм. Фотосинтез пурпурных и зеленых бактерий в этих условиях связан со способностью

бактериохлорофиллов поглощать свет в красной и инфракрасной областях спектра за пределами поглощения хлорофиллов. Крайняя граница этой части спектра определяется способностью бактериохлорофилла *b* некоторых пурпурных бактерий поглощать свет с длиной волны до 1100 нм. Некоторые фотосинтезирующие прокариоты могут расти в водоемах на глубине до 20—30 м, что осуществляется за счет активности другой группы пигментов — каротиноидов. Известно, что различные лучи солнечного спектра поглощаются водой с разной интенсивностью. Глубже всего проникает свет голубой и зеленой частей спектра (450—550 нм), сильнее поглощается ультрафиолет и красный свет. Содержащиеся в клетках некоторых фототрофных прокариот каротиноиды активно поглощают свет с длиной волны в области 460 нм, обеспечивая этим бактериям рост на значительных глубинах, куда проникает только свет этой части спектра.

В отношении к молекулярному кислороду среди фототрофных прокариот на одном полюсе располагаются строгие анаэробы, на другом — организмы, у которых O_2 образуется внутриклеточно. Многие виды — факультативные анаэробы, есть аэротолерантные формы и микроаэрофилы. У фотосинтезирующих прокариот молекулярный кислород часто выступает как могучий фактор, регулирующий их метаболизм: в аэробных условиях у пурпурных, зеленых бактерий и галобактерий репрессируется синтез фотосинтетических пигментов и тем самым уничтожается основа для фототрофного способа существования.

Значительны различия в питательных веществах, необходимых для построения веществ клетки, и донорах электронов. Диапазон — от сложных пищевых потребностей, характерных для галобактерий, до практически минимальных, свойственных цианобактериям¹³. К другим факторам внешней среды, определяющим рост фототрофных прокариот, относятся pH, температура, концентрация солей.

Пурпурные и зеленые серобактерии, характеризующиеся близкими потребностями в факторах среды, часто сосуществуют вместе в освещенных анаэробных водных средах (пресных или соленых), богатых сульфидом. Ими могут быть серные источники с температурой порядка 35—44°, пруды, каналы, болота. Основные места обитания фототрофных серобактерий — пресные озера, где в зависимости от типа водоема бактерии развиваются в виде слоя близко к поверхности или наоборот в придонной зоне. Другим местом обитания пурпурных и зеленых серобактерий служат озера и заливы с морской водой. В открытом море представителей этих групп не обнаружено. Исключение составляет Черное море, где были найдены фототрофные серобактерии.

Пурпурные несерные бактерии имеют свою экологическую нишу. Как правило, они не развиваются в зонах активного роста фототрофных серобактерий. Благоприятные условия для роста несерных пурпурных бактерий, более чувствительных к сульфиду, но менее чувствительных к O_2 , создаются в местах, богатых органическими веществами. Такими местами являются мелкие пресные водоемы с застойной водой (пруды, каналы, озера). Некоторые виды обитают в болотах с pH около 5,5 (*Rhodospseudomonas acidophila*, *Rh. palustris*). Хорошо снабжаемые водой почвы, такие как рисовые поля, также благоприятны для роста несерных пурпурных бактерий. Их находят и в морской воде (заливы, прибрежные зоны), болотах и озерах с высокой кон-

¹³ У прохлорофит пищевые потребности не определены, так как их не удалось культивировать в лаборатории.

центрацией соли, однако массовых скоплений несерные пурпурные бактерии в этих местах не образуют. Наиболее часто встречающийся вид — *Rhodospseudomonas sulfidophila*. У большинства представителей семейства Rhodospirillaceae, обитающих в местах с высокой концентрацией соли, нет в ней абсолютной потребности, поэтому такие формы можно отнести к галотолерантным. Только некоторые штаммы *Rh. sulfidophila*, вероятно, облигатно зависят от соли.

Первый представитель зеленых скользящих бактерий *Chloroflexus aurantiacus* был выделен из термального источника, где рос, формируя пленку толщиной несколько миллиметров. Позднее термофильные штаммы этого вида были найдены во многих нейтральных и щелочных горячих источниках с температурой от 45 до 75°, где условия, как правило, микроаэробные. Часто *Chloroflexus* образует смешанные популяции с термофильными цианобактериями рода *Synechococcus*. Вскоре из придонных слоев пресных озер были выделены мезофильные аналоги *Chloroflexus* с оптимальной температурой роста 20—25°. В планктоне пресноводного озера в анаэробной зоне со слабой освещенностью, не содержащей сульфида, была обнаружена *Chloronema*, отличающаяся от *Chloroflexus* наличием в клетках газовых вакуолей. Из озерного ила, содержащего H₂S, выделен *Oscillochloris*.

В группе цианобактерий достигнуто наибольшее среди фототрофных прокариот приспособление к широкому диапазону внешних условий, обусловившее их почти повсеместное распространение. Эти организмы встречаются во льдах и в горячих источниках с температурой до 70—80°, обитают в пресных водоемах разного типа, в морях и океанах, в почвах и пустынях. В экономическую проблему выросло наблюдаемое в ряде водоемов чрезмерное массовое развитие цианобактерий, поскольку виды, доминирующие в этом процессе, токсичны для беспозвоночных, рыб и домашних животных. Подобные явления описаны для ряда внутренних водоемов нашей страны и других стран мира.

В силу того что цианобактерии максимально не зависят от органических соединений внешней среды, они являются «пионерами жизни»¹⁴, т. е. первыми развиваются там, где жизнь разрушена в результате вмешательства человека или сил природы. Например, в 1883 г. после извержения вулкана Кракатау, расположенного на острове того же названия в Индийском океане, когда все живое было уничтожено на обширной территории, первыми организмами, начавшими рост в этих условиях, были азотфиксирующие цианобактерии.

Некоторые фототрофные прокариоты существуют в ассоциациях с другими организмами. Таковы ассоциации ряда зеленых серобактерий с хемоорганотрофными бактериями, прохлорофит с асцидиями, цианобактерий с грибами, мхами, папоротниками, водорослями, высшими растениями. Если в симбиозах, где один из компонентов — азот-

¹⁴ Учитывая это, некоторые исследователи высказывают предположение, что цианобактерии были первыми организмами, заселившими Землю в те времена, когда на ней возникла жизнь. Это предположение не представляется обоснованным. Независимость цианобактерий от сложных органических веществ внешней среды, их способность строить все вещества тела из CO₂, N₂ и минеральных солей предполагает высокий уровень развития биосинтетических способностей, что обеспечивается функционированием хорошо развитого ферментного аппарата. Этот уровень не может возникнуть без предшествующего ему длительного процесса эволюционных поисков и проб. Поэтому понятие «пионеры жизни» в настоящее время неадекватно этому понятию, когда речь идет о первичном происхождении жизни.

фиксирующие цианобактерии, установлено, что они в первую очередь снабжают партнера связанным азотом, то в других случаях конкретная природа связей между симбионтами не ясна.

Фототрофные прокариоты, особенно цианобактерии, играют значительную роль в круговороте углерода и азота, а серобактерии — и серы. Сделаны определенные шаги на пути практического использования фототрофных прокариот, например применения азотфиксирующих цианобактерий для повышения плодородия рисовых полей, культивирования пурпурных бактерий и цианобактерий в промышленных масштабах для получения кормового белка и перспективного источника энергии — молекулярного водорода.

В научном плане фототрофные прокариоты представляют интерес для изучения механизма фотосинтеза и азотфиксации. На прокариотном уровне сформировался тип фотосинтеза, сопровождающийся выделением в атмосферу молекулярного кислорода. С этого момента начался новый этап в эволюции живых систем, решающим фактором в котором явился молекулярный кислород.

ГЛАВА 11

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КИСЛОРОД КАК ФАКТОР ЭВОЛЮЦИИ

В настоящее время общепринято представление о том, что молекулярный кислород атмосферы имеет биогенное происхождение и его появление непосредственно связано с формированием нового типа фотосинтеза, при котором в качестве донора электронов используется вода. В условиях первобытной Земли до возникновения выделяющих кислород фотосинтезирующих прокариот единственным источником свободного кислорода была реакция фотолиза паров воды в атмосфере, происходящая под действием коротковолнового ультрафиолета. Однако количество «фотолитического» кислорода было ничтожным. Образующийся кислород использовался для окисления газов первобытной атмосферы и восстановленных минералов, входящих в состав земной коры.

Из всех организмов, осуществляющих в настоящее время процесс фотосинтеза с выделением молекулярного кислорода, наиболее примитивно организованными являются цианобактерии, и мы вправе предполагать, что появление молекулярного кислорода связано с этими организмами или с какими-то их весьма близкими предками.

До возникновения фотосинтезирующих эукариот, и в первую очередь высших растений, содержание свободного кислорода в атмосфере Земли было незначительным по сравнению с его содержанием в современной земной атмосфере. Однако, по проведенным подсчетам, для переключения организма с брожения на дыхание достаточна концентрация кислорода 0,2%, т. е. 0,01 его уровня в современной атмосфере. Появление и накопление молекулярного кислорода в земной атмосфере было событием, значение которого для последующей эволюции жизни на Земле трудно переоценить. Прежде всего это означало существенную перестройку всего, что сформировалось на Земле в «докислородную» эпоху, причем в первую очередь это касалось живых организмов.

Образование молекулярного кислорода в возрастающих количествах сделало возможным протекание окислительных реакций в широких масштабах. Изменился характер атмосферы: из восстановительной она стала окислительной. Последнее повлекло за собой существенные изменения в отношении донор-акцепторной проблемы. Если в условиях бескислородной атмосферы доминирующим было решение проблемы акцептора электронов, то в условиях кислородной атмосферы основной становится проблема донора электронов, поскольку с появлением молекулярного кислорода в атмосфере Земли образовался источник превосходного акцептора электронов.

Взаимодействие прокариот с молекулярным кислородом

Первоначально молекулярный кислород появился внутри клетки, и это сразу же создало проблему взаимодействия клетки с O_2 . Оче-

видно, что у первых фотосинтезирующих прокариот, продуцировавших молекулярный кислород, не было ферментных систем не только для выгодного использования этого акцептора, но и для его нейтрализации в клетке. Не было их также и у других существовавших анаэробных форм жизни. Поэтому можно предполагать, что первый тип взаимодействия клетки с молекулярным кислородом базировался на резко отрицательном отношении к нему клетки. Пример этого — многочисленные данные по высокой токсичности молекулярного кислорода на современные облигатно анаэробные организмы¹.

По мере накопления молекулярный кислород становится постоянным компонентом внешней среды, и только локально могут быть созданы такие условия, где он отсутствует или содержится в следовых количествах. Это обусловило два возможных варианта последующего взаимодействия прокариот с молекулярным кислородом. Одни из существовавших анаэробных форм «ушли» в места обитания, где O_2 практически отсутствует, и тем самым сохранили «облик бескислородной эпохи». Другие были вынуждены пойти по пути приспособления к «кислородным» условиям. Это означает, что они формировали новые метаболические реакции, служащие в первую очередь для нейтрализации отрицательного действия молекулярного кислорода.

Итак, следующий шаг на пути взаимодействия прокариот с кислородом — возможность существовать в присутствии O_2 , нейтрализуя его отрицательное действие. Определенное представление о сформировавшихся системах защиты от молекулярного кислорода у прокариот можно получить, изучая представителей этой группы, располагающихся на разных ступенях эволюционной лестницы.

Токсические эффекты молекулярного кислорода и его производных

Как фактор внешней среды O_2 воздействует на современные прокариотные организмы двояко: с одной стороны, он может быть абсолютно необходимым, с другой — с молекулярным кислородом и его производными связаны токсические эффекты для клеток.

Молекулярный кислород (O_2). Существует ряд гипотез, объясняющих чувствительность прокариот к O_2 . Согласно одной из них молекулярный кислород сам является токсическим соединением, агрессивное действие которого связано со способностью окислять клеточные метаболиты, необходимые для функциональной активности в восстановленном состоянии. Токсический эффект O_2 зависит от условий, при которых происходит взаимодействие с ним организмов: концентрации растворенного O_2 , длительности экспозиции, состава окружающей среды.

Токсичность молекулярного кислорода, например, может быть следствием активного акцептирования им электронов с растворимых переносчиков, функционирующих в процессах брожения, что будет приводить к истощению внутриклеточного пула восстановленных доноров электронов, необходимых для биосинтезов. Действительно, было обнаружено, что специфическая активность растворимых флавопротеи-

¹ В этой связи интересны данные, основанные на изучении изотопного состава углерода в ископаемых органических остатках из отложений, образованных в бескислородный период истории Земли. Анализ этих данных позволил сделать вывод, что в период, предшествовавший появлению больших количеств свободного кислорода в атмосфере, прокариотное сообщество было разнообразнее, чем в последующее время. Разнообразие прокариотного сообщества значительно уменьшилось 1,5 млрд. лет назад (см. рис. 55).

дов, способных функционировать как НАД(Ф)·Н₂-оксидазы, повышалась в 5—6 раз при выращивании *Clostridium acetobutylicum* в аэробных условиях сравнительно с анаэробными. Сдвиг под влиянием O₂ электронных переносчиков в сторону их преимущественного нахождения в окисленном состоянии приводил к подавлению роста и изменению выхода продуктов брожения: прекращению синтеза масляной кислоты и накоплению более окисленного продукта — уксусной кислоты.

Наконец, для проявления токсического эффекта молекулярного кислорода вполне достаточно окисления им какого-либо одного ключевого метаболита или фермента, приводящего к его инактивации. Известны три ферментные системы прокариот, особо чувствительные к молекулярному кислороду: нитрогеназа, гидрогеназа и рибулозодифосфаткарбоксилаза.

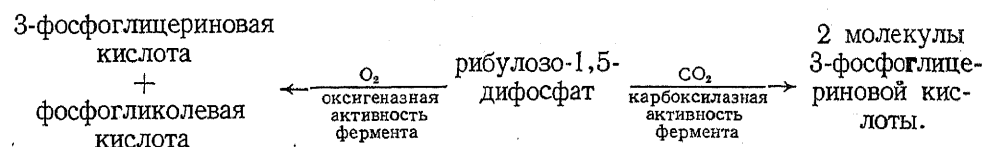
Нитрогеназная система, катализирующая фиксацию молекулярного азота, как известно, состоит из двух металлопротеидов: белка, содержащего железо и молибден (MoFe-белок), и белка, в состав которого входит только железо (Fe-белок). Каждый из белков необходим для проявления каталитической активности. Молекулярный кислород оказывает повреждающее действие на оба белка нитрогеназы, но более чувствителен к O₂ Fe-белок.

Чувствительность белков нитрогеназы к O₂ определяется прежде всего чувствительностью их металлоцентров, которые участвуют как в связывании субстрата, так и в переносе электронов. Поскольку при этом может происходить и ступенчатое восстановление O₂ по одноэлектронному механизму, в качестве продуктов такого восстановления возникают супероксидные ионы, перекись водорода и синглетный кислород, вносящие свой вклад в окислительное повреждение нитрогеназы.

Нитрогеназные белки являются не единственным компонентом азотфиксирующей системы, чувствительным к O₂. Ферредоксины и флаводоксины, донирующие электроны на нитрогеназу, могут автоокисляться и подвергаться необратимым окислительным повреждениям.

Гидрогеназы многих прокариот также обнаруживают высокую чувствительность к молекулярному кислороду, которая *in vitro* в большой мере зависит от метода выделения и степени очистки. Как правило, более устойчивы к O₂ неочищенные ферментные препараты. По сравнению с мембрансвязанным ферментом устойчивость к O₂ гидрогеназы, отделенной от мембраны, обычно ниже. Фермент, полученный из клеток анаэробов, более чувствителен к O₂, чем выделенный из клеток аэробных прокариот.

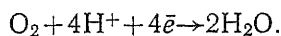
Каталитическая активность рибулозодифосфаткарбоксилазы, фермента, катализирующего фиксацию CO₂ у подавляющего большинства автотрофных прокариот, зависит от парциальных давлений CO₂ и O₂. При высокой концентрации O₂ и низкой — CO₂ преобладает оксигеназная реакция:



Молекулы O₂ и CO₂ конкурируют за каталитический центр фермента. И хотя сам фермент не обнаруживает повышенной чувствительности к молекулярному кислороду и, следовательно, не повреждается при

его высокой концентрации, увеличение O_2 в среде приводит к изменению функционирования рибулозодифосфаткарбоксилазы. Протекание ферментативной реакции по оксигеназному пути приводит к истощению клеточного пула CO_2 -акцептирующих молекул рибулозодифосфата и, как следствие этого, ухудшению работы цикла Кальвина в клетке.

Помимо существования в основной форме в биологических реакциях и под действием различных физико-химических факторов возникают продукты неполного восстановления O_2 , более реакционно способные и обладающие высокой токсичностью для клетки. Как известно, для полного восстановления молекулярного кислорода, приводящего к образованию молекулы воды, требуются 4 электрона:



У большинства прокариот имеются ферменты, катализирующие реакции одновременного переноса 4 электронов на O_2 , при которых не обнаружено каких-либо промежуточных продуктов восстановления O_2 . Это цитохромоксидазы. Возможно, что в этих реакциях и возникают короткоживущие продукты неполного восстановления O_2 , но они остаются связанными с ферментами, не выходят в цитоплазму и практически не наносят вреда клетке.

Супероксидный анион. Если восстановление молекулярного кислорода происходит ступенчато, то при переносе 1 электрона на O_2 образуется надпероксидный (супероксидный) анион:



Последний содержит неспаренный электрон, поэтому является отрицательно заряженным радикалом (анион-радикалом). Он может протонироваться с образованием нейтрального гидропероксидного радикала:



В последнее время признание получила точка зрения, согласно которой основную опасность для организмов представляют продукты, образующиеся при одноэлектронном восстановлении молекулы O_2 , одним из которых является супероксидный анион.

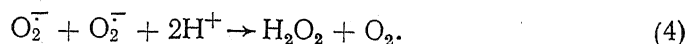
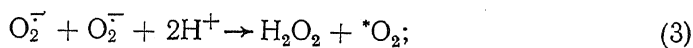
Хотя большинство биологических источников образования O_2^- остается пока неизвестным, уже сейчас можно назвать много биохимических реакций, приводящих к его возникновению. Супероксидные анионы генерируются при взаимодействии с молекулами O_2 различных клеточных компонентов (восстановленные флавины, хиноны, тиолы, FeS-белки), а также в реакциях, катализируемых ксантиноксидазой, альдегидоксидазой, дигидрооротатдегидрогеназой и рядом других флавопротеидных ферментов. Наконец, в процессе фотосинтеза имеет место поток электронов. Большинство реакций фотосинтеза — это реакции одноэлектронного переноса. Поэтому в системе часто возникают супероксидные анионы. Помимо реакций биологической природы O_2^- могут возникать вне клетки в водных растворах при воздействии на них ультразвуком, в результате фотохимических, химических и электрохимических процессов.

Опасность любых реакционно активных соединений в значительной степени зависит от их стабильности. В этом плане ионы O_2^- весьма опасны, так как время их «жизни» в водной среде продолжительнее, чем у остальных O_2 -производных радикалов. Поэтому экзогенно возникшие O_2^- могут проникать в клетку и (наряду с эндогенными)

участвовать в реакциях, приводящих к различным повреждениям в клетке: перекисном окислении ненасыщенных жирных кислот, окислении SH-групп белков, разрушении в них триптофановых остатков, повреждении ДНК, окислении связанных с ферментом молекул НАД·Н₂, деполимеризации кислых полисахаридов.

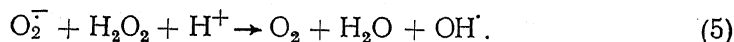
Токсичность супероксидных анионов может увеличиваться за счет вторичных реакций, ведущих к образованию гидроксидных радикалов (ОН·) и синглетного кислорода (*O₂).

Многие прокариоты, относящиеся к разным физиологическим группам, в том числе и строго анаэробные виды, имеют специфическую защиту в виде фермента супероксиддисмутазы, осуществляющего перехват ионов O₂⁻ и катализирующего их дисмутацию. Образующиеся супероксидные анионы дисмутируют в реакции, протекающей спонтанно (3) или катализируемой супероксиддисмутазой (4):

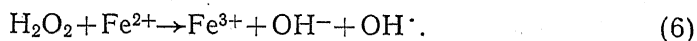


Различия между обеими реакциями в их скоростях (скорость ферментативной реакции приблизительно на четыре порядка выше, чем спонтанной), а также в том, что при спонтанной реакции дисмутации одним из первоначально возникающих продуктов является синглетный кислород, в то время как при ферментативной реакции образующийся кислород находится в основном триплетном состоянии.

Гидроксидный радикал. Супероксид-анион может взаимодействовать с H₂O₂ с образованием гидроксидного радикала (ОН·), превосходящего O₂⁻ по окислительной активности и токсичности:



Источником возникновения ОН· могут служить реакции одноэлектронного окисления перекиси водорода, катализируемые железосодержащими соединениями, всегда имеющимися в клетках:



Помимо указанных выше реакций гидроксидные радикалы образуются также при радиоллизе воды и в низких концентрациях обычно присутствуют в водных растворах. ОН· является самым сильным из всех известных окислителей, вызывающим радиационные повреждения многих типов биополимеров.

Перекись водорода. Перенос 2 электронов на O₂ приводит к образованию перекисного аниона (7) или перекиси водорода (8):



Катализировать перенос 2 электронов на O₂ могут содержащиеся в клетках прокариот оксидазы флавиновой природы и некоторые цитохромы. Источником H₂O₂ могут быть реакции автоокисления некоторых негемовых FeS-белков, а также описанные выше реакции дисмутации супероксидных радикалов (реакции 3 и 4). Перекись водорода образуется у всех аэробов и факультативных анаэробов, растущих в аэробных условиях, так что ее возникновение в клетках прокариот — естественный процесс.

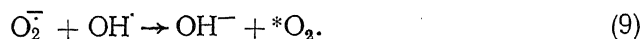
Перекись водорода — наиболее стабильный из промежуточных продуктов восстановления O₂, но и наименее реакционноспособный.

У большинства аэробных прокариот H_2O_2 быстро разлагается с помощью гемсодержащих ферментов: каталазы и пероксидазы. В отсутствие их H_2O_2 может накапливаться в летальных для организма концентрациях.

H_2O_2 вызывает окисление SH-групп в белках, перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот. Однако эти реакции протекают с измеримыми скоростями, если концентрация H_2O_2 в клетке будет на четыре порядка выше той, которая обычно достигается *in vivo*. Поэтому не исключено, что перекись водорода опасна не из-за прямого взаимодействия с компонентами клетки, а потому, что, реагируя с O_2^- (реакция 5) или ионами Fe^{2+} (реакция 6), может приводить к образованию гидроксидного радикала.

В 20-х гг. большой популярностью пользовалась теория, объясняющая токсичность O_2 накоплением в клетке перекиси водорода. Однако позднее были обнаружены более токсичные для клетки формы O_2 среди первичных и вторичных продуктов его одноэлектронного восстановления (O_2^- , $\text{OH}^- \cdot \text{O}_2$).

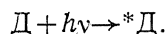
Синглетный кислород. В норме O_2 находится в стабильном состоянии, называемом триплетным и характеризующемся наименьшим уровнем молекулярной энергии. В определенных условиях молекула O_2 переходит в одно из двух возбужденных синглетных состояний ($^*\text{O}_2$), различающихся степенью энергизованности и длительностью «жизни». У большинства живых клеток в темноте основным источником синглетного кислорода служит спонтанная дисмутация супероксидных анионов (см. реакцию 3). Синглетный кислород может возникать также при взаимодействии двух радикалов:



Вероятно, любая биологическая система, в которой образуется O_2^- , может быть активным источником синглетного кислорода. Однако последний возникает и в темновых ферментативных реакциях в отсутствие O_2^- .

Давно было известно, что на свету токсичность молекулярного кислорода для живых организмов повышается. Этому способствуют находящиеся в клетке вещества, поглощающие видимый свет, — фотосенсибилизаторы². Многие природные пигменты могут быть фотосенсибилизаторами. В клетках фотосинтезирующих организмов активными фотосенсибилизаторами являются хлорофиллы. Окисление биологически важных молекул под влиянием видимого света в присутствии молекулярного кислорода и красителя получило название фотодинамического эффекта.

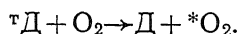
Поглощение видимого света приводит к переходу молекулы красителя в возбужденное синглетное состояние ($^*\text{Д}$):



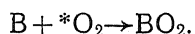
Молекулы красителя в синглетном состоянии могут возвращаться в основное (Д) или переходить в долгоживущее триплетное состояние ($^3\text{Д}$), в котором они фотодинамически активны. Установлено несколько механизмов, с помощью которых возбужденная молекула красителя ($^3\text{Д}$) может вызывать окисление молекулы субстрата. Один из них связан с образованием синглетного кислорода. Краситель в триплет-

² Фотосенсибилизаторы — молекулы, способные поглощать свет и индуцировать химические реакции, которые в их отсутствие не происходят.

ном состоянии реагирует с O_2 и переводит его в возбужденное синглетное состояние:



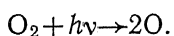
Синглетный кислород окисляет молекулу субстрата (В):



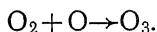
Фотодинамический эффект обнаружен у всех групп живых организмов. У прокариот в результате фотодинамического действия индуцируются повреждения многих типов: утрата способности формировать колонии, повреждение ДНК, белков, клеточной мембраны. Причина повреждений — фотоокисление некоторых аминокислот (метионина, гистидина, триптофана и др.), нуклеозидов, липидов, полисахаридов и других клеточных компонентов.

Клетки содержат вещества, выполняющие функцию тушения синглетного кислорода и понижающие возможность структурных и иных повреждений, вызываемых им. Одним из «тушителей» синглетного кислорода служат каротиноиды, защищающие фотосинтезирующие организмы от летальных эффектов, фотосенсибилизируемых хлорофиллом. Перехватчиками *O_2 являются также такие антиоксиданты, как например α -токоферол.

Озон и атомарный кислород. Продуктами молекулярного кислорода являются также атомарный кислород (О) и озон (O_3). Известно, что молекулярный кислород сильно поглощает свет в дальней УФ-области (160—240 нм). Каждый поглощенный фотон вызывает диссоциацию молекулы кислорода на два атома:



Затем спонтанно протекает реакция, приводящая к образованию молекулы озона:



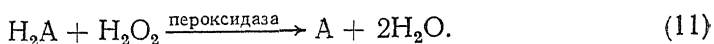
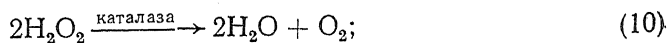
Озон может также возникать из молекулярного кислорода в воздухе при сильных электрических разрядах, а также при электролизе воды и в некоторых реакциях, где он сопровождает образование O_2 . В некоторых реакциях окисления с помощью озона образуется синглетный кислород. Как окислители озон и атомарный кислород сильнее O_2 . Озон может реагировать практически со всеми типами соединений с образованием радикалов.

Защитные механизмы клетки

По современным представлениям, наибольшей токсичностью для клетки обладают синглетный кислород и гидроксидные радикалы. Определенный вклад в общий отрицательный «кислородный» эффект вносят и другие производные O_2 . Много неясного остается в оценке степени токсичности для клетки самого молекулярного кислорода. Для нейтрализации токсических форм O_2 существующие прокариоты выработали различные защитные механизмы, которые могут быть разделены на несколько типов. В основе систем защиты первого типа лежит деятельность специальных ферментов, для которых разложение токсических форм O_2 является основной и в ряде случаев единственной функцией. В системах защиты второго типа для разрушения токсических форм O_2 используются определенные клеточные метаболиты. Как правило, в этом случае участие в защите клетки от токсических эф-

фектов производных O_2 является не единственной функцией этих метаболитов. Наконец, к защитным механизмам особого типа может быть отнесен ряд приспособлений, выработанных прокариотами на разных уровнях: популяционном, физиологическом, структурном. Более вероятно, что они были созданы для других целей, но оказались полезными и для детоксификации молекулярного кислорода.

Ферментные системы защиты. Передовой линией защиты от токсического действия O_2 являются ферменты: супероксиддисмутаза, захватывающая молекулы O_2^- (реакция 4), каталаза и пероксидаза, улавливающие H_2O_2 :



Они сводят до минимума концентрацию в клетке O_2^- и H_2O_2 и не дают им возможности взаимодействовать с образованием $OH\cdot$ (реакция 5).

Супероксиддисмутаза. Супероксиддисмутаза была обнаружена в 1968 г. и с тех пор служит предметом активного изучения. Она оказалась очень распространенным ферментом и обнаружена у всех прокариот, использующих O_2 , — аэробных и факультативно анаэробных форм. Супероксиддисмутаза найдена у всех изученных представителей из групп фотосинтезирующих прокариот. Среди анаэробов фермент обнаружен у подавляющего большинства аэротолерантных форм. Исключение составляют некоторые молочнокислые бактерии, относящиеся к родам *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*. Однако в клетках большинства видов содержатся высокие концентрации (порядка 9—23 мМ) ионов двухвалентного марганца. Оказалось, что Mn^{2+} , для которого показана способность окисляться под действием O_2^- , в таких концентрациях способен так же эффективно убирать образующиеся супероксидные ионы, как это делает супероксиддисмутаза, содержание которой в клетке обычно поддерживается на микромолярном уровне. Таким образом, у этих молочнокислых бактерий функцию нейтрализации O_2^- выполняют ионы Mn^{2+} . Из всех изученных молочнокислых бактерий только у двух видов (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*) не найдено ни супероксиддисмутазы, ни высоких концентраций Mn^{2+} . Это коррелирует с их очень высокой чувствительностью к O_2 .

Среди облигатных анаэробов супероксиддисмутаза обнаружена у многих представителей рода *Clostridium*. Изучение их устойчивости к O_2 обнаружило четкую связь с содержанием в клетках этого фермента. Виды, имеющие супероксиддисмутазу, характеризовались умеренной или даже высокой устойчивостью к O_2 по сравнению с видами, у которых этот фермент отсутствовал. Супероксиддисмутаза найдена у разных видов строго анаэробных бактерий рода *Desulfovibrio*, метанобразующих бактерий, облигатно анаэробных представителей родов *Actinomyces*, *Bacteroides*.

Число организмов с не выявленной до сих пор супероксиддисмутазой очень мало: некоторые бактерии из родов *Clostridium* и *Desulfovibrio*, а также *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Veilonella alcalescens*, *Neisseria gonorrhoeae*, молочнокислые бактерии с высокой потребностью в ионах Mn^{2+} , некоторые микоплазмы.

Обнаружение супероксиддисмутазы у строгих анаэробов (гораздо более распространенное, чем предполагали раньше) ставит вопрос о ее физиологической роли у этих организмов. Способность последних

расти только в бескислородной среде делает неясным функции фермента в этих условиях. Возможно, что только при попадании строгого анаэроба в неблагоприятные для него аэробные условия синтез этого фермента индуцируется молекулярным кислородом, что и обеспечивает организму защиту от O_2 в этих условиях.

Супероксиддисмутаза — фермент, содержащий в активном центре в качестве простетической группы ионы металла. У прокариот — это атомы марганца и/или железа. Большинство изученных супероксиддисмутаза построено из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит по одному атому металла. Fe- и Mn-ферменты сходны по аминокислотной последовательности.

Попытки выявить связь между физиологическими и иными особенностями организмов и металлоформой содержащегося в них фермента не привели к определенному заключению. И та и другая формы супероксиддисмутазы обнаружены у представителей грамположительных и грамотрицательных прокариот, среди фото- и хемотрофов, облигатных анаэробов, аэробов и факультативно анаэробных форм. Более того, обе металлоформы супероксиддисмутазы могут присутствовать у одного организма и даже входить в состав молекулы одного фермента. Для некоторых видов показано, что синтез того или иного типа фермента зависит от наличия ионов металла в среде культивирования.

Супероксиддисмутаза изученных хемотрофных прокариот — не связанный с мембранами фермент, локализованный в цитоплазме. Наиболее подробно он изучен у *E. coli*, где обнаружены Fe-, Mn- и Fe/Mn-формы фермента, локализованные в разных частях клетки: Fe-супероксиддисмутаза обнаружена в периплазматическом пространстве, а Mn-содержащий фермент — в цитоплазме. В связи с этим было высказано предположение, что металлоформы фермента играют разную роль в защите клетки от O_2^- : Fe-содержащий фермент защищает клетку от экзогенных супероксидных анионов, а Mn-содержащий — от эндогенных.

Особо остро стоит проблема защиты от молекулярного кислорода и его производных в клетках фотосинтезирующих прокариот, выделяющих O_2 , — цианобактерий. Вероятно, именно они впервые в наибольшей степени ощутили последствия токсических эффектов кислорода. Супероксиддисмутаза найдена в клетках всех изученных к настоящему времени цианобактерий. Более детальное изучение, проведенное у *A. nidulans* (*Synechococcus*), обнаружило в клетках две формы фермента, содержащие атомы Fe и Mn. Fe-супероксиддисмутаза, составляющая до 90% от общего количества фермента, локализована в цитозоле клетки, а Mn-содержащая форма — в тилакоидах. Функция последней формы фермента сводится, вероятно, к перехвату ионов O_2^- , возникающих в результате автоокисления первичного акцептора электронов I фотосистемы.

Каталаза и пероксидаза. Перекись водорода разрушается двумя классами родственных ферментов, катализирующих ее двухэлектронное восстановление до H_2O и использующих в качестве донора электронов H_2O_2 в случае каталазы (реакция 10) или различные органические соединения — в случае пероксидазы (реакция 11).

Каталазная и пероксидазная активности обнаружены у всех аэробных и факультативно анаэробных прокариот. Среди облигатных анаэробов эти ферменты распространены значительно в меньшей степени, чем супероксиддисмутаза. Обнаружены многие строгие и аэротолер-

рантные анаэробы, содержащие супероксиддисмутазу, но не содержащие каталазы: *Clostridium pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. oroticum*, *Eubacterium limosum*, *Zymobacterium oroticum*, *Butyribacterium rettgeri*, молочнокислые бактерии, относящиеся к роду *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. mitis*, *S. lactis*, *S. faecalis*, *S. bovis*). К этой же группе можно отнести и те молочнокислые бактерии родов *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, у которых дисмутация образующих ионов O_2^- обеспечивается Mn^{2+} , находящимся в клетках в высоких концентрациях.

Отсутствие каталазы у молочнокислых бактерий связано с тем, что они не могут синтезировать гем — простетическую группу фермента, но способны к синтезу апофермента. При добавлении гемовых групп извне молочнокислые бактерии образуют гемсодержащую каталазу. У ряда молочнокислых бактерий, принадлежащих к родам *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, обнаружена каталаза, не содержащая гемовой группы, названная поэтому псевдокаталазой. Выделенный из *Lactobacillus plantarum* фермент состоит из шести идентичных полипептидных цепей, соединенных между собой нековалентными силами. Каждая субъединица содержит 1 атом марганца.

Перекись водорода, возникающая в результате взаимодействия клеток анаэробов с O_2 , устраняется и неферментативными путями. Известно, что ионы Fe^{2+} в водном растворе ускоряют восстановление H_2O_2 до H_2O . В клетке всегда содержится некоторое количество ионов железа. Разрушение H_2O_2 может происходить и за счет выделяющихся в культуральную среду восстановленных веществ.

Для анаэробных прокариот, способных переносить контакт с O_2 и его производными в относительно небольших масштабах, необходимо присутствие в клетках супероксиддисмутазы, «убирающей» O_2^- . Наличие каталазы при этом не обязательно, поскольку возникающая в реакции дисмутации и других реакциях перекись водорода разлагается спонтанно или с участием неферментативных катализаторов, и организмы в целом справляются с ней в этих условиях. Таким образом, при осуществлении энергетического метаболизма анаэробного типа для устранения токсических эффектов O_2 достаточно одной ферментативной преграды в виде супероксиддисмутазы.

Резкое возрастание масштабов взаимодействия прокариот с O_2 при функционировании метаболизма аэробного типа делает неэффективными неферментативные пути устранения H_2O_2 . Для разложения перекиси водорода, образующейся в возросших количествах, необходимы специальные ферменты, повышающие скорость разложения H_2O_2 на несколько порядков. Это обеспечивается каталазой и пероксидазой. Таким образом, в условиях активного взаимодействия клеток с молекулярным кислородом, делающего возможным аэробную жизнь, система ферментной защиты от его токсических эффектов сформирована с участием супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы в качестве необходимых компонентов (рис. 96).

Механизмы защиты с помощью клеточных метаболитов. Защита против одного из самых токсичных производных молекулярного кислорода — синглетного кислорода — осуществляется с помощью каротиноидных пигментов. Каротиноиды широко распространены в мире прокариот. Они обнаружены в клетках многих аэробных хемотрофов, являются обязательным компонентом пигментного аппарата всех фототрофов. В клетках фотосинтезирующих организмов, как отмечалось выше, активными фотосенсибилизаторами являются хлорофиллы. Од-

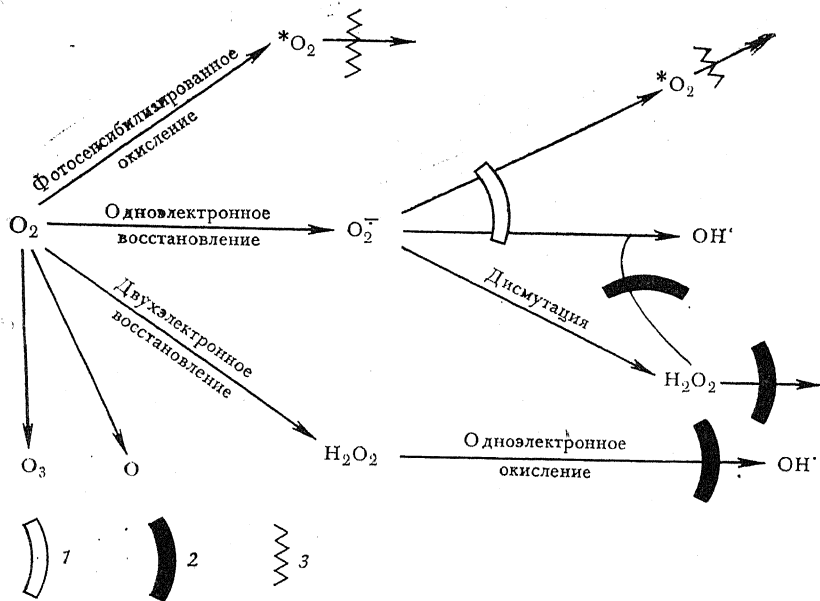


Рис. 96. Схематическое изображение систем клеточной защиты от токсических производных молекулярного кислорода:
 1 — супероксиддисмутаза, ионы Mn^{2+} ; 2 — каталаза, пероксидаза; 3 — тушение каротиноидами

нако возможность фотоокислительных эффектов в условиях функционирования фотосинтетического аппарата довольно низка, во-первых, из-за чрезвычайно короткого (10^{-11} с) времени пребывания хлорофилла в возбужденном состоянии и, во-вторых, из-за защиты клеток от фотоокисления каротиноидами.

Впервые роль каротиноидов в предотвращении летального эффекта, вызываемого фотоокислением, была показана при изучении бескаротиноидного сине-зеленого мутанта пурпурной бактерии *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Исходная культура хорошо росла фототрофно в анаэробных условиях, но могла также расти на свету и в темноте в аэробных условиях. Полученный из нее мутант, лишенный каротиноидов, обладал низкой скоростью роста на свету в анаэробных условиях и в темноте в аэробных условиях, но быстро погибал при перенесении на свет+воздух. Тот же самый эффект был получен при ингибировании синтеза каротиноидов у другой фотосинтезирующей пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum*.

Фотоокислительные повреждения могут развиваться и у нефотосинтезирующих прокариот, так как в их клетках также имеются окрашенные молекулы, поглощающие видимый свет, которые могут функционировать как фотосенсибилизаторы. Роль каротиноидов в предотвращении фотоокислительных повреждений у хемотрофных прокариот была показана при изучении бескаротиноидных мутантов *Corynebacterium poinsettiae* и *Sarcina lutea*. При воздействии яркого солнечного света оба мутанта погибали, тогда как исходные штаммы, содержащие каротиноиды, были жизнеспособны. Действие каротиноидов не ограничивается только их участием в защите от фотодинамического эффекта. Они гасят синглетное состояние кислорода независимо от того, в каких реакциях он возникает: на свету или в темноте.

Механизм защитного действия каротиноидов у фотосинтезирующих

ших организмов заключается в следующем (рис. 97). Молекула хлорофилла, поглотившая свет, быстро (10^{-12} с) переносит энергию синглетного возбужденного состояния в реакционный центр. Из 10^4 поглощенных квантов света приблизительно 4 приводят к переходу молекулы хлорофилла в возбужденное триплетное состояние. Возникает

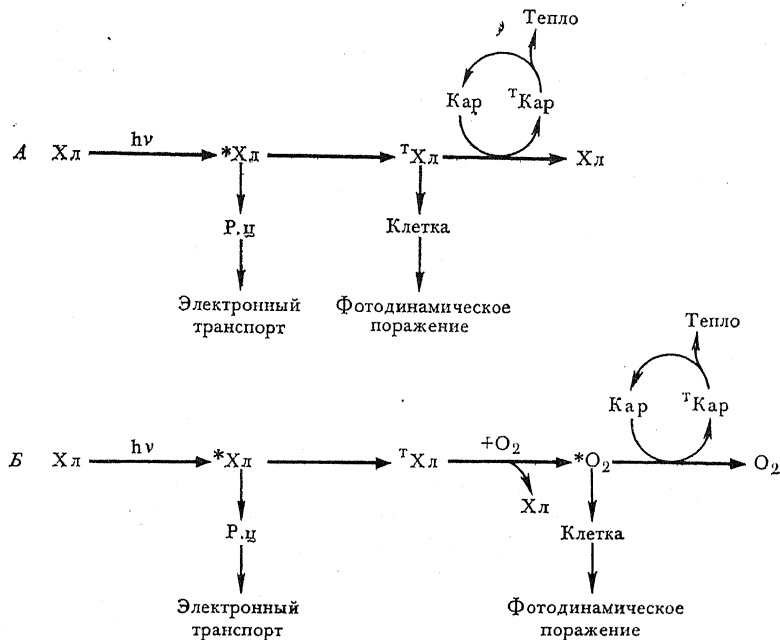


Рис. 97. Схематическое изображение механизмов защитного действия каротиноидов.

А. Тушение каротиноидами триплетного состояния хлорофилла. Б. Тушение каротиноидами синглетного кислорода: *хл — молекула хлорофилла в возбужденном синглетном состоянии; $T_{хл}$ — молекула хлорофилла в возбужденном триплетном состоянии; $T_{кар}$ — молекула каротиноида в возбужденном триплетном состоянии; р. ц — реакционный центр

возможность фотодинамического поражения. Каротиноиды могут участвовать в трех защитных реакциях. 1. Непосредственно тушить триплетное состояние хлорофилла, переводя его в основное состояние (рис. 97, А); возникающая при этом триплетная молекула каротиноида отдает избыточную энергию в виде тепла и возвращается в основное состояние. 2. Триплетный хлорофилл не гасится каротиноидами. Происходит его взаимодействие с O_2 , переводящее последний в возбужденное синглетное состояние. Синглетный кислород гасится каротиноидами (рис. 97, Б). 3. Синглетный кислород, не подвергшийся гашению каротиноидами по физическому механизму, может взаимодействовать с ними в химической реакции, приводящей к окислению каротиноидов. Участие каротиноидов в любой из трех описанных выше реакций будет снижать уровень образования в клетке синглетного кислорода.

Приспособления прокариот, помогающие им в защите от токсических эффектов молекулярного кислорода. В клетках тех облигатно анаэробных клостридиев, у которых не обнаружено ни супероксиддисмутазы, ни каталазы, доступным средством нейтрализации O_2 служит вытеснение его из среды культивирования с помощью активно выделяя-

ющихся газообразных продуктов (CO_2 и H_2), сопровождающих брожение, а также поглощение клеточной суспензией кислорода из среды, приводящее к гибели части клеток, но дающее возможность оставшимся размножаться в условиях пониженного содержания кислорода.

Молочнокислыми бактериями в направлении защиты от молекулярного кислорода сделан определенный шаг вперед. Эти бактерии — единственная группа прокариот, не имеющих гемсодержащей каталазы, способных расти в присутствии воздуха. Поиски механизмов нейтрализации O_2 и его производных привели к обнаружению у представителей этой группы помимо супероксиддисмутазы и высокой внутриклеточной концентрации ионов Mn^{2+} , осуществляющих разложение O_2^- , псевдокаталазы, а также каталазо- и пероксидазоподобной активности. У отдельных представителей молочнокислых бактерий просматривается более четко выраженная степень приспособляемости к молекулярному кислороду, приводящая к попыткам определенного его полезного использования. Для некоторых молочнокислых бактерий показано ускорение гликолитического разложения глюкозы в аэробных условиях. Это связано с тем, что в аэробных условиях водород с НАД· H_2 может прямо передаваться на O_2 , освобождая часть пировиноградной кислоты от ее акцепторной функции, как это происходит при обычном молочнокислом брожении. Освобожденная от этой «обязанности» пировиноградная кислота может теперь окисляться до ацетил-КоА, последующее метаболизирование которого приводит к синтезу молекулы АТФ. Как можно видеть, участие кислорода в этом процессе прямо не связано с получением клеткой энергии (при передаче водорода с НАД· H_2 на O_2 энергия в форме АТФ не образуется), т. е. вся энергия получается за счет субстратного фосфорилирования, но кислород, беря на себя акцепторную функцию, освобождает часть пировината, которая может использоваться клеткой по энергетическому пути, что в конечном итоге приводит к повышению энергетического выхода брожения. Таким образом, прямое окисление части восстановленных переносчиков электронов в процессе брожения может иметь не только отрицательные, но и положительные последствия.

Как отмечалось выше, очень чувствителен к молекулярному кислороду процесс азотфиксации. Несмотря на это, способность фиксировать N_2 широко распространена среди прокариот, принадлежащих ко всем физиологическим группам, различающимся отношением к молекулярному кислороду; она присуща как хемотрофам, так и фототрофам, в том числе цианобактериям, осуществляющим кислородный фотосинтез. Фиксировать молекулярный азот могут как свободноживущие формы, так и прокариоты, находящиеся в симбиозе с эукариотными организмами.

Изучение средств защиты этого процесса у разных групп прокариот показало, что в большинстве случаев она далека от 100%-ной эффективности. Так, среди аэробных азотфиксаторов можно выделить лишь немногие организмы, способные расти в среде с N_2 в условиях равновесия с воздухом, т. е. осуществлять азотфиксацию в аэробных условиях. Большинство может расти и фиксировать N_2 только в условиях пониженной концентрации молекулярного кислорода, т. е. в микроаэробных условиях. Защита нитрогеназы в клетках факультативных анаэробов еще менее эффективна: они могут осуществлять активную фиксацию азота только в анаэробных условиях.

К числу аэробных азотфиксаторов относятся представители рода *Azotobacter*, у которых обнаружены различные защитные приспособления. Одно из них связано с резким увеличением дыхательной актив-

ности клеток, осуществляющих азотфиксацию в аэробных условиях. Дыхание в значительной мере служит в этом случае для «связывания» внутриклеточного O_2 . При этом обнаружены существенные перестройки как в клеточном строении азотобактера, выражающиеся в интенсивном развитии системы внутрицитоплазматических мембран, так и в организации самой дыхательной цепи, локализованной в этих мембранах. Дыхательная цепь *Azotobacter vinelandii*, достаточно сложная, имеет разветвления на путях переноса электронов на уровне цитохрома *b*. Транспорт электронов, сопряженный с фосфорилированием, происходит по пути:

цитохромы $b \rightarrow c_4 \rightarrow c_5 \rightarrow a_1$.

При осуществлении «дыхательной» защиты возрастает активность электронного транспорта по ветви: цитохромы $b \rightarrow d$, не связанной с запасанием энергии. Эти перестройки приводят к тому, что, несмотря на возрастание общей активности дыхания, сопряжение электронного транспорта с запасанием энергии снижается. Таким образом, происходит «сжигание» части углеродных субстратов, которые используются для восстановления O_2 без запасания при этом клеткой энергии.

В дополнение к вынужденному «принесению в жертву» части источников углерода высокие концентрации O_2 вызывают в клетке обратимые изменения структуры нитрогеназы, делающие чувствительные к молекулярному кислороду участки менее доступными для него. Высказываются разные предположения относительно того, как осуществляется «конформационная» защита. Возможно, при этом происходит изменение взаимного расположения двух нитрогеназных белков. Не исключено участие в защите такого типа клеточной мембраны. Определенная стабилизация нитрогеназы в условиях высокой концентрации O_2 происходит при добавлении к ферментному комплексу двухвалентных катионов. Наконец, обнаружены специальные защитные FeS-белки, образующие комплексы с нитрогеназными белками, приводящие к повышению их стабильности в присутствии O_2 . Никаких других функций, кроме защитной, у этих FeS-белков пока не найдено.

К организмам, способным фиксировать молекулярный азот в микроаэробных условиях, принадлежит большинство азотфиксирующих прокариот. К числу защитных приспособлений, обеспечивающих у них способность фиксировать N_2 в микроаэробных условиях, относятся: 1) образование слизи, препятствующей диффузии в клетку O_2 и тем самым создающей вокруг нее микроаэробную зону; 2) формирование клеточных скоплений, затрудняющих доступ O_2 к клеткам, расположенным внутри скопления, для которых, таким образом, создаются более благоприятные условия для азотфиксации; 3) существование азотфиксирующих видов в ассоциации с неазотфиксирующими аэробными гетеротрофами, защищающими нитрогеназу азотфиксаторов от доступа O_2 .

Специфические приспособления для защиты нитрогеназы от высоких концентраций O_2 выработаны симбиотическими азотфиксаторами — клубеньковыми бактериями. Уже сами клубеньки, места активного размножения бактерий и фиксации ими N_2 , следует рассматривать как структуру, одним из назначений которой является ограничение доступа внутрь молекулярного кислорода. Эту же функцию выполняет содержащийся в клубеньках леггемоглобин (белок, аналогичный гемоглобину), способный активно связывать O_2 и контролировать его поступление в бактериоиды. В любом случае при осуществлении метаболизма аэробного типа дыхание также будет препятствовать накоплению в клетке молекулярного кислорода.

Наиболее остро стоит проблема защиты процесса азотфиксации от O_2 в группе кислородвыделяющих фототрофных прокариот — цианобактерий. У всех цианобактерий нитрогеназа чувствительна к O_2 , имеющему экзогенное и эндогенное происхождение. В соответствии с этим из всей совокупности обнаруженных у цианобактерий приспособлений можно выделить те, которые направлены на защиту от экзогенного кислорода, и те, которые предназначены для нейтрализации O_2 , образующегося внутри клетки в процессе фотосинтеза.

Если все азотфиксирующие цианобактерии рассматривать под углом зрения степени защиты процесса азотфиксации от молекулярного кислорода, то их можно разделить на две группы. К первой группе относятся цианобактерии, у которых защита азотфиксации от O_2 наименее эффективна, поэтому вегетативные клетки могут фиксировать N_2 только в анаэробных или микроаэробных условиях. Вторую группу составляют цианобактерии, у которых для осуществления азотфиксации в аэробных условиях сформированы специализированные клетки — гетероцисты.

У безгетероцистных цианобактерий защита нитрогеназы вегетативных клеток от O_2 , в первую очередь эндогенного, осуществляется с помощью разделения во времени процессов фотосинтеза и азотфиксации, непрерывного синтеза нитрогеназы, высокой активности супероксиддисмутазы в сочетании с каталазой и пероксидазной активностями. В центре филламентов некоторых безгетероцистных форм часто выделяются слабо пигментированные вегетативные клетки, у которых предположительно подавлена способность к фотосинтетической фиксации CO_2 и тем самым созданы более благоприятные условия для азотфиксации. (Это не гетероцисты, но, вероятно, именно из них впоследствии развились гетероцисты как центры азотфиксирующей активности в аэробных условиях.) Средством защиты от экзогенного O_2 служит синтез большого количества слизи, часто окружающей клетки азотфиксирующих цианобактерий. Существование в виде колониальных форм также может обеспечивать создание анаэробных условий для клеток, располагающихся в центральной части колонии.

Наиболее совершенна защита от молекулярного кислорода как эндогенного, так и экзогенного в гетероцистах. Известно, что гетероцисты не способны к фотосинтетическому выделению O_2 . А высокие активности окислительного пентозофосфатного пути, поставляющего электроны в дыхательную цепь, где они акцептируются O_2 , повышенные уровни супероксиддисмутазы сравнительно с вегетативными клетками, образование гетероцистами молекулярного водорода, толстая многослойная оболочка, выполняющая функцию газового барьера, — все это надежно защищает азотфиксирующую систему в гетероцистах от инактивации молекулярным кислородом.

Таким образом, можно только предполагать, что механизмы нейтрализации молекулярного кислорода на различных этапах эволюции взаимодействия с ним клеток были неодинаковы. На каком-то из этапов возникли ферментные реакции, катализирующие включение O_2 в метаболизм прокариот.

Молекулярный кислород в метаболизме прокариот

Тот факт, что все существующие на Земле прокариоты, даже строгие анаэробы, в присутствии O_2 его поглощают, говорит об осуществлении ими каких-то реакций взаимодействия с молекулярным кислородом. По отношению к O_2 все прокариоты могут быть разделены на

несколько физиологических групп (см. рис. 28). Такое подразделение говорит о необходимости или вреде молекулярного кислорода для определенных организмов, но не раскрывает механизмов взаимодействия с ним клетки. Действительно, сейчас мы знаем, что молекулярный кислород может быть необходим клетке для получения энергии или же для осуществления всего одной реакции, не имеющей энергетического значения.

На основании многолетнего опыта изучения энергетических процессов, происходящих в митохондриях животных клеток, В. П. Скулачев (1969) предложил следующую классификацию реакций взаимодействия клетки с молекулярным кислородом (рис. 98). Порцию по-

Неферментативное окисление	Ферментативное поглощение O_2 (дыхание)		
	Свободное окисление	Окисление, сопряженное с запасанием энергии	
		нефосфорилирующее	фосфорилирующее

Рис. 98. Пути использования порции молекулярного кислорода, поглощенного клеткой. Объяснение см. в тексте (по Скулачеву, 1969)

глощенного клеткой молекулярного кислорода можно разделить на две неравные части. Основная масса кислорода потребляется клеткой с участием клеточных ферментных систем. Поглощение клеткой какой-то части молекулярного кислорода не связано с ее ферментными системами. Иллюстрацией последнего служит хорошо известный факт активного поглощения кислорода суспензией убитых прогреванием клеток. В этом случае поглощение кислорода — чисто химический процесс, связанный с окислением определенных химических веществ клетки, например SH-групп клеточных белков. Нельзя исключить возможность протекания процессов аналогичной природы и в суспензии живых клеток. В свою очередь ферментативное поглощение кислорода — дыхание³ — подразделяется на окисление, сопряженное с запасанием энергии, и свободное окисление, т. е. окисление, не связанное с запасанием энергии для клетки. Окислительные ферментативные реакции с участием молекулярного кислорода, относимые к категории свободного окисления, — это реакции, в результате которых энергия выделяется в виде тепла. (Реакции свободного окисления имеют важное значение в осуществлении терморегуляции у животных при охлаждении организма.) К этой категории процессов относятся реак-

³ Термин «дыхание» впервые был введен с целью обозначения определенного процесса, связанного с жизнедеятельностью высших организмов (растений и животных). Два основных признака характеризовали этот процесс: 1) газообмен с внешней средой с неизменным участием O_2 ; 2) необходимость для жизнедеятельности организма. Принципиальное сходство процесса дыхания на клеточном уровне у всех высших организмов делало употребление этого термина удобным, а обозначаемое им понятие достаточно четким. Сложности возникли при применении термина «дыхание» для обозначения функционально аналогичных процессов у прокариот в силу их необычайного разнообразия. В нашем понимании термин «дыхание» распространяется на все процессы ферментативного поглощения клеткой молекулярного кислорода. Вторым признаком (необходимым для поддержания жизнедеятельности) в данном случае не учитывается, так как применительно к изучаемым объектам не всегда выполняется.

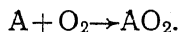
ции, катализируемые моно- и диоксигеназами, в которых имеет место прямое включение кислорода в молекулу окисляемого вещества, а также реакции, катализируемые некоторыми оксидазами.

Ферментативное поглощение кислорода, сопряженное с запасанием энергии, подразделяется на процессы, сопровождающиеся фосфорилированием, и процессы, не связанные с фосфорилированием. В последнем случае окисление, сопряженное с запасанием энергии, не связано с трансформированием свободной энергии в форму макроэргических фосфатных связей. Известно, что в клетке существуют две универсальные формы энергии: химическая и электрохимическая ($\Delta\mu_{H^+}$). Один из путей получения энергии в форме трансмембранного электрохимического градиента H^+ связан с переносом электронов на молекулярный кислород. Энергия в этой форме может использоваться клеткой для совершения разного вида работы (см. рис. 27). Химическая энергия заключена в основном в соединениях, содержащих макроэргические фосфатные связи, и в первую очередь в молекулах АТФ. Но на промежуточных этапах катаболических процессов, связанных в конечном итоге с поглощением O_2 , образуются метаболиты, содержащие богатые энергией связи, например тиоэфирные ($C \sim S-CoA$). Эти соединения могут непосредственно обеспечивать энергией некоторые биосинтетические процессы.

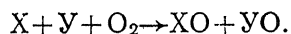
Наконец, при фосфорилирующем окислении энергия, высвобождаемая при электронном транспорте на молекулярный кислород и возникающая первоначально в форме $\Delta\mu_{H^+}$, с помощью протонной АТФ-синтетазы трансформируется в химическую форму в молекулах АТФ. В отличие от высших организмов, где достигнута высокая степень сопряжения между переносом электронов и фосфорилированием, т. е. этот путь предстает уже в сложившемся виде, у современных прокариот мы обнаруживаем различные пути переноса электронов и разные степени сопряжения электронного транспорта с фосфорилированием.

Все перечисленные типы окислительных процессов с участием молекулярного кислорода, протекающие в высокоорганизованной клетке, обнаруживаются и у прокариот.

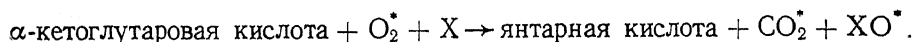
В основу классификации, предложенной В. П. Скулачевым, положено рассмотрение всех реакций взаимодействия клетки с молекулярным кислородом под углом зрения их «энергетической значимости» для клетки. По химическим механизмам, лежащим в основе этих реакций, все они могут быть разделены на три группы. К первой группе относятся реакции, катализируемые кислородными трансферазами, или диоксигеназами, в которых имеет место прямое присоединение молекулы кислорода к молекуле метаболита:



Одна молекула субстрата может акцептировать оба атома молекулы кислорода, как это имеет место в приведенной выше реакции. Примером диоксигеназы такого рода служит катехол-1,2-оксигеназа, катализирующая окисление катехола (рис. 99). Акцепторами O_2 могут быть молекулы двух разных субстратов:



Например:



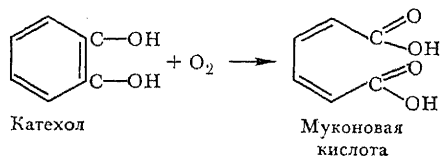
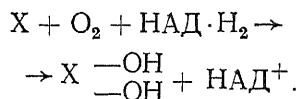


Рис. 99. Окисление катехола

Наконец, для каталитической активности некоторые диоксигеназы требуют НАД(Ф)·Н₂ в качестве донора электронов:

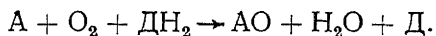


Все подобные реакции представляют собой свободное окисление и не связаны с получением клеткой энергии.

Вторую группу составляют реакции, в которых электроны идут к кислороду, выполняющему функцию конечного акцептора. В этом случае 1, 2 или 4 электрона в зависимости от природы переносчика акцептируются молекулой кислорода, что приводит в конечном итоге к ее неполному (O₂⁻, H₂O₂) или полному (H₂O) восстановлению. Реакции данного типа катализируются ферментами, называемыми оксидазами, и могут представлять собой свободное окисление и окисление, сопряженное с запасанием энергии.

К реакциям свободного окисления относятся все реакции, катализируемые растворимыми оксидазами, локализованными в цитозоле клетки. Помимо них у прокариот описан ряд связанных с мембранами оксидаз цитохромной и нецитохромной природы, перенос электронов с которых на O₂ также не сопряжен с запасанием энергии.

Промежуточными по химическому механизму реакциями между приведенными выше являются реакции, в которых судьба каждого из двух атомов в молекуле кислорода различна:



В этом случае 1 атом поглощенной молекулы кислорода используется для окисления вещества путем прямого присоединения к нему, а другой восстанавливается до H₂O в присутствии подходящего донора электронов. Обе реакции катализируются одним ферментом, принадлежащим к группе монооксигеназ, или оксигеназ (оксидаз) со смешанными функциями. Монооксигеназы в клетке многочисленны и разнообразны.

Они катализируют реакции свободного окисления. Участие в процессах, сопряженных с запасанием клеткой энергии, маловероятно.

Таким образом, оксигеназы — это ферменты, катализирующие активирование O₂ и последующее включение 1 или 2 его атомов в молекулы различных субстратов. Если субстратом (акцептором O₂) служит водород, фермент называют оксидазой. В этом смысле оксидазы можно рассматривать как специализированный класс оксигеназ.

Оксигеназы играют важную роль в процессах биосинтеза, деградации и трансформации клеточных метаболитов: ароматических аминокислот, липидов, сахаров, порфиринов, витаминов. Субстратами, на которые воздействуют оксигеназы часто служат сильно восстановленные не растворимые в воде соединения; их окисление приводит к тому, что продукты реакции становятся более растворимыми в воде и, следовательно, биологически активными, что важно для их последующего метаболизирования. У строго анаэробных прокариот кислород, включаемый в молекулу субстрата, происходит не из молекулярного кислорода, а из других соединений, например воды.

Следовательно, всю совокупность взаимодействия молекулярного кислорода с клеткой, с точки зрения лежащих в основе этого химических механизмов, можно свести к участию O_2 в двух типах реакций, в первом из которых он выступает в качестве конечного акцептора электронов, а во втором происходит его прямое внедрение в молекулу вещества. Только первый тип реакций с участием молекулярного кислорода может стать источником энергии для клетки. Поэтому для нас важно проанализировать эволюцию взаимодействия клетки с O_2 по пути формирования ею систем, включающих использование молекулярного кислорода в качестве конечного акцептора электронов.

Формирование у прокариот «оксидазного механизма» взаимодействия с молекулярным кислородом, сопряженного с запасанием энергии

С появлением в атмосфере молекулярного кислорода возникла возможность переноса на него электронов. Для того чтобы этот перенос мог быть связан с получением энергии, необходимо было сформировать: 1) электронтранспортные цепи с определенным образом ориентированными в мембране переносчиками, обеспечивающими на отдельных этапах перемещение протонов через мембрану, а электронов на O_2 ; 2) ферментный комплекс, преобразующий возникающую при электронном транспорте электрохимическую энергию в химическую, запасаемую в молекулах АТФ.

Со сформированными электронтранспортными цепями, локализованными в мембране, содержащими все типы переносчиков и имеющими прямое отношение к получению клеткой энергии, мы уже встречаемся у рассмотренных в главах 9 и 10 анаэробных прокариот с наиболее просто организованной энергетикой хемотрофного (брожение) и фототрофного (бескислородный фотосинтез) типа: некоторых пропионовокислых бактерий, всех фотосинтезирующих пурпурных и зеленых бактерий. В клеточных мембранах этих организмов локализованы и функционируют сопряженные с электронным транспортом АТФ-синтетазы.

П. Митчелл высказал предположение, что система переноса электронов и протонов и переносящая протоны АТФаза возникли независимо друг от друга и, вероятно, одновременно как разные способы генерации $\Delta\mu_{H^+}$, необходимого для обеспечения энергией процесса избирательного транспорта питательных веществ в клетку. Последующая случайная встреча обеих систем в клетке положила начало сопряжению процессов транспорта электронов и фосфорилирования в результате обращения работы АТФазы. Это сделало возможным запасание свободной энергии окисления в молекулах АТФ. Близкий состав и аналогичная структура энергопреобразующих мембран, большое сходство механизмов сопряжения у разных групп прокариот и эукариот указывают на то, что возникшая на раннем этапе эволюции система сопряжения электронного транспорта и фосфорилирования была использована всеми организмами без принципиальных изменений.

О происхождении обратимой протонной АТФазы

Наиболее древнее происхождение имеет, вероятно, протонная АТФаза. Она обнаружена в клетках всех организмов, в том числе и у первичных анаэробов-бродильщиков, синтезирующих АТФ в реакциях

субстратного фосфорилирования (молочнокислые бактерии, клостридии). Гипотетические первичные клетки получали всю энергию за счет субстратного фосфорилирования и имели слаборазвитые биосинтетические способности. Поступление необходимых органических соединений из внешней среды и выделение конечных продуктов брожения происходило по механизму пассивного унипорта (см. рис. 26). Первичные клетки, вероятно, не имели клеточной стенки, а были отграничены от окружающей среды только элементарной мембраной. Очевидно, что активные транспортные процессы, обеспечивающие избирательный перенос веществ против их концентрационных градиентов, были необходимы на очень ранних этапах клеточной эволюции.

Для выполнения этой задачи в клетках и была сформирована локализованная в ЦПМ АТФ-зависимая протонная помпа. Энергия гидролиза АТФ, осуществляемого АТФазой, использовалась для выталкивания протонов из клетки во внешнюю среду. Гидролиз одной молекулы АТФ приводит к переносу 2 протонов и созданию таким путем трансмембранного электрохимического протонного градиента. Экспериментально это было показано для молочнокислых бактерий и клостридий, у которых нет дыхания, но в ЦПМ локализованы АТФазы, расщепляющие молекулы АТФ, образующиеся при брожении.

Таким образом, использование АТФ для создания $\Delta\mu_{H^+}$ на мембране — эволюционно очень древний механизм прокариотной клетки. Позднее возник механизм синтеза АТФ за счет $\Delta\mu_{H^+}$. Для этого надо было только изменить направление работы протонного АТФазного комплекса.

Обратимо функционирующие протонные АТФазы мы находим у первично анаэробных прокариот, также получающих энергию только в процессе брожения. Обнаружено, что выделение во внешнюю среду молочной и уксусной кислот молочнокислыми бактериями и клостридиями приводит к созданию на ЦПМ протонного градиента. У стрептококков, осуществляющих гомоферментативное молочнокислое брожение, молочная кислота накапливается в клетке в виде аниона, для которого ЦПМ практически непроницаема. Выход лактата из клетки происходит в процессе электронейтрального симпорта с протонами

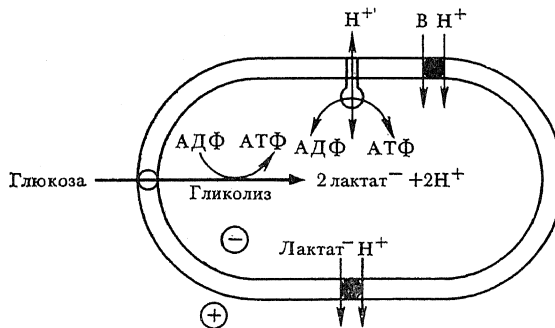


Рис. 100. Схема энергетических и транспортных процессов у молочнокислых бактерий. Темный кружок — переносчик; В — молекула растворенного вещества; глюкоза поступает в клетку с помощью фосфотрансферной системы (см. с. 44). Остальные объяснения см. в тексте

(рис. 100). Аналогичную картину наблюдали у *Clostridium pasteurianum*, у которого накапливающиеся в клетке ионы ацетата проходят через ЦПМ в недиссоциированной форме. Поскольку внутри клетки концентрации молочной и уксусной кислот в начале брожения всегда выше, чем во внешней среде, выход их осуществляется с помощью соответствующих переносчиков по концентрационному градиенту, т. е. в процессе облегченной диффузии, не требующей энергетических за-

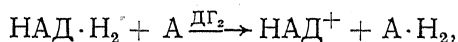
трат. Транспорт H^+ в симпорте с лактатом или ацетатом приводит к генерированию на ЦПМ $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$. При накоплении во внешней среде кислот их концентрационный градиент постепенно падает, в результате чего способность образовывать протонный градиент, связанный с выделением кислот из клетки, уменьшается. При высоких концентрациях молочной и уксусной кислот в среде образование $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ на мембране зависит только от гидролиза АТФ.

Электрохимическая энергия протонного градиента, возникающая при выделении из клетки кислот в процессе брожения, может использоваться для транспорта в клетку растворимых веществ, а также для синтеза АТФ, который осуществляется при функционировании протонной АТФазы в обратном направлении. Выход энергии за счет выделения из клетки продуктов брожения может быть довольно значительным. При гомоферментативном молочнокислом брожении, по проведенным подсчетам, он может достигать 30% от общего количества энергии, вырабатываемой клеткой. Таким образом, у некоторых прокариот, получающих энергию только в процессе брожения, АТФ может синтезироваться в реакциях субстратного фосфорилирования и дополнительно за счет использования $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$, образующегося при выходе конечных продуктов брожения в симпорте с протонами. Следовательно, прокариоты с облигатно бродильным типом энергетики уже имеют протонные АТФазы, функционирующие в направлении гидролиза и синтеза АТФ, т. е. катализирующие обратимое взаимопревращение двух видов метаболической энергии: $АТФ \rightleftharpoons \Delta\bar{\mu}_{H^+}$.

Наконец, у некоторых первично анаэробных прокариот-бройщиков обнаружена АТФ-синтезая активность, сопряженная с короткими фрагментами переноса электронов с помощью связанных с мембраной переносчиков (см. ниже).

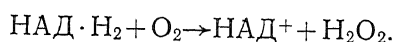
Растворимые системы переноса электронов на O_2 у первично анаэробных прокариот

Как известно, перенос электронов лежит в основе всех окислительно-восстановительных процессов. В разных видах брожений, рассмотренных в гл. 9, перенос электронов (водорода) от одних органических молекул к другим обычно осуществляют растворимые НАД-зависимые дегидрогеназы:



где ДГ — соответствующие дегидрогеназы, содержащие НАД в качестве кофермента; А — молекула органического вещества, служащая акцептором электронов. Молекулы $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ используются в конструктивном метаболизме, поставляя восстановитель для биосинтетических процессов, а также в системе энергетического метаболизма, участвуя в решении «акцепторной проблемы». Электронный перенос ни в одном случае не приводит к получению клеткой энергии, она вырабатывается только в реакциях субстратного фосфорилирования.

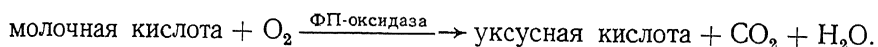
У некоторых прокариот описан прямой перенос электронов с растворимых НАД-зависимых ферментов на O_2 , приводящий к его восстановлению:



Окисление НАД-зависимых дегидрогеназ осуществляется также через посредство флавопротеидов, катализирующих перенос 1, 2 или 4 электронов на O_2 , что приводит к образованию супероксидного аниона, перекиси водорода или воды соответственно. O_2^- и H_2O_2 далее могут разлагаться ферментами, разобранными в этой главе в разделе «Защитные механизмы клетки».

У аэротолерантных анаэробов, таких как молочнокислые бактерии и некоторые клостридии, флавопротеиды выполняют роль основного связующего звена между субстратом и молекулярным кислородом. Подобные системы могут быть полезными, например, для создания анаэробных условий в результате поглощения O_2 из среды, но не имеют отношения к получению клеткой энергии. Восстановление O_2 , при котором в роли оксидаз, т. е. ферментов, непосредственно осуществляющих перенос электронов на молекулярный кислород, выступают флавопротеиды, получило название «флавинового дыхания». В основном при флавиновом дыхании осуществляется двухэлектронный перенос на O_2 . Так, у молочнокислых бактерий рода *Streptococcus* 90% поглощенного O_2 восстанавливается до H_2O_2 .

Наконец, у некоторых прокариот обнаружены оксидазы флавопротеидной природы, катализирующие прямое окисление субстратов, например пировиноградной и молочной кислот, молекулярным кислородом:



Общая черта перечисленных выше путей электронного транспорта с участием одного-двух посредников на O_2 — протекание реакций в цитозоле клетки, т. е. вне связи с клеточными мембранами, и отсутствие при этом запасаения клеткой полезной энергии.

Принципиально важным шагом на пути создания электронтранспортных систем, приводящим к получению клеткой энергии, явилось встраивание электронных переносчиков в мембрану.

Формирование связанных с мембраной путей переноса электронов в анаэробных условиях

В клетках первично анаэробных прокариот обнаружены короткие пути переноса электронов, осуществляемого с помощью мембрансвязанных переносчиков. В некоторых случаях такой перенос сопровождается перемещением протонов через мембрану и приводит к образованию $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ и синтезу АТФ. Одним из наиболее изученных путей такого типа является фумаратредуктазная система, приводящая к восстановлению фумарата до сукцината.

Восстановление фумарата до сукцината, обнаруженное у многих прокариот, может быть использовано для анаболических целей (необходимость сукцината для синтеза тетрапирролов) или же в катаболических процессах. В последнем случае все компоненты реакции могут быть растворимыми, и тогда процесс служит только для акцептирования электронов (рис. 101, А), или же находится в связанном с мембраной состоянии (рис. 101, Б—Г). По имеющимся данным, это не всегда приводит к синтезу АТФ. Образование протонного градиента на мембране при переносе электронов на фумарат зависит от состава и расположения электронных переносчиков.

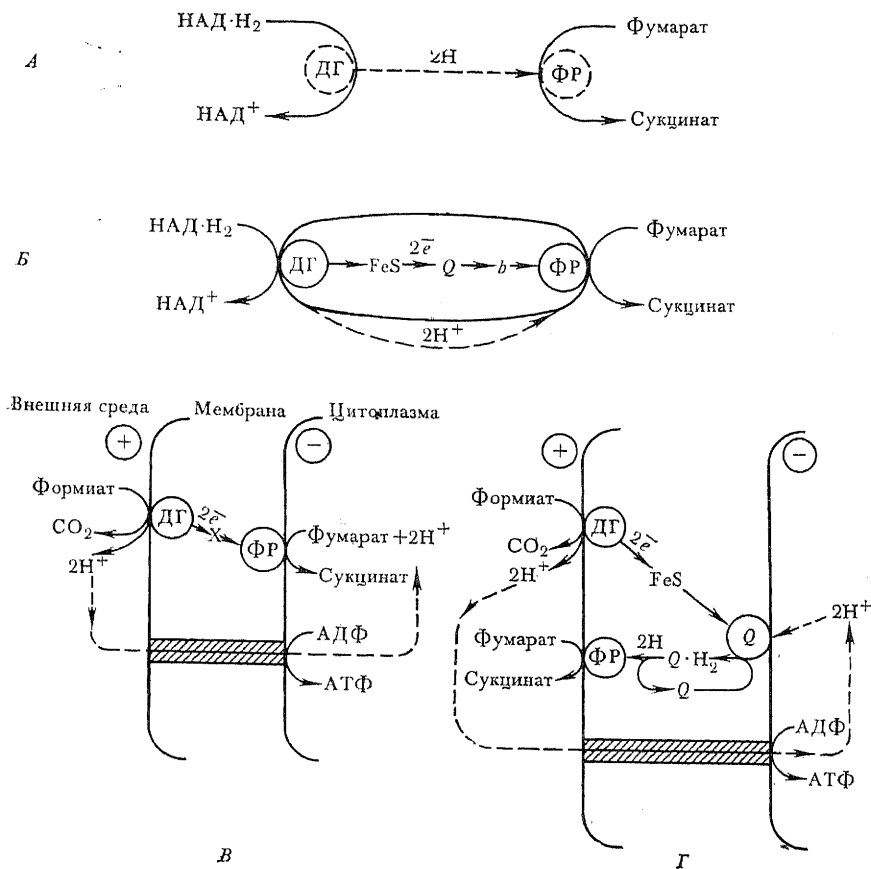


Рис. 101. Схематическое изображение функционирования фумаратредуктазной системы в растворимом (А) и связанном с мембраной (Б, В, Г) состоянии.

Пунктиром обведены растворимые ферменты и изображены пути переноса Н и Н⁺ в цитозоле клетки; ДГ — дегидрогеназа; ФР — фумаратредуктаза; Q — переносчик хинонной природы; b — цитохром b; FeS-железосеро-содержащий белок; X — электронный переносчик неизвестной природы

Донорами электронов для восстановления фумарата могут служить НАД·Н₂, лактат, формиат или молекулярный водород, от которых электроны с помощью субстратспецифических дегидрогеназ переносятся на связанные с мембраной переносчики (рис. 101, Б). Среди переносчиков идентифицированы FeS-белки, менахинон и цитохромы типа b, однако перенос такого типа не связан с получением клеткой энергии.

Для образования протонного градиента в некоторых случаях достаточно, чтобы донор электронов и их конечный акцептор были расположены на разных сторонах мембраны. Поступление электронов на переносчик, локализованный на внешней стороне мембраны, приводит к выделению протонов в среду, а восстановление фумарата на другой стороне мембраны сопровождается их поглощением из цитоплазмы, при этом переноса протонов через мембрану не происходит. Разрядка образующегося протонного градиента с помощью АТФазы будет приводить к синтезу АТФ (рис. 101, В). Если донор и акцептор электронов локализованы на одной стороне мембраны, тогда создание

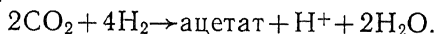
протонного градиента обеспечивается сочетанием переноса электронов и водорода по цепи, содержащей несколько переносчиков (рис. 101, Г). Перенос водорода через мембрану осуществляется с помощью хинонов. Дальнейшее усовершенствование электронного транспорта связано с включением в мембрану цитохромов.

Возможность синтеза АТФ при переносе электронов от НАД·Н₂, формиата, лактата, Н₂ на фумарат подтверждается соответствующими значениями окислительно-восстановительных потенциалов доноров и конечного акцептора электронов (см. табл. 13).

Функционирующее в системе клеточного катаболизма восстановление фумарата до сукцината обнаружено у ряда прокариот, получающих энергию в процессе брожения. Одним из этапов на пути образования пропионовой кислоты при пропионовокислом брожении является восстановление фумарата до сукцината, катализируемое фумаратредуктазой (см. рис. 58). Фумаратредуктаза найдена также у некоторых клостридий и молочнокислых стрептококков.

Хорошо известен связанный с мембраной фермент сукцинатдегидрогеназа, катализирующая в ЦТК окисление сукцината до фумарата. Водород, акцептируемый в этой реакции флавинадениндинуклеотидом (ФАД), непосредственно поступает в дыхательную цепь (см. рис. 102). Поскольку фумаратредуктаза и сукцинатдегидрогеназа катализируют одну и ту же реакцию, но в разных направлениях, первоначально считали, что это один фермент. Сейчас показано, что реакции катализируются разными ферментными белками. Информация о них содержится в разных генах. Синтез сукцинатдегидрогеназы индуцируется в аэробных, а фумаратредуктазы — в анаэробных условиях.

Некоторые клостридии (*Clostridium aceticum*, *C. formicoaceticum*, *C. thermoaceticum* и ряд других) оказались способными синтезировать ацетат из СО₂ и Н₂:



C. aceticum может расти на среде, содержащей молекулярный водород и СО₂ в качестве единственных источников энергии. Следовательно, у этого организма восстановление СО₂ до ацетата должно быть связано с получением полезной энергии. Обнаружено, что в переносе электронов от Н₂ на СО₂, ведущем к синтезу ацетата, участвуют флаводоксин, менахиноны и цитохромы типа *b*, т. е. переносчики того же типа, что и при функционировании фумаратредуктазной системы.

Таким образом, у ряда первичных анаэробных прокариот, получающих энергию в процессах брожения, сформировались короткие связанные с мембраной электронтранспортные цепи, функционирование которых ведет к образованию протонного градиента, используемого для синтеза АТФ. Из-за отсутствия подходящего конечного акцептора электронов в анаэробных условиях выход энергии в такого типа процессах низкий. Однако принципиальные основы для создания энергетики нового типа сформированы.

Для перехода к использованию энергии света необходимо было создание фоторецепторных молекул и «подключение» части из них к имеющимся электронтранспортным цепям. Такие фоторецепторы — Mg-порфирины — были сформированы; вероятно, они возникли из Fe-порфиринов (цитохромов) в результате модификации пути их синтеза. Фотосинтез начался, видимо, с создания системы фотоиндуцированного циклического электронного транспорта и служил сначала в качестве источника энергии, дополнительного к основному, которым являлись процессы брожения. Восстановитель первичные фотосинтезирующие прокариоты могли получать теми же путями, что и бродиль-

щики, или же тратя для этого часть синтезированного АТФ в процессе обратного переноса электронов. Позднее для этой цели была сформирована способность прямого фотовосстановления НАД⁺, приведшая к созданию светозависимого нециклического электронного транспорта. Дальнейшее усовершенствование фотосинтетического аппарата привело к использованию воды в качестве донора электронов, побочным продуктом чего явилось образование молекулярного кислорода.

В результате фотосинтетического выделения O₂ появилось химическое соединение, служащее активным окислителем. В ответ на появление O₂ большинством прокариот были выработаны различные механизмы защиты. У некоторых линий приспособление к O₂ на этом закончилось, в результате возникли анаэробные формы с разной степенью аэротолерантности.

Следующий важный шаг в формировании механизма использования молекулярного кислорода в качестве конечного акцептора электронов — использование этого процесса, таящего в себе большие энергетические возможности, для получения клеткой энергии. Действительно, количество энергии, освобождающейся при переносе пары электронов, зависит как от природы донора, так и от природы акцептора электронов. Например, окислительно-восстановительный потенциал НАД·Н₂ равен —320 мВ, а молекулярного кислорода +810 мВ, т. е. разница потенциалов при переносе электронов от НАД·Н₂ на молекулярный кислород более 1000 мВ. Для образования 1 молекулы АТФ необходим перенос пары электронов по электрохимическому градиенту, соответствующему разнице потенциалов приблизительно 200 мВ.

Для использования O₂ в качестве конечного акцептора электронов в процессах, связанных с получением метаболической энергии, представлялось наименее сложным превратить фотосинтетический электронный транспорт в дыхательный. С этой целью надо было добавить дегидрогеназы на низкопотенциальный конец цепи и цитохромоксидазы — на другой, взаимодействующий непосредственно с O₂ конец. Все необходимые типы переносчиков и обратимые протонные АТФазы уже были к этому времени сформированы.

Основная задача сводилась к созданию ферментной системы для четырехэлектронного восстановления O₂ (цитохромоксидазы), при котором не освобождалось бы его токсических промежуточных продуктов.

Фосфорилирование, сопряженное с переносом электронов от субстратов в темновых окислительных реакциях, получило название окислительного фосфорилирования. Развитие механизма окислительного фосфорилирования позволило добиться наиболее полного извлечения свободной энергии из окисляемых субстратов.

Таким образом, появление молекулярного кислорода положило начало эволюции новых типов жизни в мире прокариот, в основе которых лежит получение энергии за счет процессов окислительного фосфорилирования. Краткому обсуждению этих форм жизни посвящена следующая глава.

ГЛАВА 12

ТИПЫ ЖИЗНИ, ОСНОВАННЫЕ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОМ ФОСФОРИЛИРОВАНИИ

Для того чтобы максимально использовать энергетические возможности, заложенные в процессе переноса электронов от субстрата на молекулярный кислород, необходимо было: 1) сформировать механизмы, позволяющие полностью отщеплять водород (электроны) от субстрата; 2) создать системы, в которых весь отщепленный водород (электроны) передается на молекулярный кислород наиболее рациональным путем; 3) образовать механизмы, при помощи которых энергия электронного переноса трансформируется в химическую энергию, доступную для использования во всех энергозависимых процессах клетки. В ходе эволюции эти задачи были решены следующим образом:

1. Полное отщепление водорода от органического субстрата достигается в результате функционирования цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) или окислительного пентозофосфатного цикла (гл. 9). Если энергетическим субстратом являются неорганические соединения, для их окисления также были сформированы ферментативные реакции, катализируемые соответствующими дегидрогеназами.

2. Перенос водорода (электронов) на молекулярный кислород осуществляется с помощью системы структурно и функционально взаимосвязанных переносчиков, составляющих в совокупности так называемую «дыхательную цепь».

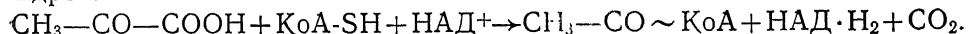
3. Энергетические возможности переноса электронов по электрохимическому градиенту реализуются в результате функционирования механизмов, сопрягающих электронный транспорт с фосфорилированием.

Рассмотрим несколько более подробно, как была решена каждая задача, при этом нам представляется более удобным сначала изложить максимум того, что достигнуто природой в процессе эволюции, а уже затем — какие варианты на пути формирования аналогичных механизмов обнаружены в мире прокариот.

Цикл трикарбоновых кислот

ЦТК можно рассматривать как выработанный клеткой механизм, имеющий двойное назначение. Основная функция его заключается в том, что это совершенный клеточный «котел», в котором осуществляется полное окисление вовлекаемого в него органического субстрата и отщепление водорода. Другая функция цикла — снабжение клетки рядом предшественников для биосинтетических процессов.

Обычно ЦТК является дальнейшей «надстройкой» над анаэробными энергетическими механизмами клетки. Исходным субстратом ЦТК служит ацетил-КоА («активированная уксусная кислота»), образующийся у аэробов из пирувата в реакции, осуществляемой пируватдегидрогеназным комплексом:



Собственно ЦТК (рис. 102) начинается с конденсации ацетил-КоА с молекулой щавелевоуксусной кислоты (ЩУК), катализируемой цитратсинтазой, относящейся к числу аллостерических ферментов, ингибируемых АТФ и восстановленным НАД. Продуктами реакции являются лимонная кислота и свободный кофермент А. Лимонная кислота с помощью фермента аконитазы превращается в *цис*-аконитовую и изолимонную кислоты. Последняя превращается в α -кетоглутаровую кислоту в реакции, катализируемой ферментом изоцитратдегидрогеназой. На первом этапе реакции имеет место дегидрирование изолимонной кислоты, в результате которого образуется щавелевоянтарная кислота и НАД·Н₂. На втором этапе щавелевоянтарная кислота, все еще, вероятно, связанная с ферментом, подвергается декарбоксилированию. Продукты реакции — α -кетоглутаровая кислота, освобождающаяся от фермента, и СО₂.

Изоцитратдегидрогеназа существует в двух формах, одна из которых зависит от НАД, другая от НАДФ. Окисление изолимонной кислоты в ЦТК катализирует НАД-зависимый фермент, относящийся к числу аллостерических: он активируется АДФ и ингибируется АТФ и НАД·Н₂. Активность изоцитратдегидрогеназы прямо влияет на «производительность» процесса, так как именно эта реакция лимитирует скорость оборотов цикла.

α -Кетоглутаровая кислота подвергается далее окислительному декарбоксилированию, катализируемому α -кетоглутаратдегидрогеназным комплексом, в результате чего образуется сукцинил-КоА. Эта реакция — единственная необратимая реакция из десяти, составляющих ЦТК. Один из продуктов реакции — сукцинил-КоА — представляет собой соединение, содержащее высокоэнергетическую тиоэфирную связь.

Следующий ферментативный этап — образование янтарной кислоты (сукцината) из сукцинил-КоА, катализируемое сукцинилтиокиназой, в результате которого энергия, освобождающаяся при разрыве тиоэфирной связи, запасается в фосфатной связи ГТФ. ГТФ затем отдает свою фосфатную группу молекуле АДФ, что приводит к образованию АТФ. Следовательно, на данном этапе ЦТК имеет место субстратное фосфорилирование.

Янтарная кислота окисляется в фумаровую с помощью фермента сукцинатдегидрогеназы. Далее фумаровая кислота гидратируется под действием фумаразы, в результате чего возникает яблочная кислота, которая подвергается дегидрированию, приводящему к образованию ЩУК. Реакция катализируется НАД-зависимой малатдегидрогеназой. Этой реакцией завершается ЦТК, так как вновь регенерируется молекула-акцептор (ЩУК), запускающая следующий оборот цикла.

Однако поскольку из цикла происходит постоянный отток для биосинтезов промежуточных метаболитов, приводящий к понижению уровня ЩУК, возникает необходимость в ее дополнительном синтезе. Это обеспечивается как в реакциях карбоксилирования пирувата или фосфоенолпирувата (см. табл. 25), так и с помощью последовательности из двух реакций, получивших название глиоксилатного шунта (рис. 102). В первой из них изолимонная кислота под действием изоцитратлиазы расщепляется на янтарную и глиоксилую кислоты. Во второй реакции, катализируемой малатсинтетазой, глиоксилатная кислота конденсируется с ацетил-КоА с образованием яблочной кислоты, превращающейся далее в ЩУК. В результате двух новых реакций происходит синтез С₄-кислоты из двух С₂-остатков. Глиоксилатный шунт не работает при выращивании на субстратах, катаболизирование

которых приводит к образованию пировиноградной кислоты. Он включается при выращивании организмов на C_2 -соединениях.

Энергетическим «топливом», перерабатываемым в ЦТК, служат не только углеводы, но и жирные кислоты (после предварительной деградации до ацетил-КоА), а также многие аминокислоты (после удаления аминогруппы в реакции дезаминирования или переаминирования). В результате одного оборота цикла происходит 2 декарбоксилирования, 4 дегидрирования и 1 фосфорилирование. Итогом 2 декарбоксилирований является выведение из цикла 2 атомов углерода (2 молекулы CO_2), т. е. ровно столько, сколько его поступило в виде ацетильной группы. В результате 4 дегидрирований образуются 3 молекулы $НАД \cdot H_2$ и 1 молекула $ФАД \cdot H_2$. Как можно видеть, в процессе описанных выше превращений весь водород оказывается на определенных переносчиках и задача теперь — передать его через другие переносчики на молекулярный кислород.

Как представлено это у прокариот? С определенными последовательностями ферментативных реакций, аналогичных тем, которые имеют место в ЦТК, мы встречаемся у прокариот, находящихся на разных этапах эволюционного развития. Некоторые из реакций цикла функционируют в анаэробных условиях у бактерий, получающих энергию в процессах брожения.

У пропионовых бактерий в последовательность реакций брожения, ведущих к синтезу пропионовой кислоты, «вмонтированы» реакции от янтарной кислоты до ЩУК, аналогичные таковым ЦТК, но идущие в противоположном направлении и связанные на двух этапах с восстановлением субстратов реакций (см. рис. 58). В пропионовокислом брожении эти реакции функционируют для акцептирования водорода, являясь одним из вариантов решения донор-акцепторной проблемы в анаэробных условиях.

У других прокариот мы встречаемся с более полно сформированной последовательностью реакций, аналогичных ЦТК, но еще не замкнутых в полный цикл. Наиболее часто отсутствует ферментативный этап превращения α -кетоглутаровой кислоты в янтарную, в результате чего ЦТК представляется как бы «разорванным» (см. рис. 92). «Разорванный» ЦТК обнаружен у бактерий, осуществляющих бескислородный фотосинтез, цианобактерий, хемоавтотрофов и у некоторых хемогетеротрофных бактерий. Вероятно, в таком виде ЦТК не может функционировать в системе энергодающих механизмов клетки. В этом случае его основная функция — биосинтетическая. Тот факт, что «разорванный» ЦТК встречается у различных далеко отстоящих друг от друга физиологических групп прокариот, говорит о сложных путях эволюции данного механизма. Этот вопрос требует своего объяснения.

Дыхательная цепь. Перенос электронов по дыхательной цепи

Электроны с восстановленных переносчиков ($НАД \cdot H_2$, $НАДФ \cdot H_2$, $ФАД \cdot H_2$), образующихся при функционировании ЦТК или окислительного пентозофосфатного цикла, поступают в дыхательную цепь, где проходят через ряд этапов, опускаясь постепенно на все более низкие энергетические уровни, и акцептируются соединением, служащим конечным акцептором электронов. Перенос электронов приводит к значительному изменению свободной энергии в системе. В наиболее совершенном виде и единообразии дыхательная цепь предстает у эукариот,

где она локализована во внутренней мембране митохондрий. У прокариот дыхательные цепи поражают разнообразием своей конкретной организации при сохранении принципиального сходства в строении и функционировании.

Дыхательные электронтранспортные цепи состоят из большого числа локализованных в мембране переносчиков, с помощью которых электроны передаются или вместе с протонами, т. е. в виде атомов водорода, или без них. Компонентами цепи, локализованными в мембране, являются переносчики белковой (флавопротеиды, FeS-белки, цитохромы) или небелковой (хиноны) природы. Флавопротеиды и хиноны осуществляют перенос атомов водорода, а FeS-белки и цитохромы — электронов.

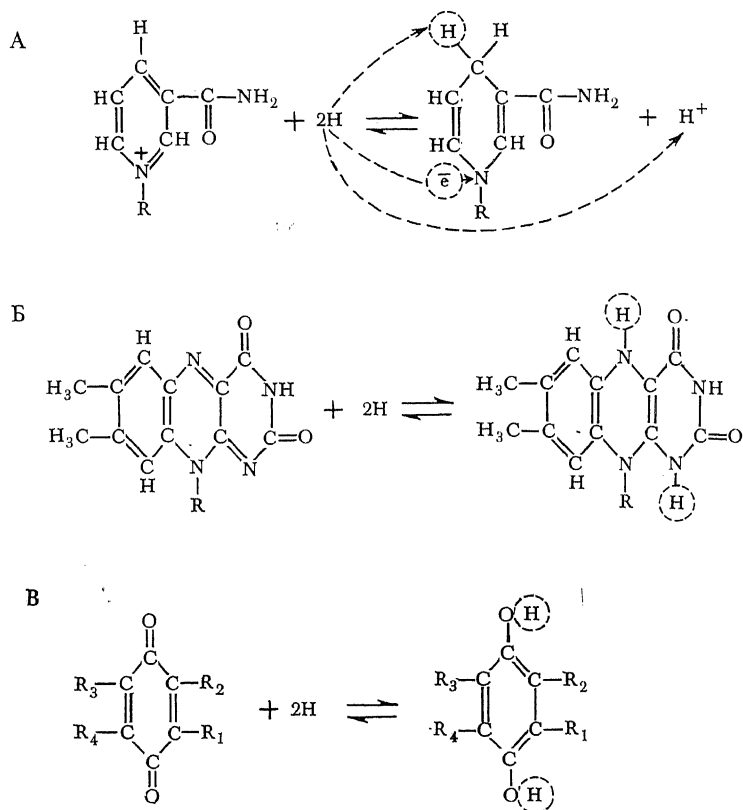


Рис. 103. Механизмы обратимого окисления и восстановления некоторых переносчиков водорода:
 А — пиридиновое кольцо НАД(Ф); Б — изоаллоксазиновое кольцо рибофлавина ФМН или ФАД; В — хиноидное кольцо. Присоединенные атомы водорода и электрон пиридинового кольца обведены пунктиром (по Dagley, Nicholson, 1973)

НАД(Ф)-зависимые дегидрогеназы, катализирующие отрыв водорода от молекул различных субстратов и передающие его на стартовый переносчик дыхательной цепи — НАД(Ф)·Н₂-дегидрогеназу, — растворимые ферменты. Дегидрогеназы флавопротеидной природы, выполняющие аналогичную функцию, могут быть локализованными в мембране (например, сукцинатдегидрогеназа) или существовать в растворимой форме (ацетил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот). Водород с них поступает в дыхательную цепь на уровне хинонов.

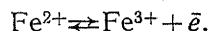
Известно более 250 НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ, активно участвующих в реакциях промежуточного обмена. Но не все из них имеют отношение к энергетическому метаболизму. С помощью дегидрогеназ осуществляется перенос гидрид-иона ($2\bar{e} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}^-$) от субстрата к НАД(Ф), при этом в среду переходит протон (рис. 103, А). Атом водорода входит в состав пиридинового кольца, а электрон присоединяется к азоту пиридинового кольца. После восстановления НАД(Ф)·Н₂ отщепляется от активного центра фермента и переносится к мембране, где акцептируется флавиновой дегидрогеназой и передает ей восстановительные эквиваленты. Одновременно к дегидрогеназе, освобожденной от кофермента, присоединяется окисленная молекула НАД(Ф), поступающая из среды. Таким образом, особенность НАД(Ф) — их подвижность, позволяющая им курсировать от молекул — доноров электронов, находящихся в цитоплазме, к акцепторам электронов, локализованным в мембране.

В состав флавиновых дегидрогеназ входят флавиновые нуклеотиды, прочно связанные с апоферментом и не отщепляющиеся от него ни на одной из стадий каталитического цикла. Окислительно-восстановительные свойства флавопротеидов обусловлены способностью изоаллоксазинового кольца рибофлавина к обратимому переходу из окисленного состояния в восстановленное, при котором происходит присоединение к кольцу 2 электронов в составе атомов водорода (рис. 103, Б). При изучении дыхательных цепей особенно интересны два связанных с мембраной флавопротеида: сукцинатдегидрогеназа, катализирующая окисление сукцината в ЦТК, и НАД·Н₂-дегидрогеназа, катализирующая восстановление своей флавиновой простетической группы НАД(Ф)·Н₂.

Участие в дыхательном электронном транспорте принимают белки, содержащие железосероцентры (см. рис. 63). Они входят в состав некоторых флавопротеидов, например сукцинат- и НАД(Ф)·Н₂-дегидрогеназ, или же служат в качестве единственных простетических групп белков. Дыхательные цепи содержат большое число FeS-центров. В митохондриальной электронтранспортной цепи функционирует, вероятно, около дюжины таких белков. В зависимости от строения FeS-центры могут осуществлять одновременный перенос 1 или 2 электронов, что связано с изменением валентности атомов железа.

Хиноны — жирорастворимые соединения, имеющие длинный терпеноидный «хвост», связанный с хиноидным ядром, способным к обратимому окислению — восстановлению путем присоединения 2 атомов водорода (рис. 103, В). Наиболее распространен убихинон, функционирующий в дыхательной цепи на участке между флавопротеидами и цитохромами. В отличие от остальных электронных переносчиков хиноны не связаны со специфическими белками. Небольшой фонд убихинона растворен в липидной фазе мембраны.

Цитохромы, принимающие участие на заключительном этапе цепи переноса электронов, представляют собой группу белков, содержащих железопорфириновые простетические группы (гемы). С помощью цитохромов осуществляется перенос электронов, в процессе которого меняется валентность входящего состава цитохромов железа:



В митохондриях эукариот обнаружено пять цитохромов (b, c, c₁, a, a₃), различающихся между собой спектрами поглощения и окислительно-восстановительными потенциалами. Различия по этим параметрам обусловлены белковыми компонентами цитохромов, природой боковых цепей их порфиринов и способом присоединения гема к бел-

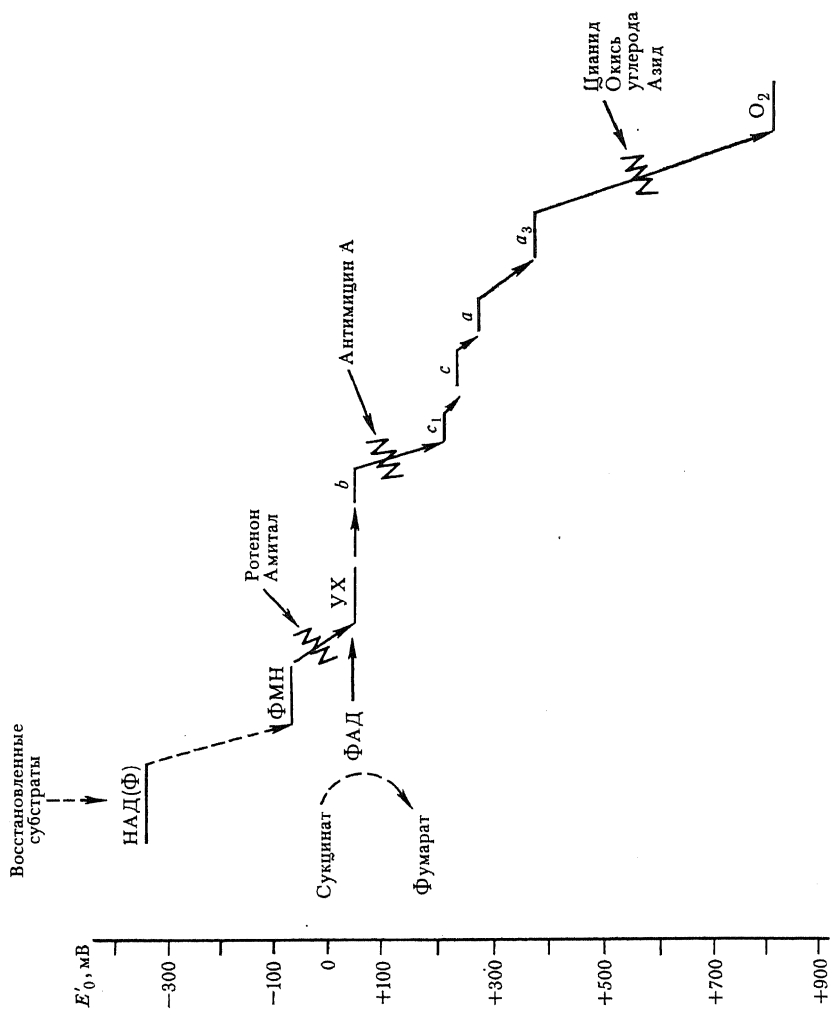


Рис. 104. Схема переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий:
 ФМН — простетическая группа НАД(Ф) · Н₂-дегидрогеназы; ФАД — простетическая группа сукцинатдегидрогеназы; УХ — убихинон; *b*, *c*₁, *c*, *a*, *a*₃ — цитохромы.
 Сплошными линиями обозначены процессы, протекающие в мембране; прерывистыми — в цитозоле клетки; зигзагообразной линией показаны места действия ингибиторов

кам. Конечные цитохромы ($a+a_3$) передают электроны на молекулярный кислород, представляя собой собственно цитохромоксидазу, в реакционном центре которой содержатся помимо двух гемов два атома меди. Образование воды имеет место при переносе на молекулу кислорода 4 электронов. Некоторые цитохромоксидазы осуществляют перенос только 2 электронов на молекулу кислорода, следствием чего является возникновение перекиси водорода. Перекись водорода далее разрушается каталазой или пероксидазой.

Таким образом, дыхательная цепь переноса электронов в митохондриях состоит из большого числа промежуточных переносчиков, осуществляющих электронный транспорт с органических субстратов на O_2 . Последовательность их расположения, представленная на рис. 104, подтверждается различного рода данными: значениями окислительно-восстановительных потенциалов переносчиков, ингибиторным анализом.

Обнаружены ингибиторы, специфически действующие на определенные участки дыхательной цепи. Амитал и ротенон блокируют перенос электронов на участке до цитохрома b , действуя предположительно на НАД(Ф)· H_2 -дегидрогеназу. Антибиотик А (антибиотик, продуцируемый *Streptomyces*) подавляет перенос электронов от цитохрома b к цитохрому c_1 . Цианид, окись углерода и азид блокируют конечный этап переноса электронов от цитохромов $a+a_3$ на молекулярный кислород, ингибируя цитохромоксидазу. Если блокировать перенос электронов в электронтранспортной цепи определенными ингибиторами, то переносчики, находящиеся на участке от субстрата до места действия ингибитора, будут в восстановленной, а переносчики за местом действия ингибитора — в окисленной форме.

Какие формы организации дыхательной цепи обнаружены в мире прокариот, т. е. на определенных подступах к ее окончательному формированию? Группы первично анаэробных хемогетеротрофных прокариот не имеют развитой системы связанного с мембранами электронного транспорта. Полностью сформированной системой дыхательного электронного транспорта обладают фотосинтезирующие прокариоты: цианобактерии, многие пурпурные бактерии (в наибольшей степени дыхание развито у несерных пурпурных бактерий). Все облигатно и факультативно аэробные хемотрофные прокариоты имеют дыхательные цепи.

У разных групп прокариот они значительно различаются по составу, что выражается: 1) в замене одних переносчиков другими со сходными свойствами (убихинон — менахинон, цитохромы aa_3-o и т. д.); 2) в добавлении или удалении какого-либо переносчика (например, цитохрома c); 3) разветвлении на уровне первичных дегидрогеназ, являющемся результатом множества мест включения восстановительных эквивалентов с окисляемых субстратов в цепь, и ветвлении, связанном с присутствием 2 или более цитохромоксидаз. Дыхательные цепи некоторых хемогетеротрофных прокариот приведены на рис. 105.

Запасание клеточной энергии в процессе дыхания.

Окислительное фосфорилирование

Вся система переноса электронов от субстрата на молекулярный кислород через длинную цепь переносчиков представлялась бы нерационально громоздкой, если бы единственной целью процесса было соединение электронов с молекулярным кислородом. Другое назначение этого механизма состоит в запасании освобождающейся в процес-

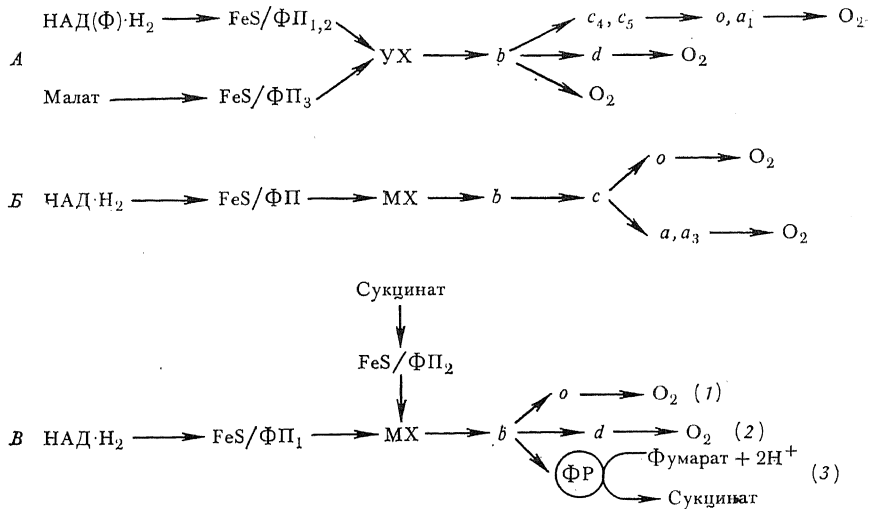


Рис. 105. Дыхательные цепи *Azotobacter vinelandii* (А), *Micrococcus lysodeikticus* (Б) и *Escherichia coli* (Б) в аэробных (1), микроаэробных (2) и анаэробных (3) условиях: ФП — флавопротеид; FeS — железосероцентр; УХ — убихинон; МХ — менахинон; ФР — фумаратредуктаза; b, c, d, o, a — цитохромы

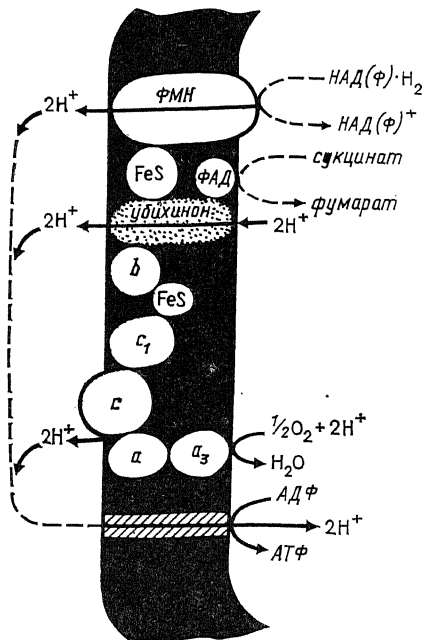


Рис. 106. Топография компонентов дыхательной цепи митохондрий: ФМН — простетическая группа НАД(Ф)·Н₂-дегидрогеназы; ФАД — простетическая группа сукцинатдегидрогеназы; FeS — железосеросодержащий белок; b, c₁, c, a, a₃ — цитохромы

ной цепи и связана с функционированием НАД(Ф)·Н₂-дегидрогеназы. Второй генератор $\Delta\mu_{H^+}$ определяется способностью убихинона

се электронного переноса энергии путем трансформирования ее в химическую энергию фосфатных связей.

Имеющиеся экспериментальные данные подтверждают выдвинутый в начале 60-х гг. английским биохимиком П. Митчеллом хемосмотический механизм энергетического сопряжения электронного транспорта с фосфорилированием. Заслуга П. Митчелла в том, что он «обратил внимание» на судьбу протонов при электронном транспорте, которые переносятся в этом процессе через мембрану в одном направлении, создавая градиент концентрации H^+ по обе стороны мембраны (см. рис. 25). Перенос электронов и протонов обеспечивается определенным сорасположением мембранных переносчиков, а также свойствами самой мембраны, в первую очередь ее непроницаемостью для протонов.

В митохондриях на 3 участках окислительной цепи происходит выделение протонов во внешнюю среду. Соответственно 3 реакции ведут к образованию $\Delta\mu_{H^+}$ (рис. 106). Первая локализована в начале дыхатель-

переносить водород. Последний локализован в конце дыхательной цепи и связан с активностью цитохромоксидазы.

Так как синтез молекулы АТФ связан с переносом 2 протонов через локализованную в мембране АТФазу, а при окислении НАД(Ф)·Н₂ молекулярным кислородом, т. е. поступлении 2 электронов на 1/2 О₂ выделяются 6Н⁺, следовательно, максимальный выход АТФ в этом процессе составляет 3 молекулы. Для количественной оценки эффективности фосфорилирования при переносе электронов используют отношение Р/О, означающее количество потребленных молекул неорганического фосфата, приходящихся на 1 поглощенный атом кислорода. Действительно, на препаратах изолированных митохондрий было показано, что при переносе водорода от изолимонной или яблочной кислот на НАД⁺, а затем на молекулярный кислород отношение Р/О равно 3. При окислении янтарной кислоты, водород которой переносится на сукцинатдегидрогеназу и далее на убихинон, возможны только 2 фосфорилирования, так как при этом выпадает участок дыхательной цепи, где локализован первый генератор Δμ_{H⁺}. Таким образом, место включения электронов от разных субстратов в цепь их дальнейшего транспорта определяет число функционирующих протонных помп в дыхательной цепи.

Теперь можно подвести итог тому, каков энергетический выход при окислении молекулы глюкозы, осуществляемом в максимально отлаженной энергетической системе, функционирующей в эукариотных клетках: гликолиз→ЦТК→дыхательная цепь митохондрий. На первом этапе в процессе гликолитического разложения 1 молекулы глюкозы образуются по 2 молекулы пирувата, АТФ и НАД·Н₂. Конечными продуктами реакции окислительного декарбоксилирования 2 молекул пирувата, катализируемой пируватдегидрогеназным комплексом, являются 2 молекулы ацетил-КоА и НАД·Н₂. Окисление 2 молекул ацетил-КоА в ЦТК приводит к образованию 6 молекул НАД·Н₂ и по 2 молекулы ФАД·Н₂ и АТФ. Перенос каждой пары электронов с НАД·Н₂, если принять Р/О равным 3, приводит к синтезу 30 молекул АТФ (2 молекулы НАД·Н₂ дает процесс гликолиза, 2 молекулы НАД·Н₂ — окислительное декарбоксилирование пирувата, 6 молекул НАД·Н₂ — ЦТК). Перенос каждой пары электронов с ФАД·Н₂ приводит к синтезу 2 молекул АТФ, т. е. при двух оборотах цикла это дает 4 молекулы АТФ. К этому следует прибавить 2 молекулы АТФ, образуемые в процессе гликолиза, и 2 молекулы АТФ, синтезируемые в ЦТК на этапе превращения сукцинил-КоА в янтарную кислоту. Итак, полное окисление 1 молекулы глюкозы в максимальном варианте приводит к образованию 38 молекул АТФ.

Для аэробных прокариот характерна меньшая степень сопряжения электронного транспорта в дыхательной цепи с фосфорилированием, проявляющаяся в низком значении коэффициента Р/О. В опытах, проводившихся с использованием препаратов бактериальных мембран, это отношение в большинстве случаев не превышало 1 (в этих же условиях на препаратах митохондрий высших организмов коэффициент Р/О, как правило, равен 3). Невысокое значение Р/О, полученное у прокариот, связано с тем, что в бактериальных дыхательных цепях локализовано меньше генераторов Δμ_{H⁺}, чем в митохондриальной дыхательной цепи. Нельзя также исключать и то обстоятельство, что в процессе получения препаратов бактериальных мембран нарушается их структурная целостность, а это приводит к резкому падению функциональной активности выделенных бактериальных мембран. У *E. coli*

и *Azotobacter vinelandii* отношение P/O равно 2, у *Corynebacterium diphtheriae* — 1, а у *Mycobacterium phlei* — 3. Все это позволяет сделать общий вывод о том, что дыхательные цепи бактерий весьма существенно отличаются от аналогичной системы, функционирующей в эукариотных клетках. Они менее стабильны по составу и значительно менее энергетически эффективны.

Все прокариоты, имеющие развитую систему электронного транспорта, сопряженного с генерированием энергии, можно разделить на две большие группы в зависимости от источника энергии, т. е. природы донора электронов. К первой группе относятся организмы, использующие в качестве источника энергии процессы окисления неорганических соединений, т. е. неорганические доноры электронов. Вторую группу составляют организмы, у которых донорами электронов служат различные органические соединения.

Вместо O₂ некоторые прокариоты могут в качестве конечного акцептора электронов использовать ряд окисленных органических или неорганических соединений (табл. 38). Этот процесс получил назва-

Таблица 38

Типы анаэробного дыхания у прокариот

Энергетический процесс	Конечный акцептор электронов	Продукты восстановления
Нитратное дыхание и денитрификация	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻	NO ₂ ⁻ , NO, N ₂ O, N ₂
Сульфатное и серное дыхание	SO ₄ ²⁻ , S ⁰	H ₂ S
Карбонатное дыхание	CO ₂	CH ₄ , ацетат
Фумаратное дыхание	фумарат	сукцинат

ние анаэробного дыхания. Энергия, освобождаемая при этом, и состав переносчиков определяются окислительно-восстановительными потенциалами акцепторов электронов. Анаэробные дыхательные цепи в целом содержат те же типы переносчиков, что и аэробные, но цитохром-оксидазы заменены в этом случае соответствующими редуктазами. Иные, нежели O₂, акцепторы электронов могут использоваться в этом качестве только в отсутствие O₂ в среде или же последний вообще не может служить акцептором электронов. В зависимости от этого прокариоты, осуществляющие анаэробное дыхание, относятся к облигатным или факультативным анаэробам. В качестве доноров электронов у этих прокариот служат органические или неорганические соединения.

Группы прокариот, использующих в качестве источника энергии неорганические соединения (хемолитотрофы)

Прокариоты, у которых источником энергии служат процессы окисления неорганических соединений, были обнаружены в конце XIX в., и их открытие связано с именем русского микробиолога С. Н. Виноградского.

Хемолитотрофы могут использовать довольно широкий круг неорганических соединений в качестве источников энергии, окисляя их в

процессе дыхания (табл. 39). Дыхательные цепи хемолитотрофов содержат те же типы переносчиков, что и хемоорганотрофов (флавиновые дегидрогеназы, хиноны, FeS-белки, цитохромы, цитохромоксидазы). Разнообразие наблюдается только на периферических участках энергетического метаболизма, так как для окисления неорганических

Таблица 39

Группы хемолитотрофных прокариот

Группа прокариот	Характеристика энергетического процесса			Способность к автотрофии
	донор электронов	акцептор электронов	конечные продукты*	
Тионовые бактерии	$H_2S, S^0, SO_3^{2-}, S_2O_3^{2-}$ и др.	O_2, NO_3^-	$SO_4^{2-}, SO_4^{2-}, NO_2^-, N_2$	+
Ацидофильные железобактерии	Fe^{2+}	O_2	Fe^{3+}	+
Нитрифицирующие бактерии	NH_4^+	O_2	NO_2^-	+
	NO_2^-		NO_3^-	
Водородные бактерии	H_2	O_2	H_2O	+
		NO_3^-, NO_2^-	H_2O, NO_2^-, N_2	
Карбоксидобактерии	CO	O_2	CO_2	+
Сульфатвосстанавливающие бактерии	H_2	SO_4^{2-}	H_2S	±**
Метанобразующие бактерии	H_2	CO_2	CH_4	±***

* Если акцептор электронов— O_2 , одним из конечных продуктов является вода.

** У отдельных представителей.

*** У большинства видов.

соединений, связанного с получением энергии, необходимы соответствующие ферментные системы. Например, у *Thiobacillus ferrooxidans*, получающего энергию в результате окисления двухвалентного железа, дыхательная цепь дополнена медьсодержащим белком рустиианином, непосредственно акцептирующим электроны с Fe^{2+} .

Используемые в качестве доноров электронов неорганические соединения различаются окислительно-восстановительными потенциалами. Это определяет место включения в дыхательную цепь электронов окисляемого субстрата. Например, при окислении H_2 водородными бактериями электроны с субстрата включаются в дыхательную цепь на уровне НАД⁺, при окислении Fe^{2+} железобактериями — на уровне цитохрома *c*, а при окислении NO_2^- нитрификаторами — на уровне цитохрома a_1 (рис. 107). В целом окисление прокариотами неорганических соединений (за исключением H_2) сопряжено с переносом электронов на цитохромы и приводит к освобождению небольших количеств энергии.

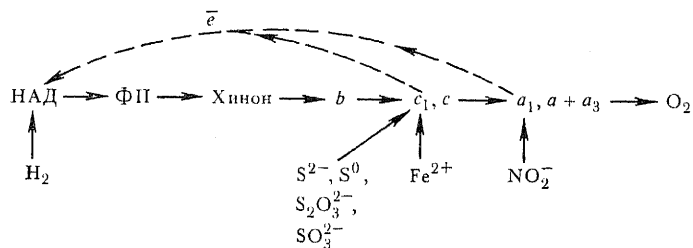


Рис. 107. Окисление различных неорганических субстратов аэробными хемолитотрофами с участием электронтранспортной цепи и восстановление НАД^+ в результате энергезависимого обратного переноса электронов. Обозначения см. рис. 105 (по Кондратьевой, 1983).

Для бактерий, осуществляющих окисление неорганических субстратов с положительным окислительно-восстановительным потенциалом (нитрификаторы, железобактерии), с этим связаны важные последствия. Включение электронов с субстрата на уровне цитохрома c приводит к тому, что в электронтранспортной цепи функционирует только один генератор $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$. Если при переносе 2 электронов с субстрата на молекулярный кислород организм способен осуществлять только 1 фосфорилирование, для обеспечения энергией ему необходимо «переработать» большое количество энергетического субстрата. Другое обстоятельство связано со следующим: включение электронов в дыхательную цепь на уровне цитохромов (минуя НАД^+) приводит к тому, что в этом процессе не образуется восстановитель — $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$, необходимый для биосинтетических процессов. Потребность в $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ особенно высока, если источником углерода для конструктивных процессов служит CO_2 .

Природа весьма остроумно решила эту проблему ценой дополнительных энергетических затрат: в тех случаях, когда место включения электронов с окисляемого субстрата находится ниже энергетического уровня, на котором образуется $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$, работает система обратного переноса электронов, т. е. работает «лифт», поднимающий электроны по дыхательной цепочке в сторону более отрицательного потенциала, необходимого для восстановления молекул НАД^+ . Процесс обратного транспорта электронов требует энергии, и часть молекул АТФ, получаемых за счет окислительного фосфорилирования на конечном этапе дыхательной цепи, тратится для образования восстановителя. Окисление соединений с положительным окислительно-восстановительным потенциалом происходит, таким образом, без участия флавопротеидов и хинонов. Эти переносчики функционируют только в процессе обратного переноса электронов. Следовательно, у таких прокариот дыхательная цепь работает в двух направлениях: осуществляет транспорт электронов для получения энергии в соответствии с термодинамическим потенциалом и перенос электронов против термодинамического потенциала, идущий с затратой энергии для того, чтобы синтезировать восстановитель (рис. 107).

Все это создает большую нагрузку на конечный этап дыхательной цепи. Действительно, показано, что у железобактерий и нитрификаторов конечный участок дыхательной цепи развит очень сильно: эти бактерии характеризуются исключительно высоким содержанием цитохромов c и a , во много раз превышающим их содержание у гетеротрофных прокариот. Рассмотрим теперь более подробно отдельные группы хемолитотрофных прокариот.

Бактерии, окисляющие соединения серы

В последнее время описано много представителей мира прокариот, способных окислять восстановленные соединения серы, например сероводород, тиосульфат, а также молекулярную серу. Это фототрофы, осуществляющие бескислородный фотосинтез, некоторые типичные гетеротрофные бактерии родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и других и группы так называемых бесцветных серобактерий и тионовых бактерий. Окисление серы и ее восстановленных соединений может служить источником клеточной энергии, электронов при фотосинтезе, использоваться для детоксификации образующейся при дыхании перекиси водорода.

Тионовые бактерии. Использование процесса окисления серы и ее неорганических восстановленных соединений для получения клеточной энергии экспериментально показано для группы тионовых бактерий, представленных в настоящее время 4 родами: *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Thiodendron* и *Sulfolobus*. Это одноклеточные организмы разной морфологии (палочковидные, близкие к сферическим, вибриодные, спиралевидные) и размеров (от 0,2—0,3 до 3—4 мкм); неподвижные или подвижные (движение осуществляется с помощью полярно расположенных жгутиков); бесспорные. Размножаются делением или почкованием. Все известные тионовые бактерии, за исключением представителей рода *Sulfolobus*, имеют клеточную стенку грамотрицательного типа. Клеточная стенка *Sulfolobus* не содержит пептидогликана, а построена из белково-липидного комплекса. Для некоторых представителей рода *Thiobacillus* характерна развитая система внутрицитоплазматических мембран. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК тионовых бактерий находится в диапазоне 37—68%; наибольшие различия по этому признаку характерны для представителей рода *Thiobacillus* (52—68%).

Для тионовых бактерий показана способность окислять с получением энергии помимо молекулярной серы (S^0) многие ее минеральные восстановленные соединения: сероводород (H_2S), тиосульфат ($S_2O_3^{2-}$), сульфит (SO_3^{2-}), тритионат ($S_3O_6^{2-}$), тетратионат ($S_4O_6^{2-}$). Некоторые тионовые бактерии способны получать энергию за счет окисления тиоционата (CNS^-), диметилсульфида (CH_3SCH_3), диметилдисульфида (CH_3SSCH_3), а также сульфидов тяжелых металлов. Там, где в качестве промежуточного продукта окисления образуется молекулярная сера, она всегда откладывается вне клетки. Для *Sulfolobus* и *Thiobacillus ferrooxidans* показана способность использовать для получения энергии окисление двухвалентного железа (Fe^{2+}).

Полное ферментативное окисление тионовыми бактериями молекулярной серы и различных ее восстановленных соединений приводит к образованию сульфата. Окисление сероводорода до сульфата сопровождается потерей 8 электронов, поступающих в дыхательную цепь, при этом в качестве промежуточных продуктов образуется молекулярная сера и сульфит:



Согласно другой точке зрения, также имеющей экспериментальную базу, в качестве первого продукта ферментативного окисления H_2S образуется связанный с мембраной сульфид-сульфгидрильный комплекс [RSS^-], окисляющийся далее через сульфит до сульфата. Молекулярная сера в этом случае не является прямым продуктом окисления сероводорода. Ее образование связано с побочными реакциями на пути

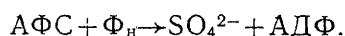
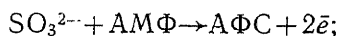
метаболизирования сульфида. В этом случае окисление H_2S до SO_4^{2-} может быть представлено следующим образом:



Окисление молекулярной серы (не растворимого в воде соединения) происходит после предварительного ее смачивания выделяемыми клеткой липидами с помощью локализованного в мембране фермента, в результате чего образуется сульфид-сульфгидрильный комплекс, также связанный с мембраной:



На этапе окисления сульфита до сульфата, протекающем с образованием аденилированного промежуточного соединения аденозинфосфосульфата (АФС), имеет место субстратное фосфорилирование, позволяющее запастись освобождающуюся при этом энергию в мелекулах АТФ:



Далее с помощью аденилаткиназы из АДФ синтезируется АТФ.

Основное же количество энергии тионовые бактерии получают в результате переноса образующихся при окислении восстановленной серы электронов, поступающих в дыхательную цепь, вероятнее всего, на уровне цитохрома *c* (рис. 107). Дыхательная цепь тионовых бактерий содержит все типы переносчиков, характерных для аэробных хемогетеротрофов. У представителей этой группы прокариот обнаружены флавопротеиды, убихиноны, FeS-белки, цитохромы типа *b*, *c*, цитохромоксидазы *o*, *d*, *a* + *a*₃.

В большинстве случаев конечным акцептором электронов служит молекулярный кислород, который не может быть заменен никаким другим акцептором. Рост отдельных штаммов возможен в микроаэробных условиях. Некоторые тионовые бактерии являются факультативными аэробами; они могут использовать в качестве конечного акцептора электронов не только O_2 , но и нитраты, восстанавливая их до N_2 (*Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*) или только до нитрита (*Thiobacillus thioparus*). В анаэробных условиях использование нитратов в качестве конечного акцептора электронов индуцирует синтез диссимиляционной нитратредуктазы, осуществляющей перенос электронов дыхательной цепи на нитраты. Описаны тиобациллы, способные расти в анаэробных условиях на средах, содержащих органические соединения. На минеральной среде их рост возможен только в аэробных условиях.

Большинство тионовых бактерий относится к облигатным хемолитоавтотрофам. Они способны все компоненты клетки строить из CO_2 , используя углерод органических соединений только в весьма ограниченной степени. Для таких тионовых бактерий CO_2 служит основным источником углерода, а окисление неорганических восстановленных соединений серы — единственным источником энергии. К облигатным хемолитоавтотрофам относятся *Thiobacillus denitrificans*, *T. thiooxidans*, *T. acidophilus*, *Thiomicrospira pelophila* и др.

Некоторые тионовые бактерии могут расти как в хемолитоавтотрофных, так и в хемоорганогетеротрофных условиях, используя в последнем случае в качестве источника углерода и энергии ряд органических соединений (кислоты, сахара, спирты, аминокислоты) (*Thiobacillus intermedius*, *T. novellus*, *T. organoparus*, *Sulfolobus acidocalda-*

rius). Наконец, описаны тионовые бактерии, которые могут расти, используя в качестве источника углерода только органические соединения, а энергию получают за счет окисления восстановленных соединений серы, т. е. являются хемолитогетеротрофами.

Основным механизмом ассимиляции CO_2 тионовыми бактериями служит цикл Кальвина, обнаруженный у всех изученных видов. Вспомогательную роль играют реакции карбоксилирования трехуглеродных соединений, в первую очередь фосфоенолпировиноградной кислоты.

Поскольку у тионовых бактерий место включения электронов в дыхательную цепь находится в основном на уровне цитохрома *c*, у них функционирует система обратного переноса электронов для обеспечения конструктивных процессов НАД· H_2 .

У разных представителей тионовых бактерий, способных расти, используя органические соединения, обнаружены активности ферментов гликолиза, окислительного пентозофосфатного пути, пути Энтнера — Дудорова. Описано функционирование «замкнутого» и «разорванного» ЦТК, а у некоторых тиобацилл — глиоксилатного шунта.

Тионовые бактерии поражают удивительной приспособленностью к условиям обитания. Такие виды, как *Thiobacillus thiooxidans* и *T. ferrooxidans*, представляют собой ярко выраженные ацидофилы. *T. thiooxidans* способен расти в кислой среде с рН приблизительно 0,6; оптимальным рН для его развития является область 2—4, при рН 7 этот организм расти не может. *T. denitrificans* и *T. thioparus*, наоборот, развиваются только в нейтральной и щелочной среде (в области рН 7—10). Большинство тиобацилл относятся к мезофилам с оптимальной температурой роста около 30°. В последнее время описаны термофильные штаммы, растущие при 60—70°. К тионовым бактериям отнесен и *Sulfolobus acidocaldarius*, сочетающий одновременно свойства ацидо- и термофильности. Рост его возможен в области рН от 1 до 5,8, а верхняя температурная граница роста определена при 85—90°.

Бесцветные серобактерии. По мнению ряда исследователей, бесцветные серобактерии очень напоминают цианобактерии, являясь как бы их непигментированными аналогами. На основании морфологических признаков бесцветные серобактерии делятся на две группы: одна представлена одноклеточными формами и включает 5 родов; в составе другой объединены 3 рода нитчатых организмов. Одноклеточные бесцветные серобактерии — крупные неподвижные (*Achromatium*) или подвижные формы, передвигающиеся с помощью многочисленных перитрихальных (*Thiovulum*) или одного толстого полярного жгутика (*Macromonas*); виды с мелкими клетками также могут быть подвижными (*Thiospira*) или неподвижными (*Thiobacterium*). Форма клеток сферическая, овальная, спиралевидная или слегка изогнутая. Нитчатые организмы представлены неподвижными (*Thiothrix*) или способными к скользящему движению (*Beggiatoa*, *Thioploca*) формами (см. рис. 45, 1).

Единственный общий признак группы — способность откладывать серу внутри клеток. Вопрос о значении, которое имеет окисление восстановленных соединений серы для этой группы прокариот, не ясен. С. Н. Виноградский, наблюдая в 1887—1889 г. в клетках *Beggiatoa* при выращивании на среде с H_2S отложение гранул серы и их последующее исчезновение после исчерпания сероводорода из среды, пришел к выводу, что энергия, освобождающаяся при окислении H_2S до S^0 и затем до SO_4^{2-} с участием O_2 , используется этим организмом для ассимиляции CO_2 . Таким образом, работая с *Beggiatoa*, С. Н. Вино-

градский сформулировал положение о принципиально новом способе существования прокариот — хемолитоавтотрофии. Однако позднее выяснилось, что культуры, с которыми работал С. Н. Виноградский, были нечистыми. И до настоящего времени изучение энергетического и конструктивного метаболизма этой группы бактерий тормозится из-за отсутствия чистых культур.

Для некоторых видов *Beggiatoa* получены данные в пользу того, что окисление H_2S может быть связано с запасанием клеточной энергии. В то же время показано, что окисление соединений серы этими организмами используется для удаления перекиси водорода, образующейся при дыхании и накапливающейся в культуре из-за недостаточно активного образования ею каталазы. Отложение молекулярной серы является, таким образом, результатом неспецифического взаимодействия находящихся в среде сульфидов с образующейся в культуре H_2O_2 . Перекисный механизм окисления восстановленных соединений серы исключает возможность использования организмами энергии этого процесса.

Вопрос о способности бесцветных серобактерий существовать автотрофно также пока не решен. Показано, что чистые культуры *Thio-*spira** могут расти только в присутствии органических соединений. У *Beggiatoa* не обнаружено типичных для прокариот механизмов автотрофной ассимиляции CO_2 . Все это заставляет склоняться в пользу того, что бесцветные серобактерии могут существовать только хемогетеротрофно. В микроаэробных условиях некоторые штаммы *Beggiatoa* обнаруживают способность к азотфиксации.

Распространение и роль в природе. Окисление неорганических восстановленных соединений серы с помощью фототрофных и хемотрофных прокариот является одним из звеньев круговорота серы в природе. В первом случае процесс протекает в анаэробных условиях, во втором — в аэробных. Хемотрофы, окисляющие серу, обитают в морских и пресных водах, содержащих O_2 , в аэробных слоях почв разного типа. Поскольку эта группа объединяет прокариот с разными физиологическими свойствами, ее представителей можно обнаружить в кислых горячих серных источниках (*Sulfolobus*), кислых шахтных водах (ацидофильные представители рода *Thiobacillus*), в водоемах со щелочной средой и высокой концентрацией $NaCl$.

Окисление восстановленных соединений серы до сульфатов, осуществляемое этими бактериями, приводит к подкислению окружающей среды, что может иметь положительные и отрицательные последствия. Так, подкисление почвы приводит к переводу некоторых соединений, например фосфатов, в растворимую форму, что делает их доступными для растений. Окисление нерастворимых сульфидных минералов, сопровождающееся переводом металлов в растворимую форму, облегчает их добычу. Однако накопление серной кислоты в результате деятельности этих бактерий может приводить к порче и разрушению различных сооружений.

Железобактерии

Способность осаждать окислы железа и марганца на поверхности клеток присуща многим прокариотам, различающимся морфологическими и физиологическими признаками и принадлежащим к разным таксономическим группам.

В вопросе о том, какие организмы следует относить к железобактериям, нет единого мнения. С. Н. Виноградский впервые термин «же-

лезобактерии» применил для обозначения организмов, использующих энергию окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} для ассимиляции CO_2 , т. е. способных существовать хемолитоавтотрофно. Х. Молиш к железобактериям относил все организмы, откладывающие вокруг клеток окислы железа или марганца независимо от того, связан ли этот процесс с физиологическими функциями организма. В настоящее время большинство исследователей придерживается последней точки зрения.

К накоплению вокруг клеток железобактерий окислов железа и марганца ведут разные процессы.

1. Часто железо и марганец образуют комплексы с рядом органических соединений. Последние используются некоторыми видами железобактерий, что приводит к освобождению окисного железа и марганца и выпадению их в осадок.

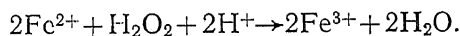
Если железо освобождается из подобного комплекса в закисной форме, в нейтральной или щелочной среде происходит его быстрое окисление — химическое или с помощью бактерий.

В присутствии O_2 устойчивость Fe^{2+} зависит от рН. При рН > 5—6 Fe^{2+} быстро химическим путем окисляется молекулярным кислородом. (К окислению в этих условиях оно устойчиво лишь в виде комплексов с органическими соединениями.) Образовавшееся окисное железо осаждается и концентрируется вокруг бактериальных клеток.

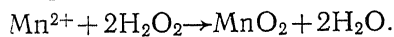
Марганец отличается значительно большей устойчивостью к окислению O_2 , чем железо. Его химическое окисление ($Mn^{2+} \rightarrow Mn^{4+}$) молекулярным кислородом с заметной скоростью происходит только при рН > 8,5. Поэтому в нейтральной среде окисление марганца имеет ферментативную природу.

2. Концентрирование вокруг клетки окислов железа и марганца возможно на основе различия электрических зарядов ионов металлов и клеточной поверхности, имеющей суммарный отрицательный заряд.

3. Отложение окислов железа и марганца вокруг клеток железобактерий может быть результатом взаимодействия ионов металлов с продуктами бактериального метаболизма, в частности с H_2O_2 , образующейся в процессе окисления органических веществ при переносе электронов по дыхательной цепи. Перекись водорода, возникающая в качестве промежуточного или конечного продукта окисления, выделяется из клеток и накапливается в окружающих их капсулах или чехлах. В нейтральной или слабокислой среде окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} будет происходить в результате непосредственного взаимодействия с H_2O_2 :



Окисление марганца осуществляется при взаимодействии с H_2O_2 и участии каталазы, выполняющей пероксидазную функцию. Mn^{2+} в этом случае служит донором электронов:



Описанные выше процессы протекают в капсулах и чехлах, в которых концентрируются все компоненты реакции: восстановленные формы железа и марганца, перекись водорода, каталаза.

Физиологический смысл процессов окисления Fe^{2+} и Mn^{2+} с участием H_2O_2 — детоксикация вредного продукта метаболизма. Ни в одном случае окисление железа и марганца не приводит к получению железобактериями энергии.

4. Наконец, среди железобактерий есть организмы, у которых окисление Fe^{2+} связано с получением энергии. В этом случае отложение окислов железа служит показателем активности энергетических процессов.

Успехи в изучении железобактерий (в широком понимании этого термина), достигнутые за последнее время и связанные в первую очередь с получением чистых культур ряда этих организмов, позволили пересмотреть таксономическое положение многих из них. На основании морфологических характеристик все железобактерии могут быть разделены на три группы: 1) нитчатые; 2) одноклеточные; 3) мелкие организмы, не имеющие клеточной стенки.

Нитчатые железобактерии. К первой группе относятся граммотрицательные нитчатые бактерии, окруженные чехлом. Наиболее широко распространенные организмы этой группы — представители родов *Leptothrix* и *Sphaerotilus* (см. рис. 46, 1, 2). Нити неподвижные (*Leptothrix*, *Sphaerotilus*, *Clonothrix* и др.) или передвигающиеся скольжением (*Spirothrix*, *Toxothrix* и др.). Клетки, образующие трихом, могут быть одного размера и формы или различаться по этим признакам. Рост нитей происходит путем деления составляющих их клеток в одной плоскости. Размножение — высвобождающимися из чехлов одиночными клетками, подвижными (с помощью одного или пучка полярных жгутиков) или неподвижными. В чехлах, окружающих нити, накапливаются окислы железа и марганца (*Leptothrix*) или только железа (*Sphaerotilus* и др.).

Нитчатые железобактерии группы *Leptothrix* — *Sphaerotilus* — облигатные аэробы, но могут удовлетворительно расти при низком содержании O_2 в среде. Оптимальный pH для роста — 6—8. Единственно возможный способ существования — хемоорганогетеротрофия, при этом представители рода *Sphaerotilus* предпочитают условия с относительно высоким содержанием органических веществ, а многие штаммы *Leptothrix* — среды с низким уровнем органики. Используемые источники углерода и энергии — различные сахара, кислоты, спирты. Источниками азота служат аммонийный и нитратный азот, аминокислоты. Бактерии обоих родов нуждаются в витамине B_{12} , а некоторые виды — также в биотине и тиамине. В качестве запасных веществ в клетках обнаружена поли- β -оксимасляная кислота, а у *Sphaerotilus* — также и полисахарид. Оба рода характеризуются практически одинаковым молярным содержанием ГЦ-оснований ДНК (69—71%).

Окисление железа и марганца и отложение их окислов в чехлах этих бактерий не связано с получением ими энергии. К окислению Fe^{2+} при pH 6—8 могут приводить процессы как химической, так и биологической природы. Окисление марганца в этих условиях имеет биологическую природу. В обоих случаях окисление связано с действием перекиси водорода, количество которой в среде в определенных условиях может достигать 10—20 мг/л. Процесс локализован в чехлах, где концентрируются продукты метаболизма и внеклеточные ферменты. У мутантов, лишенных чехлов, накопления окислов железа и марганца не происходило. Таким образом, с помощью восстановленных форм железа и марганца обеспечивается удаление H_2O_2 — токсического продукта клеточного метаболизма.

Помимо бесцветных к нитчатым железобактериям относятся и некоторые фотосинтезирующие прокариоты из группы цианобактерий и скользящих зеленых бактерий.

Одноклеточные железобактерии. Вторая группа железобактерий включает одноклеточные организмы из разных таксонов. Она представлена прокариотами с грамположительным и граммотрицательным строением клеточной стенки, размножающимися поперечным делением или почкованием. Клетки разной формы и размеров (форма может

меняться в зависимости от стадии и условий роста), одиночные или формирующие скопления, окруженные капсулами, в которых откладываются окислы железа и марганца.

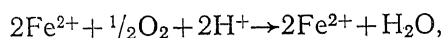
В результате изучения чистых культур многих широко распространенных в природе одноклеточных железобактерий, относимых к роду *Siderocapsa*, показано, что они идентичны или очень близки грамположительным представителям рода *Arthrobacter*. Принадлежащие к этой группе железобактерии распадаются на две подгруппы, четко различающиеся типом метаболизма и отношением к кислотности среды. Подгруппа, в которую входят представители родов *Arthrobacter* (= *Siderocapsa*), *Seliberia*, *Ochrobium* и др., объединяет железобактерии, растущие в нейтральной или слабощелочной среде и характеризующиеся строго хемоорганогетеротрофным типом метаболизма. Многие представители этой подгруппы — олиготрофы. Все — аэробы или микроаэрофилы. Отложение окислов железа и марганца происходит с участием перекиси водорода и не имеет отношения к получению клетками энергии.

Вторую подгруппу одноклеточных железобактерий составляют аэробные ацидофильные формы. Оптимальный pH их роста лежит ниже 4,5 (2—3). В этих условиях Fe^{2+} в присутствии O_2 устойчиво к химическому окислению. Для ацидофильных железобактерий установлена способность получать энергию в результате окисления двухвалентного железа.

Основным представителем железобактерий с энергетическим метаболизмом хемолитотрофного типа является *Thiobacillus ferrooxidans*, относящийся к группе тионовых бактерий и обладающий способностью получать энергию также в результате окисления различных восстановленных соединений серы. Окислять закисное железо способна и выделенная недавно облигатно ацидофильная бактерия *Leptospirillum ferrooxidans*, близкая по ряду свойств к *T. ferrooxidans*, но в отличие от последнего не окисляющая соединения серы. Получение энергии в результате окисления восстановленных соединений серы и железа показано и для некоторых представителей рода *Sulfolobus*.

Leptospirillum ferrooxidans и большинство изученных штаммов *T. ferrooxidans* принадлежат к облигатным хемолитоавтотрофам, использующим энергию окисления железа для ассимиляции CO_2 , служащей основным или единственным источником углерода. Некоторые штаммы *T. ferrooxidans* оказались способными расти на средах с органическими соединениями, являясь, таким образом, факультативными хемолитоавтотрофами. Наконец, описаны термофильные бактерии, получающие энергию в результате окисления Fe^{2+} и нуждающиеся для роста в органических соединениях, т. е. осуществляющие метаболизм хемолитогетеротрофного типа.

Окисление железа, приводящее к получению энергии, происходит в соответствии с уравнением



что сопровождается незначительным изменением уровня свободной энергии ($\Delta G_0'$ при pH 2 равно —33 кДж/моль). Поэтому для обеспечения энергией клетке необходимо «переработать» большие количества железа.

Механизм окисления Fe^{2+} в дыхательной цепи изучен у *T. ferrooxidans*. Дыхательная цепь этой бактерии содержит все типы переносчиков, характерные для дыхательной системы аэробных хемоорганотрофных прокариот, но участок цепи, связанный с получением энергии,

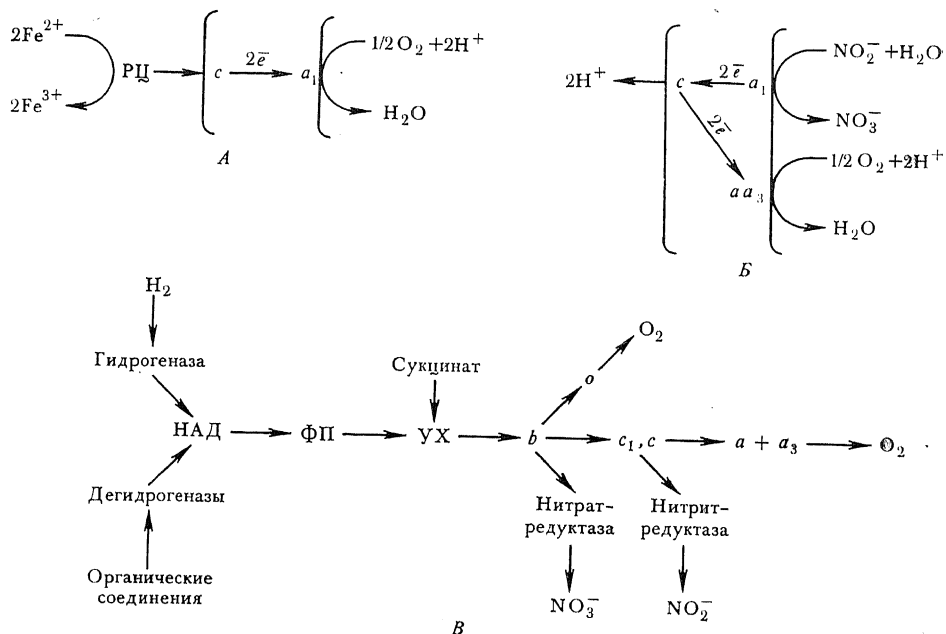


Рис. 108. Схематическое изображение энергетических процессов у представителей разных групп хемолитотрофных прокариот. А — *Thiobacillus ferrooxidans*; Б — *Nitrobacter*; В — *Paracoccus denitrificans*:

РЦ — рустицианин; ФП — флавопротеид; УХ — убихинон; b, c, o, a_1, aa_3 — цитохромы (по Haddock, Jones, 1977; Jones, 1980)

очень короток (рис. 108, А). Окисление Fe^{2+} происходит на внешней стороне ЦПМ; в цитозоль через мембрану железо не проникает. Электроны с Fe^{2+} акцептируются особым медьсодержащим растворимым белком — рустицианином, локализованным, вероятно, в периплазматическом пространстве.

Затем с рустицианина они передаются на цитохром c , локализованный на внешней стороне ЦПМ, а с него на цитохром a_1 , расположенный на внутренней стороне мембраны. Перенос электронов с цитохрома a_1 на $1/2 \text{O}_2$, сопровождающийся поглощением из цитоплазмы 2H^+ , приводит к восстановлению молекулярного кислорода до H_2O . Особенность дыхательной цепи *T. ferrooxidans* — отсутствие переноса через мембрану протонов, а перенос только электронов. Градиент H^+ по обе стороны ЦПМ поддерживается как за счет поглощения протонов из цитоплазмы, так и в результате низкого рН внешней среды, в которой обитают эти бактерии. Синтез АТФ происходит за счет движения H^+ из внешней среды в цитоплазму через АТФ-синтетазный комплекс. Движущей силой служит в основном ΔpH . Для синтеза 1 молекулы АТФ необходимо окислить как минимум 2 молекулы Fe^{2+} .

Образование восстановителя происходит в результате энергозависимого обратного переноса электронов. Активность участка дыхательной цепи, обеспечивающей обратный электронный транспорт, на порядок ниже активности короткого участка, функционирование которого приводит к получению энергии. В целом для фиксации 1 молекулы CO_2 в цикле Кальвина необходимо окислить больше 22 молекул Fe^{2+} .

Железобактерии без клеточной стенки. В последнее время описан ряд не имеющих клеточной стенки мелких бактерий, способных расти на синтетической среде. На основании этих признаков организмы от-

несены к группе сапрофитных микоплазм. Им свойствен типичный для микоплазм полиморфизм: кокковидные клетки, от которых могут отходить тонкие нити, пучки переплетенных тонких нитей и т. д. На поверхности нитей откладываются окислы железа (*Gallionella*, *Siderococcus*) или железа и марганца (*Metallogenium*, *Caulococcus*). Растут в нейтральной или кислой среде.

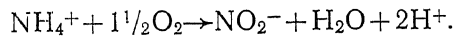
Для некоторых из них (*Metallogenium*), полученных в чистой культуре, показано, что это аэробные хемоорганотрофные организмы, окисление которыми марганца и железа не имеет энергетического значения, а является результатом взаимодействия с выделяющейся перекисью водорода. Природа энергетического метаболизма других микоплазмоподобных железобактерий, не полученных еще в чистой культуре (*Caulococcus*, *Siderococcus*), не известна. Наконец, относительно *Gallionella* (см. рис. 47, 4) данные противоречивы. Хотя способность *Gallionella* к хемолитотрофии обычно не признается, некоторые исследователи считают этот организм истинным хемолитоавтотрофом, использующим энергию окисления Fe^{2+} для ассимиляции CO_2 , способной служить для него единственным источником углерода.

Железобактерии в природе. Железобактерии широко распространены в природе и могут существовать в большом диапазоне условий. Obligатно ацидофильные железобактерии обнаружены в подземных водах сульфидных месторождений, кислых водах железистых источников и кислых озерах с высоким содержанием закисного железа. Нитчатые железобактерии также занимают вполне определенные экологические ниши. Представители рода *Leptothrix* — обитатели олиготрофных железистых поверхностных вод, *Sphaerotilus* предпочитают среды с высоким содержанием органических веществ.

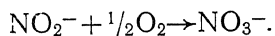
Нитрифицирующие бактерии

Нитрифицирующие бактерии получают энергию в результате окисления восстановленных соединений азота (аммиак, азотистая кислота). Впервые чистые культуры этих бактерий получил С. Н. Виноградский в 1892 г., установивший их хемолитоавтотрофную природу. В восьмом издании Определителя бактерий Берги все нитрифицирующие бактерии выделены в семейство Nitrobacteraceae, насчитывающее к настоящему времени 8 родов.

В природе процесс нитрификации идет в 2 фазы, за каждую из которых ответственны свои возбудители. Первую фазу — окисление солей аммония до солей азотистой кислоты (нитритов) — осуществляют представители родов *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira* и *Nitrosovibrio*:



Вторую фазу — окисление нитритов в нитраты — осуществляют бактерии из родов *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus*:



Характеристика нитрифицирующих бактерий. Группа нитрифицирующих бактерий представлена грамотрицательными организмами, различающимися формой и размером клеток, способами размножения, типом жгутикования подвижных форм, особенностями клеточной структуры, молярным содержанием ГЦ-оснований ДНК, способами существования. Краткая характеристика по этим признакам родов нитрифицирующих бактерий представлена в табл. 40.

Характеристика нитрифицирующих бактерий (по Watson, Valois, Waterbury, 1981)

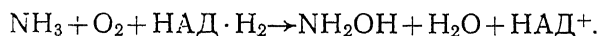
Фаза нитрификации	Род	Форма клетки и размеры, мкм	Размножение	Подвижность	Особенности строения клеточной стенки	Внутрицитоплазматические мембраны	Молярное содержание ГЦ-оснований, %	Способность к хемотрано-гетеротрофному росту
I	<i>Nitrosomonas</i>	палочки 0,8—1×1—2	бинарное деление	+ или — 1—2 субполярных жгутика	у некоторых штаммов дополнительные слои клеточной стенки	периферические, пластинчатые	47,4—51,0	—
	<i>Nitrosococcus</i>	кокки 1,5—2,2	то же	+ или — 1—20 субполярных жгутиков	у некоторых видов дополнительные слои клеточной стенки	пластинчатые или трубчатые	50,5—51,0	—
	<i>Nitrosolobus</i>	дольчатая 1—1,5	»	+ 1—20 перитрихальных жгутиков		в виде перегородок	53,6—55,1	—
	<i>Nitrosospira</i>	спиральная 0,3—0,4× ×0,8—5,0	»	+ или — 1—6 перитрихальных жгутиков		отсутствуют	54,1	—
	<i>Nitrosovibrio</i>	изогнутые палочки 0,3—0,4×1—3	»	+ 1—4 субполярных или латеральных жгутиков		отсутствуют или в виде небольших вячиваний ЦПМ		—
II	<i>Nitrobacter</i>	палочки 0,6—0,8×1—2	почкование	+ или — 1 полярный жгутик		периферические пластинчатые	60,7—61,7	+ или —
	<i>Nitrospina</i>	палочки 0,3—0,4× ×2,6—6,5	бинарное деление	—		периодические небольшие вячивания ЦПМ	57,7	—
	<i>Nitrosococcus</i>	кокки 1,5—1,8	то же	+ 1—2 субполярных жгутика		трубчатые	61,2	—

Все нитрифицирующие бактерии — облигатные аэробы; некоторые виды — микроаэрофилы. Большинство — облигатные автотрофы, рост которых ингибируется органическими соединениями в концентрациях, обычных для гетеротрофных прокариот. С использованием ^{14}C -соединений показано, что облигатные хемолитоавтотрофы могут включать в состав клеток некоторые органические вещества (глюкозу, ацетон, пируват, ряд аминокислот), но в весьма ограниченной степени. Основным источником углерода остается CO_2 , ассимиляция которой осуществляется в цикле Кальвина. Только для некоторых штаммов *Nitrobacter* показана способность к медленному росту в среде с органическими соединениями в качестве источника углерода и энергии. Лучший источник азота для биосинтетических целей — аммонийный. Некоторые виды могут использовать нитраты, мочевины.

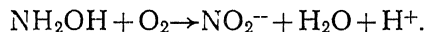
Оптимальные условия для роста нитрифицирующих бактерий лежат при температуре $25\text{--}30^\circ$ и pH $7,5\text{--}8,0$.

Процесс нитрификации. Процесс нитрификации локализован на цитоплазматической и внутрицитоплазматических мембранах. Ему предшествует поглощение NH_4^+ и перенос его через ЦПМ с помощью медьсодержащей транслоказы.

При окислении аммиака до нитрита атом азота теряет 6 электронов. Предполагается, что на первом этапе аммиак окисляется до гидроксилламина с помощью монооксигеназы, катализирующей присоединение к молекуле аммиака 1 атома O_2 ; второй взаимодействует, вероятно, с НАД $\cdot\text{H}_2$, что приводит к образованию H_2O :



Гидроксилламин далее с помощью гидроксилламиноксидоредуктазы окисляется до нитрита:



В качестве промежуточного продукта реакции предполагается образование нитроксила:



Электроны от NH_2OH поступают в дыхательную цепь на уровне цитохрома *c* и далее на терминальную оксидазу. Их транспорт сопровождается переносом 2 протонов через мембрану, приводящим к созданию протонного градиента и синтезу АТФ. Гидроксилламин и нитроксил в этой реакции, вероятно, остаются связанными с ферментом.

Вторая фаза нитрификации сопровождается потерей 2 электронов. Окисление нитрита до нитрата, катализируемое молибденсодержащим ферментом нитритоксидазой, локализовано на внутренней стороне ЦПМ и происходит следующим образом:



Электроны поступают на цитохром a_1 и через цитохром *c* на терминальную оксидазу aa_3 , где акцептируются молекулярным кислородом (рис. 108, Б). При этом происходит перенос через мембрану 2H^+ . Поток электронов от NO_2^- на O_2 происходит с участием очень короткого отрезка дыхательной цепи. Так как E_0' пары $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ равен $+420$ мВ, восстановитель образуется в процессе энергезависимого обратного переноса электронов. Большая нагрузка на конечный участок дыхательной цепи объясняет высокое содержание цитохромов *c* и *a* у нитрифицирующих бактерий.

Обнаружено, что многие хемоорганогетеротрофные бактерии, принадлежащие к родам *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseu-*

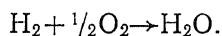
domonas и др., способны окислять аммиак, гидроксилламин и другие восстановленные соединения азота до нитритов или нитратов. Процесс нитрификации этих организмов, однако, не приводит к получению ими энергии. Изучение природы этого процесса, получившего название гетеротрофной нитрификации, показало, что, возможно, он связан с разрушением образуемой бактериальными культурами перекиси водорода с помощью пероксидазы. Образующийся при этом активный кислород окисляет NH_3 до NO_3^- .

Экология и роль в природе. Нитрифицирующие бактерии обнаружены в водоемах разного типа (озера, моря, океаны) и в почвах, где они, как правило, развиваются совместно с бактериями, жизнедеятельность которых приводит к образованию исходного субстрата нитрификации — аммиака.

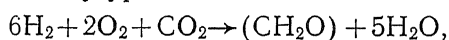
Процесс нитрификации, являясь важным звеном в круговороте азота в природе, имеет как положительные, так и отрицательные стороны. Оказалось, например, что переводение азота из аммонийной формы в нитратную способствует обеднению почвы азотом, так как нитраты, как весьма растворимые соединения, легко вымываются из почвы. В то же время известно, что нитраты — хорошо используемый растениями источник азота. Кроме того, связанное с нитрификацией подкисление почвы улучшает растворимость и, следовательно, доступность некоторых жизненно необходимых элементов, в первую очередь фосфора и железа.

Водородные бактерии

К водородным бактериям относят прокариоты, способные получать энергию путем окисления молекулярного водорода с участием O_2 , а все вещества клетки строить из углерода CO_2 . Таким образом, водородные бактерии — это хемолитоавтотрофы, растущие при окислении H_2 в аэробных условиях:



Помимо окисления для получения энергии молекулярный водород используется в конструктивном метаболизме. Определенное экспериментально соотношение между потреблением растущей культурой водородных бактерий H_2 , O_2 и CO_2 и синтезом вещества клеток (CH_2O) соответствует следующему уравнению:



из которого видно, что на 5 молекул H_2 , окисленного в процессе дыхания, приходится 1 молекула H_2 , затрачиваемого на образование биомассы.

Работами последнего времени показано, что молекулярный водород — самый широко распространенный неорганический субстрат, используемый прокариотами для получения энергии в процессе окисления. Число бактерий, растущих хемолитотрофно на основе использования H_2 в качестве источника энергии, намного больше организмов, использующих для этой цели другие неорганические субстраты (восстановленные соединения серы, азота, железа).

Способность к энергетическому использованию H_2 может сочетаться с конструктивным метаболизмом облигатно гетеротрофного типа (например, у представителей родов *Azotobacter* или *Acetobacter*) или происходить в строго анаэробных условиях (сульфатвосстанавливающие или метанобразующие бактерии), что не позволяет относить обла-

дающие этими особенностями организмы к водородным бактериям. Таким образом, водородные бактерии представляют только часть прокариот, способных использовать H_2 для получения энергии. Пути использования молекулярного водорода прокариотами суммированы в табл. 41. Водородные бактерии характеризуются способностью соче-

Таблица 41

Пути использования молекулярного водорода прокариотами

№	Процесс	Конечный акцептор водорода	Конечный продукт
1	Восстановительное ассимилирование углерода	CO_2	вещества клетки
2	Восстановительное ассимилирование углерода	органические соединения	вещества клетки
3	Дыхание	O_2	H_2O
4	Нитратное дыхание, денитрификация	NO_3^- , NO_2^- , NO , N_2O	N_2 , NO_2^-
5	Сульфатное дыхание	SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$	H_2S
6	Фумаратное дыхание	фумарат	сукцинат
7	Образование метана	CO_2 , CO , $HCOOH$	CH_4
8	Образование ацетата	CO_2	CH_3COOH

тать конструктивный метаболизм автотрофного типа (вариант 1) с получением энергии за счет окисления H_2 с участием молекулярного кислорода (вариант 3). Однако метаболические возможности водородных бактерий этим не исчерпываются. Краткая характеристика их метаболизма дана ниже.

Особенности морфологии и физиологии водородных бактерий. Впервые водородные бактерии были описаны А. Ф. Лебедевым и Г. Казерером (H. Kaserer) в 1906 г., а в 1909 г. С. Орла-Йенсен (S. Orla-Jensen) выделил их в самостоятельный род *Hydrogenomonas*.

Последующее изучение обнаружило сходство водородных бактерий с представителями разных родов гетеротрофных бактерий: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia* и др. Стало ясно, что водородные бактерии — не таксономическая группа, а организмы, объединяемые на основании нескольких физиологических признаков. В восьмом издании Определителя бактерий Берги (1974) род *Hydrogenomonas* ликвидирован, и виды, входившие в его состав, распределены по другим таксономическим группам.

В настоящее время к водородным бактериям относятся представители около 20 родов, объединяющих грамположительные и грамотрицательные формы разной морфологии, подвижные и неподвижные, образующие споры и беспоровые, размножающиеся делением и почкованием. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК водородных бактерий находится в диапазоне от 48 до 72%.

Все водородные бактерии — факультативные хемолитоавтотрофы, использующие в качестве источника углерода и энергии также разнообразные органические соединения (сахара, спирты, органические кислоты, аминокислоты), некоторые из них — и одноуглеродные соединения, более восстановленные, чем CO_2 (окись углерода, метанол, формиаат и др.). Ассимиляция CO_2 происходит в цикле Кальвина. Водородные бактерии, растущие на органических соединениях, имеют тот же метаболический аппарат, что и хемоорганогетеротрофные прокариоты. Метаболизирование органических соединений у разных представителей этой группы осуществляется с помощью гликолитического, окислительного пентозофосфатного и Энтнера — Дудорова путей, а также ЦТК и глиоксилатного шунта.

Все водородные бактерии способны потреблять аммиак, многие — мочевины, нитраты и нитриты, разные аминокислоты и азотистые основания. Некоторые штаммы способны к фиксации молекулярного азота.

Электронтранспортная цепь водородных бактерий по составу аналогична митохондриальной (см. рис. 104). Большинство из них относится к облигатным аэробам. Однако среди облигатных аэробов преобладают виды, тяготеющие к низким концентрациям O_2 в среде. Особенно чувствительны к O_2 водородные бактерии, растущие хемолитоавтотрофно, а также в условиях фиксации молекулярного азота. Последнее объясняется инактивирующим действием молекулярного кислорода на гидрогеназу и нитрогеназу — ключевые ферменты метаболизма H_2 и фиксации N_2 . Для некоторых водородных бактерий показана способность расти и в анаэробных условиях, используя в качестве конечного акцептора электронов вместо O_2 нитраты или нитриты. Примером факультативно аэробных водородных бактерий может служить *Paracoccus denitrificans*, у которого в аэробных условиях работает электронтранспортная цепь, аналогичная митохондриальной, а в отсутствие O_2 электроны с помощью соответствующих редуктаз переносятся на NO_3^- и NO_2^- , восстанавливая их до N_2 (рис. 108, В). Однако большая часть факультативно аэробных водородных бактерий способна к восстановлению нитратов только до нитритов.

Водородные бактерии, как правило, мезофилы с оптимумом роста при $30-35^\circ$. Некоторые виды — термофилы, растущие при 50° и даже 70° . Все известные к настоящему времени представители этой группы — нейтрофилы с оптимальным рН для роста в области 6,5—7,5.

Окисление H_2 водородными бактериями. Как известно, способность к окислению молекулярного водорода связана с наличием гидрогеназ. Гидрогеназы обнаружены у многих представителей прокариотного мира. В клетке гидрогеназы могут находиться в растворимом или связанном с мембранами состоянии. Большинство водородных бактерий содержит только одну форму фермента — связанную с мембранами. Однако есть виды, содержащие обе формы или только растворимую (цитоплазматическую) гидрогеназу.

Гидрогеназы, имеющие различную локализацию, вероятно, выполняют в клетке разные функции. Связанный с мембранами фермент, катализирующий реакцию поглощения H_2 , передает электроны в дыхательную цепь и, таким образом, имеет непосредственное отношение к энергетическим процессам. Растворимая гидрогеназа, катализирующая аналогичную реакцию, переносит электроны на молекулы НАД^+ , которые участвуют далее в различных биосинтетических реакциях. Если же водородные бактерии содержат одну форму гидрогеназы, она выполняет обе функции.

Возможно, основное различие между растворимой и мембрансвязанной формами фермента заключается в природе соединений — акцепторов электронов, с которыми взаимодействуют гидрогеназы. Растворимый фермент катализирует передачу электронов на НАД⁺, а связанная с мембраной гидрогеназа не способна катализировать восстановление НАД⁺. В этом случае электроны от H₂, вероятно, поступают на переносчики дыхательной цепи флавопротеидной, хиноновой или цитохромной природы.

В связи с этим следует напомнить, что все НАД-зависимые дегидрогеназы хемоорганогетеротрофных прокариот, поставляющие электроны в дыхательную цепь, — растворимые ферменты. Следовательно, в случае функционирования цитоплазматических гидрогеназ образование НАД·Н₂ аналогично таковому при использовании в качестве энергетических субстратов органических соединений. Часть восстановительных эквивалентов с НАД·Н₂ поступает в дыхательную цепь, другая — расходуется по каналам конструктивного метаболизма.

Если у водородных бактерий нет НАД-зависимой цитоплазматической гидрогеназы и электроны от H₂ с помощью мембрансвязанного фермента акцептируются на уровне флавопротеидов, хинонов или цитохромов, возникающая проблема получения восстановителя при хемолитоавтотрофном способе существования этих организмов решается с помощью механизма обратного переноса электронов. Таким образом, из всех хемолитоавтотрофных прокариот только водородные бактерии с помощью определенной формы гидрогеназы могут осуществлять непосредственное восстановление НАД⁺ окислением неорганического субстрата. В электронтранспортную цепь водородных бактерий электроны, следовательно, могут поступать с НАД·Н₂ или включаться на уровне переносчиков с более положительным окислительно-восстановительным потенциалом. С этим связан энергетический выход процесса: функционирование в дыхательной цепи 3 или 2 генераторов Δ $\bar{\mu}_{H^+}$.

Водородные бактерии в природе. К образованию молекулярного водорода приводят разные процессы, в том числе и биологические. Активными продуцентами H₂ являются прокариоты. Также активно осуществляется и потребление H₂, важная роль в этом принадлежит водородным бактериям. Нахождение в природе и возможность размножения этих бактерий определяются рядом факторов; основные из них — наличие H₂ и аэробные условия.

В последнее время водородные бактерии привлекают к себе внимание возможностью практического использования: для получения кормового белка, а также ряда органических соединений (кислоты, аминокислоты, витамины, ферменты и др.).

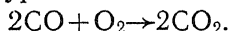
Карбоксидобактерии

Карбоксидобактерии — аэробные прокариоты, способные расти, используя окись углерода (СО) в качестве единственного источника углерода и энергии. Таким свойством обладают некоторые представители родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Comamonas*¹. Все они грамотрицательные прямые или слегка изогнутые палочки, подвижные. Двигаются с помощью полярно расположенных жгутиков.

¹ Способность окислять СО обнаружена у представителей прокариот, принадлежащих к пурпурным несерным бактериям, цианобактериям, кластридиям, метанобразующим бактериям и др. Однако в большинстве случаев этот процесс не поддерживает рост культур и механизм его не ясен.

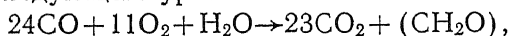
Карбоксидобактерии могут расти автотрофно, ассимилируя CO_2 в цикле Кальвина, а также использовать в качестве единственного источника углерода и энергии различные органические соединения, главным образом из группы спиртов и органических кислот, и некоторые одноуглеродные субстраты, такие как метанол, формат. При выращивании на среде с CO_2 в качестве единственного источника углерода все карбоксидобактерии энергию могут получать за счет окисления молекулярного водорода. В большинстве случаев рост этих бактерий на среде с $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ происходит активнее, чем на среде с CO . Это дало основание рассматривать карбоксидобактерии как особую физиологическую подгруппу водородных бактерий.

Использование CO карбоксидобактериями происходит путем его окисления в соответствии с уравнением:



Продукт реакции используется далее по каналам автотрофного метаболизма. (Таким образом, при выращивании карбоксидобактерий на среде с CO в качестве единственного источника углерода и энергии источником углерода служит не CO , а CO_2).

Общее уравнение обмена карбоксидобактерий может быть представлено в виде следующего уравнения:



где (CH_2O) — символ биомассы. Из уравнения видно, что окисление CO — неэффективный способ получения энергии. Карбоксидобактерии для синтеза клеточного вещества вынуждены окислять большое количество CO : на биосинтетические процессы идет около 4% углерода CO , на энергетические — 96%.

Окисление CO карбоксидобактериями осуществляется с участием по крайней мере одного специфического фермента. Электроны, освобождающиеся при этом, поступают в электронтранспортную цепь, состав которой аналогичен таковому водородных бактерий. Хотя реакция окисления CO сопровождается значительным изменением уровня свободной энергии, низкая эффективность ее использования карбоксидобактериями указывает на то, что перенос электронов по цепи в этом случае приводит к функционированию, вероятно, 1 генератора $\Delta\mu_{\text{H}^+}$.

Одним из интересных свойств карбоксидобактерий является сам факт использования ими окиси углерода, служащей специфическим ингибитором терминальных оксидаз, таких как цитохромы типа *a* (см. рис. 104). Для некоторых карбоксидобактерий показана устойчивость к содержанию в атмосфере до 90% CO . В то же время в электронтранспортных цепях этих организмов не обнаружено никаких необычных цитохромов. В качестве механизмов, приводящих к CO -устойчивости этих бактерий, обсуждаются: 1) быстрая детоксификация CO с помощью окисляющего фермента; 2) индукция ответвляющихся от основного пути CO -нечувствительных терминальных оксидаз, через которые и осуществляется перенос электронов на O_2 ; 3) повышенный синтез компонентов электронтранспортной цепи; 4) пространственное разобщение процесса окисления CO и цитохромоксидаз, чувствительных к ней.

Основными источниками окиси углерода в природных условиях является промышленное производство, транспорт, вулканическая деятельность и биологические процессы. Известно, что CO образуется в результате жизнедеятельности разных организмов (бактерии, грибы, водоросли, животные, растения). Одним из путей удаления этого ток-

сического соединения служит использование его бактериями, и в первую очередь в наибольшей степени приспособленными для этого.

Бактерии, восстанавливающие сульфаты

Все разобранные выше физиологические группы прокариот, способных расти хемолитоавтотрофно, относятся к облигатным или факультативным аэробам. В отсутствие O_2 факультативные аэробы получают энергию в процессе анаэробного дыхания, используя в качестве конечных акцепторов электронов некоторые окисленные соединения, например нитраты, фумарат и др.

Известны две физиологические группы хемолитотрофных облигатно анаэробных прокариот, приспособившихся получать энергию окислением в анаэробных условиях молекулярного водорода, используя в качестве конечного акцептора электронов сульфат (сульфатовосстанавливающие бактерии) или CO_2 (метанобразующие бактерии).

Характеристика группы. Сульфатовосстанавливающие бактерии — группа, объединяющая строго анаэробные прокариоты с различными морфологическими, физиологическими и биохимическими признаками, обладающие способностью активировать сульфат и восстанавливать его до сульфида в системе энергетического метаболизма. В настоящее время в состав группы входят 8 родов (табл. 42). Среди них есть одноклеточные и нитчатые формы. Одноклеточные бактерии — прямые или изогнутые палочки, кокки, спиралевидные клетки, некоторые образуют скопления в виде пакетов; неподвижные или передвигающиеся с помощью перитрихальных или полярных жгутиков. Трихомные формы, отнесенные к роду *Desulfonema*, достигают в длину нескольких миллиметров; обладают типичным для таких форм скользящим движением. За исключением представителей двух родов (*Desulfotomaculum* и *Desulfonema*), все сульфатовосстанавливающие бактерии имеют клеточную стенку грамотрицательного типа. Бактерии рода *Desulfotomaculum* характеризуются также способностью образовывать эндоспоры. На гетерогенность группы указывает большой диапазон значений ГЦ-оснований ДНК (34—67%).

Большинство сульфатовосстанавливающих бактерий — мезофилы, оптимальный рост наблюдается при температурах 25—30°; у некоторых культур оптимум сдвинут до 35—40°. Выделены и термофильные виды с оптимумами роста при 55 и 66°.

Все сульфатовосстанавливающие бактерии — облигатные анаэробы. Более того, они относятся к категории строгих анаэробов. Для роста чистых культур этих бактерий требуется не только отсутствие O_2 , но низкий окислительно-восстановительный потенциал среды (в области от 0 до —100 мВ). Для создания необходимых условий в среду обычно добавляют вещества с восстановительными свойствами.

Биосинтетические способности сульфатовосстанавливающих бактерий разнообразны. Некоторые из них растут только на средах с добавлением дрожжевого экстракта. Многие виды могут расти на синтетических средах, не содержащих дрожжевого экстракта. Специфические потребности для их роста — несколько витаминов группы В. Описаны культуры, не зависящие от экзогенных витаминов.

В качестве источника углерода и энергии сульфатовосстанавливающие 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.

Таблица 42

Характеристика родов сульфатовосстанавливающих бактерий

Род	Форма и размер клетки, мкм	Подвижность и способ движения	Тип строения клеточной стенки*	Образование спор	Молярное содержание ГЦ-оснований, %	Способность к хемолитотрофному росту**	Способность к росту	
							за счет образования пирувата	на среде с ацетатом + SO_4^{2-} + лактатом + SO_4^{2-}
<i>Desulfobrio</i>	прямые, изогнутые или спиральные палочки; 0,5—1,5×1,5—10	подвижные с помощью полярных жгутиков	грамотрицательный	—	46—61	—	±	—
<i>Desulfotomaculum</i>	прямые или изогнутые палочки; 0,3—1,5×3—9	подвижные с помощью полярных или перитрихнальных жгутиков	грамположительный	+	37—47	—	±	+
<i>Desulfomonas</i>	прямые или слегка изогнутые палочки; 0,8—1×2,5—10	неподвижные	грамотрицательный	—	66—67	—	—	+
<i>Desulfobulbus</i>	эллипсоидные, изогнутые или извитые клетки; 0,5—1,5××2—6	неподвижные или подвижные с помощью жгутиков	тот же	—	53—60	—	—	—
<i>Desulfobacter</i>	палочки или эллипсоидные клетки; 1—1,5×2—3,5	неподвижные или подвижные с помощью одного жгутика	»	—	46	—	+	+
<i>Desulfococcus</i>	сферические клетки; 1,5—2,2	неподвижные	»	—	57	—	—	+
<i>Desulfonema</i>	нити, состоящие из палочковидных клеток; 2,5—7×несколькo мкм	скользящие	грамположительный	—	34—42	±	—	+
<i>Desulfosarcina</i>	эллипсоидные клетки, образующие пакеты; 1—1,5××3,5—9	неподвижные	грамотрицательный	—	—	+	—	+

Обозначения: (+) — признак присутствует, (—) — отсутствует, (±) — присутствует не у всех представителей рода.

* Не всегда совпадает с окрашиванием по Граму, например *Desulfotomaculum* окрашивается по Граму отрицательно, но клеточная стенка грамположительного типа (однослойная, не содержит наружной мембраны).

** Рост на минеральной среде, содержащей H_2 , CO_2 , SO_4^{2-} .

Из низших жирных кислот — это формиат, ацетат, пропионат, бутират. В отношении метаболизирования органических кислот сульфатредуцирующие бактерии делят на две группы. К первой относят виды, осуществляющие неполное окисление органических кислот, основным продуктом которого является ацетат. К этой группе принадлежат представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfomonas*. Вторую группу составляют штаммы и виды, способные к полному окислению органических кислот. Типичным представителем этой группы служит *Desulfotomaculum acetoxidans*.

Из других типов органических соединений в качестве источников углерода и энергии отдельные сульфатовосстанавливающие бактерии могут использовать спирты (этанол, пропанол, бутанол), некоторые сахара, циклические и C₁-соединения, холин².

Пути метаболизирования органических соединений изучены мало. Обнаружены ферменты ЦТК, но имеющиеся данные говорят о его «разорванности». Не установлено функционирования глиоксилатного шунта.

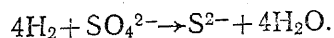
В течение длительного времени предпринимались попытки показать способность представителей родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* расти автотрофно в условиях окисления ими молекулярного водорода. Однако результаты были отрицательными. Рост этих бактерий облигатно зависит от органических соединений, необходимых для биосинтезов, хотя удельный вес ассимилируемого ими углерода CO₂ может достигать 30—48% всего клеточного углерода. Основными путями включения CO₂ в клетки этих бактерий являются реакции карбоксилирования, характерные для хемогетеротрофных прокариот (см. табл. 25).

Способность к автотрофии обнаружена у описанных недавно видов *Desulfonema limicola* и *Desulfosarcina variabilis*. Экспериментальное доказательство было получено при выращивании этих видов на минеральной среде, содержащей в качестве единственного источника углерода — CO₂, энергии — H₂, конечного акцептора электронов — SO₄²⁻ (табл. 42). Полученные данные согласуются с обнаружением у этих бактерий рибулозодифосфаткарбоксилазы, ключевого фермента цикла Кальвина.

Источники азота для роста сульфатовосстанавливающих бактерий — аммиак, аминокислоты; некоторые виды способны к азотфиксации.

Пути получения энергии. Сульфатовосстанавливающие 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.

Специфическим способом получения энергии, послужившим основанием для выделения ряда прокариот в отдельную физиологическую группу, является сульфатное дыхание. Выше уже была отмечена способность использовать в качестве источника энергии процесс окисления H₂, сопряженный с восстановлением сульфатов:



Реакция протекает со значительным изменением уровня свободной

² Азотсодержащий спирт.

энергии и связана с переносом 8 электронов. Использование молекулярного водорода для получения энергии позволяет отнести группу сульфатвосстанавливающих прокариот к строго анаэробным хемолитотрофам, а некоторых ее представителей — к строго анаэробным хемолитоавтотрофам.

Таким образом, возможные способы существования сульфатредуцирующих бактерий включают хемоорганогетеротрофию (источники углерода — органические соединения, источники энергии — брожение или окисление органических субстратов в процессе сульфатного дыхания) или хемолитотрофию (источник энергии — анаэробное окисление H_2 с акцептированием электронов на SO_4^{2-}) в сочетании с конструктивным метаболизмом гетеротрофного или автотрофного типа.

Процесс получения энергии в результате сульфатного дыхания состоит из трех этапов: 1) отрыва электронов от энергетического субстрата; 2) переноса их по дыхательной цепи; 3) присоединения к веществам, функционирующим в качестве конечных акцепторов электронов.

У сульфатвосстанавливающих бактерий этап отрыва электронов от энергетических субстратов катализируют различные субстратные дегидрогеназы (лактат-, пируват-, этанолдегидрогеназы) и гидрогеназы. Активные гидрогеназы, локализованные в цитоплазме и/или связанные с мембранами, обнаружены у многих представителей этой группы.

С помощью этих ферментов электроны передаются в дыхательную цепь. В качестве компонентов электронтранспортной цепи идентифицированы FeS-белки (ферредоксины, рубредоксины), флаводоксин, менахинон, цитохромы типа *b*, *c*. Особенностью дыхательной цепи многих сульфатвосстанавливающих бактерий является высокое содержание низкопотенциального цитохрома c_3 ($E_0' \approx -300$ мВ), которому приписывают участие в акцептировании электронов с гидрогеназы. Все перечисленные выше соединения, вероятно, принимают участие в переносе электронов на SO_4^{2-} , но точная их последовательность и локализация на мембране не установлены. Получены данные, указывающие на то, что окисление H_2 происходит на наружной стороне мембраны, а реакции восстановления SO_4^{2-} — на внутренней. Из этого следует, что окисление H_2 , сопряженное с восстановлением SO_4^{2-} , связано с трансмембранным окислительно-восстановительным процессом. Перенос электронов по дыхательной цепи сопровождается генерированием $\Delta\mu_{H^+}$. На это указывает чувствительность процесса к веществам, повышающим проницаемость мембраны для протонов и делающим, таким образом, невозможным образование протонного градиента, а также к ингибиторам мембрансвязанной протонной АТФазы.

Последний этап, заключающийся в акцептировании сульфатом электронов с помощью серии редуктаз, представляет собой собственно диссимиляционную сульфатредукцию.

Известно восстановление сульфата до сульфида, входящего в состав серосодержащих аминокислот (цистин, цистеин, метионин), в конструктивном метаболизме большинства прокариот. Оно имеет место всегда при выращивании бактерий на среде, где источником серы служат сульфаты. Активность процесса ограничена потребностями клетки в серосодержащих компонентах, а они невелики.

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

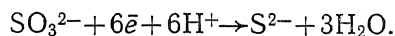


где АФС — аденозинфосфосульфат, а ФФ — пирофосфат.

У многих бактерий аденозинфосфосульфат подвергается еще одному фосфорилированию с участием АТФ, в результате которого образуется фосфоаденозинфосфосульфат. Затем аденозинфосфосульфат (или его фосфорилированное производное) восстанавливается с образованием сульфита в реакции, катализируемой АФС-редуктазой:

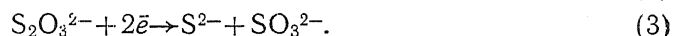
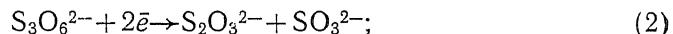


Последующее восстановление сульфита до сульфида осуществляется с помощью ассимиляционной сульфитредуктазы, катализирующей перенос 6 электронов на сульфит без образования каких-либо свободных промежуточных соединений:



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 H_2S ; 3) наконец, различны механизмы обоих процессов.

До стадии образования аденозинфосфосульфата и его последующего восстановления до сульфита оба процесса идут одинаково. Механизм восстановления SO_3^{2-} до H_2S при диссимиляционной сульфатредукции к настоящему времени выяснен неполностью. Обсуждаются два пути. Согласно первому из них восстановление сульфита до сульфида (как и при ассимиляционном восстановлении сульфата) катализируется одним ферментом. Более вероятен второй путь, по которому этот процесс протекает трехступенчато с участием сульфит-, три-тионат- и тиосульфатредуктазы и сопровождается образованием три-тионата ($\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$) и тиосульфата ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) в качестве свободных промежуточных продуктов:



При этом в реакциях 2 и 3 регенерируется сульфит, служащий субстратом реакции 1.

Не исключено, что у разных представителей группы восстановление сульфита до сульфида происходит по одно- или трехступенчатому пути.

У сульфатвосстанавливающих бактерий обнаружены 3 типа сульфитредуктаз, участвующих в диссимиляционных процессах. Один из ферментов, получивший название десульфовиридин (белок зеленого цвета), распространен среди представителей рода *Desulfovibrio*. Другой тип сульфитредуктазы — десульфорубинин (красно-коричневый белок) — выделен из штамма *Desulfovibrio desulfuricans*. Третий тип — коричневый белковый пигмент, обозначенный Р-582, обнаружен у различных представителей рода *Desulfotomaculum* и *Desulfonema*. Все типы диссимиляционных сульфитредуктаз, а также фермент, ассимиляционного типа, содержат сходные простетические группы, имеющие гемоподобную структуру и названные сирогемом. Простетические группы в белковом комплексе находятся в разном окружении, что и приводит к различиям в спектральных свойствах сульфитредуктаз.

Подобные простетические группы не найдены в ферментах какого-либо иного типа.

Сульфат в качестве конечного акцептора электронов у разных представителей этой группы может быть заменен другими окисленными соединениями серы (сульфит, тиосульфат, тетраионат), а также нитратом, нитритом, гидроксиламином, фумаратом.

Как можно видеть из разобранного выше процесса, окисление H_2 , сопряженное с восстановлением SO_4^{2-} до H_2S , происходит с образованием и потреблением полезной энергии. (Последнее имеет место при активировании сульфата.) Поэтому для общего положительного энергетического баланса необходимо, чтобы перенос электронов сопровождался функционированием не менее 2 генераторов $\Delta\mu_{H^+}$. При использовании в качестве энергетических субстратов органических соединений в присутствии сульфата часть АТФ может синтезироваться в реакциях субстратного фосфорилирования, внося определенный вклад в общий энергетический метаболизм этих бактерий.

Экология сульфатвосстанавливающих бактерий. Сульфатвосстанавливающие бактерии широко распространены в анаэробных зонах водоемов разного типа, почвах и пищеварительном тракте животных. Часто сульфатвосстанавливающие бактерии развиваются вместе с пурпурными и зелеными серобактериями, использующими в качестве донора электронов возникающий при сульфатредукции сероводород.

Сульфатвосстанавливающим бактериям принадлежит ведущая роль в образовании сероводорода в природе, в отложении сульфидных минералов. Однако накопление в среде H_2S часто приводит к отрицательным последствиям: в водоемах — к гибели рыбы, в почвах — повреждению растений. С активностью сульфатвосстанавливающих бактерий связана также коррозия в анаэробных условиях различного металлического оборудования.

Метанобразующие бактерии

Использование CO_2 в качестве конечного акцептора электронов при окислении молекулярного водорода присуще группе метанобразующих бактерий.

Предположение о биологической природе образования метана было высказано еще в XIX в. Однако изучение этого процесса и бактерий, его осуществляющих, тормозилось из-за отсутствия чистых культур. Сложность заключается в чрезвычайной чувствительности метанобразующих бактерий к O_2 . Быстрый прогресс в изучении этой группы прокариот связан с использованием методов культивирования анаэробов, разработанных Р. Е. Хангейтом (R. E. Hungate). В качестве основных приемов используется удаление O_2 из газов, в атмосфере которых осуществляется культивирование и все необходимые для работы операции, а также применение предварительно восстановленных сред.

Общая характеристика группы. Метанобразующие бактерии — морфологически разнообразная группа прокариот, объединяемая двумя общими для всех ее представителей признаками: строгим анаэробизмом и способностью образовывать метан. Первоначально основное внимание уделяли морфологическому разнообразию метанобразующих бактерий, следствием чего явилось их распределение по таксономическим группам бактерий со схожей морфологией. Позднее Х. А. Баркер (H. A. Barker, 1956), приняв в качестве доминирующего признака

Характеристика родов метанобразующих бактерий

Род	форма и размер клеток, мкм	Подвижность	Химический состав клеточной стенки	Окрашивание по Граму	Молярное содержание ГЦ-оснований, %	Субстраты, используемые для роста
<i>Methanobacterium</i>	длинные палочки; $0,4-0,8 \times 3-7$; часто образуют нити	неподвижные	псевдомуреин	+ или вариабельное	33—52	$H_2 + CO_2$; формат
<i>Methanobrevibacter</i>	кокки или короткие палочки; $0,5-0,8 \times 1,8-3,5$	подвижные или неподвижные	псевдомуреин	+	27—32	те же
<i>Methanomicrobium</i>	короткие палочки; $0,7 \times 1,5-2$	подвижные с помощью одного полярного жгутика	белок	—	49	» »
<i>Methanogenium</i>	клетки неправильной формы, близкие к коккам; $1,3-2,6$	подвижные с помощью перитрихальных жгутиков	белок	—	52—61	» »
<i>Methanococcus</i>	клетки неправильной формы, близкие к коккам; $0,5-1,0$	подвижные с помощью полярных жгутиков	белок	—	31	» »
<i>Methanospirillum</i>	короткие или извитые клетки; $0,4 \times 7$; часто образуют нити длиной до нескольких сотен мкм	подвижные с помощью полярных жгутиков	белок	—	45—47	» »
<i>Methanosarcina</i>	кокковидные клетки; 2—3; образуют пакеты	неподвижные	гетерополисахарид	+	39—51	$H_2 + CO_2$; метанол, метиламины, ацетат

уникальную особенность анаэробного метаболизма — образование метана — выделил на основании этого все известные метанобразующие бактерии, объединенные в 3 рода, в отдельное семейство Methanobacteriaceae. В таком виде метанобразующие бактерии представлены в восьмом издании Определителя бактерий Берги.

В настоящее время количество видов метанобразующих бактерий, полученных в чистой культуре, превышает 10. Они объединены в 7 родов, сгруппированных в 4 семейства и 3 порядка. Краткая характеристика родов представлена в табл. 43.

В состав группы входят бактерии с разной морфологией: прямые или изогнутые палочки разной длины; клетки неправильной формы, близкие к коккам; извитые формы. У некоторых видов — тенденция формировать нити или пакеты. Клетки неподвижные или передвигающиеся с помощью перитрихально или полярно расположенных жгутиков. Обнаружены виды, образующие споры. У представителей рода *Methanosarcina* в клетках найдены газовые вакуоли. Для некоторых метанобразующих бактерий характерна развитая система внутриклеточных элементарных мембран, являющихся результатом разрастания и впячивания в цитоплазму ЦПМ и сохраняющих с ней связь.

Необычны клеточные стенки метанобразующих бактерий, не содержащие ни мурамовой кислоты, ни D-аминокислот. У этой группы прокариот описаны клеточные стенки трех типов: 1) состоящие из пептидогликана особого химического строения, получившего название псевдомуреин; 2) построенные из белковых глобул; 3) гетерополисахаридной природы. В первом и третьем случаях окрашивание по Граму дает в большинстве случаев положительную реакцию. Все метанобразующие бактерии с клеточной стенкой, состоящей из белка, при окрашивании грамотрицательны. В то же время под электронным микроскопом клеточная стенка любого химического состава обнаруживает строение, аналогичное клеточной стенке грамположительного типа.

О гетерогенности группы можно судить по нуклеотидному составу ДНК ее представителей (молярное содержание ГЦ-оснований от 27 до 61%). Величина генома, измеренная у *Methanobacterium thermoautotrophicum*, составляет $1,1 \times 10^9$ Д, что приблизительно в 2—3 раза больше самого маленького для клеточных организмов генома, найденного у микоплазм, и во столько же раз меньше величины генома, характерного для большинства прокариот.

Своеобразен липидный состав метанобразующих бактерий, отличный от такового большинства прокариот. Основную массу составляют полярные липиды, представленные простыми эфирами, построенными из глицерина и C_{20} -спирта. Сложных эфиров, состоящих из глицерина и жирных кислот, у метанобразующих бактерий не обнаружено. Нейтральные липиды представлены изопреновыми углеводородами, содержащими от 14 до 30 углеродных атомов. Основным представителем этой группы — C_{30} -изопреноид сквален.

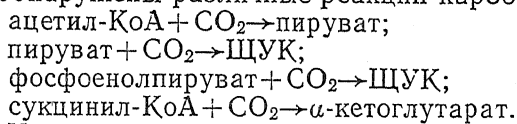
Запасных продуктов в виде гранул поли- β -оксимасляной кислоты или гликогена не найдено.

Большинство метанобразующих бактерий имеет температурный оптимум для роста в области 35—40°, но есть виды, у которых оптимальная зона сдвинута в сторону более низких (20—25°) или высоких (65—70°) температур. Все известные представители этой группы — нейтрофилы с оптимальным рН для роста в области 6—8.

В качестве источников углерода для биосинтетических целей метанобразующие бактерии используют узкий круг соединений. Около половины изученных видов не нуждаются для роста в каких-либо ор-

ганических соединениях. Они способны расти на синтетических средах, содержащих H_2 и CO_2 , при этом CO_2 служит не только для акцептирования электронов при окислении H_2 , но и единственным источником углерода. Для роста многих культур в атмосфере H_2 и CO_2 требуется внесение в среду органических веществ, стимулирующих рост или абсолютно для него необходимых. Это могут быть некоторые витамины группы В, ацетат, пируват, сукцинат, отдельные аминокислоты, дрожжевой экстракт или компоненты неизвестного состава, содержащиеся в природных средах обитания. Так, штаммы, выделенные из рубца жвачных животных, нуждаются в добавках рубцовой жидкости. Сложные органические соединения метанообразующие бактерии использовать не могут.

Изучение механизмов ассимиляции CO_2 не обнаружило у метанообразующих бактерий путей, функционирующих у подавляющего большинства прокариот. Не найдено активности рибулозодифосфаткарбоксилазы. В качестве одного из ранних меченых продуктов, образующихся при ассимиляции $^{14}CO_2$, идентифицирован ацетил-КоА, возникающий предположительно из 2 молекул CO_2 . У представителей этой группы обнаружены различные реакции карбоксилирования:



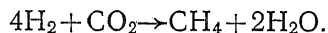
Установлены также некоторые последовательности реакций, характерные для ЦТК (см. рис. 102):

- 1) ЩУК \rightarrow фумарат \rightarrow сукцинат \rightarrow сукцинил-КоА \rightarrow α -кетоглутарат;
- 2) ацетил-КоА + ЩУК \rightarrow цитрат \rightarrow изоцитрат \rightarrow α -кетоглутарат.

Но до сих пор ни в одном случае у метанообразующих бактерий не показано существования циклического механизма, обеспечивающего ассимиляцию CO_2 .

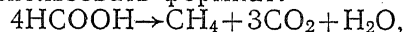
В качестве источника азота метанообразующие бактерии используют аммонийный азот или некоторые аминокислоты. Штаммов, способных к фиксации N_2 , не обнаружено. Источником серы могут служить сульфаты, сульфид или серосодержащие аминокислоты.

Энергетические процессы. Почти все метанообразующие бактерии могут получать энергию за счет окисления H_2 , сопряженного с восстановлением CO_2 :



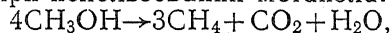
Опытами с меченым водородом показано, что H_2 в этом процессе служит только донором электронов, а источником протонов в молекуле метана является вода.

Помимо $H_2 + CO_2$ многие метанообразующие бактерии могут для получения энергии использовать формиат:



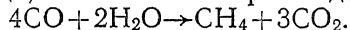
что сопровождается образованием метана.

Для представителей рода *Methanosarcina* показана способность образовывать метан при использовании метанола:

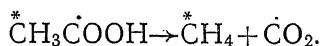


а также метилированных аминов.

У *Methanobacterium thermoautotrophicum* обнаружена способность окислять окись углерода, что также сопровождается синтезом метана:



Наконец, представители рода *Methanosarcina* и недавно описанные нитчатые метанообразующие бактерии, отнесенные к новому роду *Methanotherix*, могут использовать в качестве источника энергии и углерода ацетат:



Таким образом, акцепторами электронов (а в ряде случаев и донорами и акцепторами) у метанообразующих бактерий является ряд одноуглеродных соединений (CO_2 , CO , формиат, метанол, метилированные амины) и единственное двухуглеродное соединение — ацетат (табл. 43).

Механизм энергетических процессов у метанообразующих бактерий еще не расшифрован, но общие принципиальные положения установлены. Ясно, что получение энергии, по крайней мере при окислении H_2 , сопряженном с восстановлением CO_2 , связано с функционированием электронтранспортной системы, включающей дегидрогеназы, переносчики электронов и редуктазы. Перенос электронов приводит к образованию трансмембранного протонного градиента, разрядка которого с помощью мембранной АТФазы сопровождается синтезом АТФ. Доказательством получения метанообразующими бактериями энергии в результате окислительного фосфорилирования служит подавление у них образования АТФ при действии разобщителей и ингибиторов АТФазы. Мало, однако, известно об электронных переносчиках. Не изучена организация дыхательной цепи и ее H^+ -переносящих участков.

В качестве дегидрогеназ идентифицированы гидрогеназа и формиатдегидрогеназа. У всех изученных метанообразующих бактерий обнаружен необычный переносчик электронов, получивший название фактора F_{420} по максимуму флюоресценции в окисленной форме при 420 мкм. Хромофорная группа его представляет собой модифицированный флавин. Особенностью переносчика является низкий окислительно-восстановительный потенциал

(-380 мВ). При участии фактора F_{420} , а также гидрогеназы или формиатдегидрогеназы осуществляется одновременный перенос 2 электронов от H_2 или формиата на НАДФ^+ или в реакции, катализируемые редуктазами (рис. 109).

Долгое время считали, что у метанообразующих бактерий нет электронных переносчиков, типичных для остальных прокариот, имеющих электронтранспортные цепи. Недавно у *Methanosarcina barkeri* найдены ферредоксин Fe_3S_3 -типа, а также цитохромы типа *b* и *c*. Последние обнаружены только у видов, способных использовать в качестве энергетических субстратов соединения, содержащие метильные группы (метанол, метилированные амины, ацетат).

Восстановление CO_2 до CH_4 требует переноса 8 электронов, что осуществляется с помощью 4 редуктаз (рис. 109). Образующиеся на этом пути промежуточные продукты не находятся в свободном состоянии, а остаются связанными с переносчиками неизвестной при-

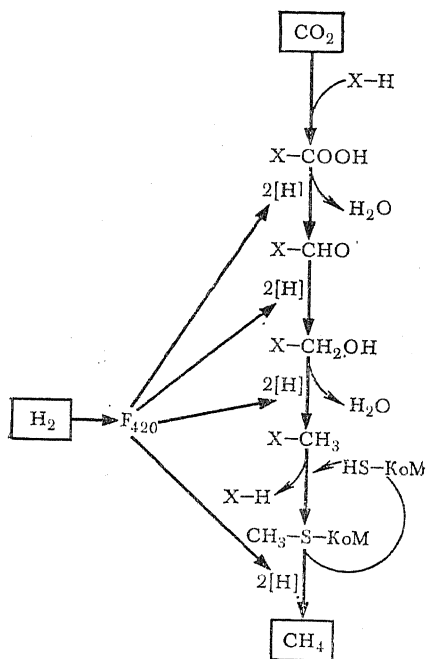


Рис. 109. Схэма восстановления CO_2 до метана метанообразующими бактериями:

X — переносчик неизвестной природы; HS-CoM — кофермент M; F_{420} — переносчик водорода флавиновой природы

роды. Идентифицирован к настоящему времени только один переносчик, участвующий на последнем этапе образования метана и названный коферментом М. Как показано на рис. 109, в результате трехступенчатого восстановления CO_2 образуется соединение, в котором к переносчику неизвестной природы присоединена метильная группа ($\text{X}=\text{CH}_3$). Последняя переносится затем на кофермент М, с которого с помощью соответствующей редуктазы и осуществляется освобождение молекулы метана.

Использование формиата метанобразующими бактериями начинается с его разложения формиатдегидрогеназой до CO_2 и H_2 , последующее метаболизирование которых происходит по схеме, изображенной на рис. 109.

Таким образом, большинство метанобразующих бактерий осуществляют энергетический метаболизм хемолитотрофного типа, сочетая его с конструктивным обменом авто- или гетеротрофного типа.

Особенности строения и метаболизма метанобразующих бактерий послужили основанием для выделения их вместе с некоторыми другими прокариотами в группу архебактерий, рассматриваемых в качестве очень древней и особой линии эволюции. Однако эта точка зрения разделяется не всеми исследователями. Не исключено, что особенности метанобразующих бактерий вторичного происхождения и обусловлены занимаемой ими экологической нишей.

Экология и роль в природе. Метаболические свойства метанобразующих бактерий (строгий анаэробиз, зависимость от ограниченно-го набора ростовых субстратов, и в первую очередь от молекулярного водорода) определяют их распространение в природе. Обычными местами обитания этих бактерий является анаэробная зона разных водоемов, богатых органическими соединениями. Они обнаруживаются в иловых отложениях озер и рек, в болотах и заболоченных почвах, в осадочных слоях морей и океанов. Метанобразующие бактерии — обитатели пищеварительного тракта животных и человека — важный компонент микрофлоры рубца жвачных животных.

Так как метанобразующие бактерии используют весьма ограниченный набор субстратов, их распространение в природе тесно связано с развитием образующих эти субстраты микроорганизмов. Совместно с последними метанобразующие бактерии обеспечивают протекание в природе важного крупномасштабного процесса — анаэробного разложения органических соединений, в первую очередь целлюлозы.

Главным экологическим фактором, определяющим развитие метанобразующих бактерий, является выделение H_2 , связанное с жизнедеятельностью представителей разных групп прокариот (кlostридии, сульфатвосстанавливающие бактерии и др.). Поэтому часто в природе созданы и существуют ассоциации между водородвыделяющими и метанобразующими бактериями. Примером такой естественной системы могут служить бактериальные ассоциации, обитающие в рубце жвачных животных и обеспечивающие разложение целлюлозы, пектина и других органических субстратов.

Метанобразующие бактерии представляют определенный практический интерес как продуценты газообразного топлива — метана.

Группы прокариот, использующих в качестве источника энергии органические соединения (хемоорганотрофы)

Большинство прокариот используют в качестве источника энергии различные органические соединения, осуществляя их полное окис-

ление до CO_2 и H_2O . Функционирующие у них системы извлечения энергии из органических субстратов состоят из нескольких взаимосвязанных механизмов. Рассмотрим пути, приводящие к получению энергии, на примере одного из представителей этой группы — *E. coli*. Основное количество сахаров (около 70%) катаболизируется у *E. coli* по гликолитическому пути, в результате чего из 1 молекулы глюкозы образуется по 2 молекулы пирувата, АТФ и НАД·Н₂. Превращение остального количества сахара осуществляется по окислительному пентозофосфатному циклу, один оборот которого приводит к синтезу 1 молекулы пентозофосфата, 2 молекул НАДФ·Н₂ и выделению 1 молекулы CO_2 . Наконец, ряд субстратов (глюконовая, маннановая, гексуроновые кислоты) метаболизируются *E. coli* по пути Энтнера — Дудорова, что приводит к образованию 2 молекул пирувата и по 1 молекуле АТФ, НАД·Н₂ и НАДФ·Н₂.

Молекулы пирувата поступают в ЦТК, где происходит их полное окисление, приводящее к выделению 2 молекул CO_2 , синтезу 3 молекул НАД·Н₂ и 1 молекулы ФАД·Н₂. В отличие от гликолиза и пути Энтнера — Дудорова окислительный пентозофосфатный цикл может обеспечить полное окисление исходного субстрата. Вторая особенность этого пути — отсутствие реакций, сопряженных с синтезом АТФ по механизму субстратного фосфорилирования.

Таким образом, функционирование гликолиза и пути Энтнера — Дудорова совместно с ЦТК, а также окислительного пентозофосфатного цикла приводит к полному окислению исходных субстратов углеводной природы. Электроны с переносчиков поступают в дыхательную цепь (см. рис. 105, В) и в зависимости от условий могут передаваться на молекулярный кислород или другие конечные акцепторы (фумарат, нитрат). Кроме того, *E. coli* в анаэробных условиях в отсутствие подходящего акцептора может получать энергию, осуществляя брожение, основным продуктом которого является этанол.

Если исходными субстратами служат не сахара, а вещества другой химической природы, их превращение на первом этапе приводит к возникновению соединений, которые в дальнейшем катаболизируются по одному из основных описанных выше путей.

Биохимическое изучение широкого круга дышащих хемоорганотрофных прокариот показало, что функционирующие у них системы получения энергии в принципе аналогичны описанной выше, различаясь определенными деталями: наличием одного или больше катаболических путей, составом переносчиков дыхательной цепи, природой используемых конечных акцепторов электронов и т. д. Складывается впечатление, что природа, создавая наиболее совершенную систему извлечения энергии из органических субстратов, на уровне прокариот опробовала сочетание разных механизмов, прежде чем остановиться на чем-то определенном.

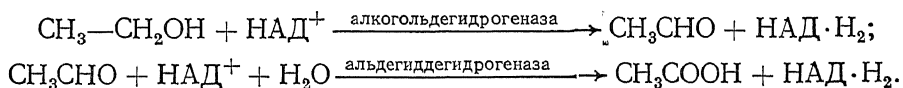
У прокариот, использующих органические соединения в качестве доноров электронов, мы также встречаемся с такими способами получения энергии, которые у высших форм жизни не встречаются. Остановимся на некоторых группах прокариот, характеризующихся специфическими типами энергетических процессов.

Уксуснокислые бактерии

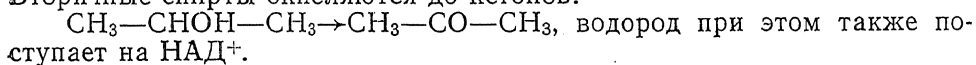
Уксуснокислые бактерии, выделенные в роды *Gluconobacter* и *Acetobacter*, могут получать энергию, осуществляя неполное окисление ряда органических соединений. В составе группы 4 вида, но много под-

видов, различающихся своими окислительными способностями. Это грам-отрицательные бесспорные палочки, слабоподвижные за счет перитрихально или полярно расположенных жгутиков, или неподвижные. Почти все виды нуждаются в отдельных витаминах, в первую очередь, до *Acetobacter* характерна способность синтезировать полисахарид целлюлозу в виде мощной пленки, образующейся на поверхности жидкой среды. Молярное содержание ГЦ-оснований ДНК уксуснокислых бактерий от 55 до 64%. Отличаются высокой устойчивостью к кислотам. Облигатные аэробы. Довольно требовательны к субстратам для роста. Большинство видов в качестве источника азота могут использовать аммонийные соли, некоторым необходимы готовые аминокислоты. Почти все виды нуждаются в отдельных витаминах, в первую очередь, в пантотеновой кислоте, однако есть формы, способные к синтезу всех факторов роста.

К числу окисляемых соединений относятся одноатомные спирты, содержащие от 2 до 5 углеродных атомов, а также многоатомные спирты — производные сахаров. Окисление первичных спиртов приводит к образованию кислот. Например, этанол с помощью соответствующих НАД-зависимых дегидрогеназ окисляется до ацетата:



Вторичные спирты окисляются до кетонов:



Многоатомные спирты окисляются этими бактериями в альдозы и кетозы, например: сорбит → сорбоза; глицерин → диоксиацетон. Альдозы и кетозы могут далее окисляться в соответствующие кислоты. Метаболизирование сахаров осуществляется по окислительному пентозофосфатному пути.

Круг окисляемых соединений различен для разных представителей, входящих в эту группу. С точки зрения характеристики энергетических возможностей уксуснокислых бактерий важно подчеркнуть, что у них развилась удивительная способность воздействовать на определенные химические группировки, осуществляя их одно- или двухступенчатое окисление. Наиболее характерна способность этих бактерий окислять этиловый спирт в уксусную кислоту, давшая название всей группе в целом.

Дальнейшая судьба полученных в результате неполного окисления продуктов различна. Некоторые уксуснокислые бактерии не способны к последующим превращениям образовавшихся соединений, и их окислительные способности, следовательно, весьма ограничены. Эти бактерии, объединенные в ряд *Glucobacter* (единственный вид *G. oxydans*), глюкозу окисляют до глюконовой кислоты, этанол — только до ацетата, который дальше не может ими окисляться из-за отсутствия «замкнутого» ЦТК.

Вторую группу составляют бактерии, способные к полному окислению органических субстратов до CO_2 и H_2O . В этом случае образовавшаяся уксусная кислота представляет собой лишь промежуточный этап, и после исчерпания из среды исходного субстрата бактерии начинают медленно окислять уксусную кислоту, включая ее в механизм конечного окисления — ЦТК. Бактерии этой группы объединены в род *Acetobacter*, типичным представителем которого является *A. peroxydans*.

Электроны от окисляемых субстратов поступают на НАД⁺ и далее через систему переносчиков дыхательной цепи передаются на O₂, служащий обязательным конечным акцептором электронов. Электронный транспорт приводит к генерированию Δμ_{H⁺}.

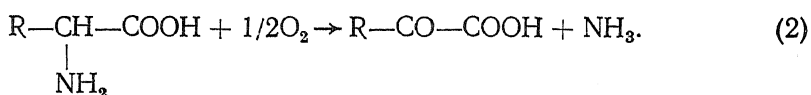
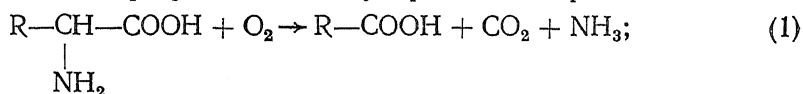
Уксуснокислые бактерии часто развиваются вслед за дрожжами, используя продукт спиртового брожения как субстрат для роста. Применяются в микробиологической промышленности для получения столового уксуса и в производстве аскорбиновой кислоты (на этапе окисления сорбита в сорбозу).

Аммонифицирующие бактерии

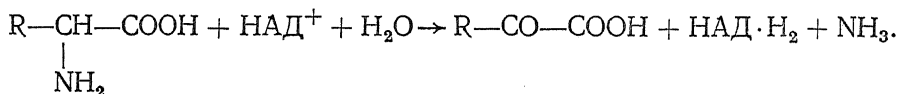
Аминокислоты и белки также могут выступать в качестве энергетических ресурсов для прокариот. Их использование связано в первую очередь с определенными ферментативными преобразованиями подготовительного характера. Белки сначала вне клетки расщепляются протеолитическими ферментами, катализирующими разрыв определенных пептидных связей, на отдельные фрагменты — пептиды, которые затем поглощаются клеткой и расщепляются внутриклеточными протеолитическими ферментами (пептидазами) до отдельных аминокислот.

Дальнейшее превращение аминокислот возможно по нескольким направлениям: 1) аминокислоты непосредственно используются в конструктивном метаболизме для построения белковых молекул; 2) аминокислоты служат основным материалом в энергетических процессах. В этом случае метаболизирование аминокислот начинается с их дезаминирования, т. е. отщепления аминогруппы от аминокислоты, и выделения азота в виде неорганического восстановленного соединения — аммиака.

Процесс дезаминирования может происходить несколькими путями. 1. Реакция идет при участии молекулярного кислорода:



2. Окислительное дезаминирование осуществляется с помощью НАД-зависимых дегидрогеназ:



При дезаминировании некоторых аминокислот (аланина, аспарагиновой, глутаминовой кислот) образуются α-кетокислоты (пировиноградная, α-кетоглутаровая, щавелевоуксусная), принадлежащие к числу промежуточных продуктов клеточного катаболизма. Большинство же органических кислот, возникающих при дезаминировании аминокислот, подвергаются сначала предварительным превращениям, приводящим к появлению соединений, способных прямо включаться в основные катаболические пути клетки. Например, распад L-лейцина в конечном итоге приводит к образованию ацетил-КоА — исходного субстрата ЦТК. Такова энергетическая сторона метаболизма физиологической группы бактерий, называемых а м м о н и ф и к а т о р а м и.

Использование в качестве источника углерода и энергии аминокислот требует от организмов соответствующего набора ферментов, катализирующих протеолиз белков и пептидов и дезаминирование всего набора аминокислот. Для аммонификаторов вообще характерно использование широкого круга органических соединений, в том числе сахаров, органических кислот, которые, как правило, они предпочитают белкам. Форм, приспособленных к использованию только белков, немного.

Эта группа представлена в основном грамположительными споровыми палочками, входящими в состав рода *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*). Из беспоровых форм в группу аммонификаторов входят представители родов *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Proteus*.

Процесс аммонификации в быту известен как «гниение», поскольку при этом происходит накопление продуктов, обладающих неприятным специфическим запахом: сероводорода, метилмеркаптана, первичных аминов, известных под названием «трупных ядов». Роль гнилостных бактерий в природе огромна. Доля белка в тканях умерших животных и растений велика, и эти прокариоты осуществляют минерализацию белков, разлагая их в конечном итоге до CO_2 , NH_3 и H_2S .

Целлюлозные бактерии

К прокариотам, использующим в качестве энергетического процесса электронный транспорт на молекулярный кислород, относятся целлюлозные (клетчатковые) бактерии.

Целлюлоза — вещество полисахаридной природы, составляющее каркас растительных клеточных стенок. Растительные остатки больше чем наполовину состоят из целлюлозы. Этот материал, инертный ко многим воздействиям, при поступлении в почву перерабатывается целлюлозными бактериями. Сначала целлюлоза гидролизуется до глюкозы целлюлазой, действующей на $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидные связи. Затем глюкоза поступает в клетку и метаболизируется в системе катаболических процессов (гликолиз \rightarrow ЦТК), а водород с соответствующих переносчиков передается по дыхательной цепи на O_2 . К разложению целлюлозы способны бактерии, относящиеся к разным группам: некоторые виды актиномицетов, бактерии рода *Cellulomonas*, представители родов *Cytophaga* и *Sporocytophaga* и др.

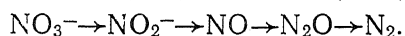
Единственное, что объединяет эти организмы, — наличие мощных гидролитических ферментов, которые могут выделяться в окружающую среду или же оставаться связанными с клеточной поверхностью. В последнем случае для воздействия на целлюлозу клеткам необходим прямой контакт с ней. Для многих бактерий, гидролизующих целлюлозу, характерна высокая специфичность по отношению к этому субстрату. Бактериям, использующим целлюлозу, принадлежит огромная роль в природе, так как именно им мы обязаны разложением клетчатки, составляющей основную массу всех синтезируемых природных соединений.

Денитрифицирующие бактерии

У многих прокариот конечным акцептором электронов дыхательной цепи, наиболее часто заменяющим молекулярный кислород, является нитрат. Он может восстанавливаться до нитрита, накапливающегося в среде, или молекулярного азота, удаляющегося в атмосферу.

Процесс восстановления нитрата до нитрита в системе энергетического метаболизма, получивший название нитратного дыхания, широко распространен среди прокариот и обнаружен у представителей более 70 родов.

Гораздо уже круг прокариот, способных восстанавливать нитраты или нитриты до N_2 . На этом пути в качестве промежуточных продуктов идентифицированы окись (NO) и закись (N_2O) азота:



Как и молекулярный азот, NO и N_2O — газообразные продукты.

Процесс восстановления NO_3^- или NO_2^- до какой-либо из газообразных форм азота получил название денитрификации. К денитрификации способны только прокариоты. Физиологическое значение этого процесса — способность генерировать АТФ в анаэробных условиях, используя для акцептирования электронов, поступающих в дыхательную цепь, многоступенчатое восстановление NO_3^- или NO_2^- . Наиболее распространенные формы денитрификации — восстановление NO_3^- или NO_2^- до N_2 . Встречаются также штаммы, осуществляющие отдельные этапы процесса: $NO_3^- \rightarrow N_2O$, N_2O или $NO \rightarrow N_2$. «Полная» или «усеченная» денитрификация обнаружена у прокариот, принадлежащих к 24 родам из всех основных физиологических групп: фототрофных (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) и хемолитотрофных (*Thiobacillus denitrificans*, *Paracoccus denitrificans*) прокариот, грамположительных и грамотрицательных факультативных анаэробов (виды *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* и др.). В наибольшей степени способность к денитрификации распространена у бактерий из родов *Bacillus* и *Pseudomonas*.

Свойство восстанавливать нитрат представляется менее необычным, если вспомнить, что бактерии, использующие в качестве источника азота нитраты (а таких много), должны иметь ферментную систему для его восстановления, так как в конструктивном метаболизме азот участвует только в восстановленной форме. Таким образом, восстановление нитрата в системе реакций конструктивного метаболизма, получившее название ассимиляционной нитратредукции ($NO_3^- \rightarrow NH_3$), очевидно. Оно имеет место всегда при выращивании на среде с нитратами в качестве единственного источника азота.

Способность к ассимиляционной нитратредукции не обязательно облигатно связана со способностью к денитрификации. Например, *Pseudomonas aeruginosa* обладает обеими метаболическими активностями; у *Rhodopseudomonas sphaeroides* обнаружена способность к денитрификации, но не к ассимиляции нитрата; наконец, многие прокариоты могут ассимилировать нитрат, но не могут осуществлять денитрификацию. Оба процесса восстановления нитрата различаются по целому ряду признаков (табл. 44). Информация об ассимиляционной нитратредукции и денитрификации закодирована в разных генах.

Большинство денитрификаторов — хемоорганотрофы. Использование в качестве конечного акцептора электронов нитратов позволяет им окислять органические субстраты полностью (до CO_2 и H_2O) по обычным катаболическим путям. Переходящий на переносчики водород поступает в дыхательную цепь.

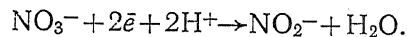
Изменение свободной энергии при окислении 1 молекулы глюкозы молекулярным кислородом ($\Delta G_0' = -2870$ кДж/моль) того же порядка, что и окисление этого же субстрата в анаэробных условиях нитратом, восстанавливаемым до нитрита ($\Delta G_0' = -1770$ кДж/моль) или молекулярного азота ($\Delta G_0' = -2700$ кДж/моль). Таким образом, энер-

Различия между ассимиляционной нитратредукцией и денитрификацией

Признак	Ассимиляционная нитратредукция	Денитрификация
Локализация в клетке	в цитоплазме	в мембранах
Отношение к энергетическому метаболизму	не связана с получением клеточной энергии	связана с синтезом АТФ
Отношение к O ₂	нечувствительна к O ₂	O ₂ ингибирует активность и репрессирует синтез NO ₃ ⁻ и NO ₂ ⁻ -редуктаз
Отношение к NO ₃ ⁻ и NO ₂ ⁻		индуцирует синтез соответствующих редуктаз
Отношение к NH ₃	репрессирует синтез ферментов	
Судьба конечного продукта	входит в состав азотсодержащих клеточных компонентов	выделяется из клетки

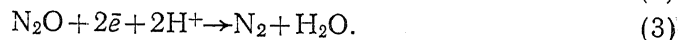
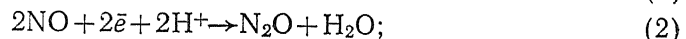
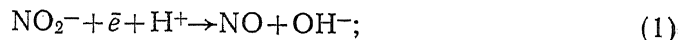
гетические возможности процесса окисления глюкозы с участием нитрата сопоставимы с энергетическими возможностями процесса дыхания. Запасание клеткой полезной энергии при денитрификации зависит от организации электронного транспорта, свойств и локализации соответствующих редуктаз. Электронтранспортные цепи денитрификаторов в анаэробных условиях содержат все основные типы связанных с мембранами переносчиков: флавопротеиды, хиноны (убихинон, менахинон, или нафтохинон), цитохромы типа *b*, *c*. Цитохромоксидазы в этих условиях не синтезируются.

Полный процесс денитрификации состоит из 4 восстановительных этапов, каждый из которых катализируется специфической мембран-связанной редуктазой. Нитратредуктазы всех денитрификаторов структурно сходны между собой (содержащие молибден FeS-белки) и катализируют восстановление нитрата до нитрита в соответствии с уравнением:



С дыхательной цепью нитратредуктазы сопряжены на уровне цитохрома *b* (см. рис. 108, В).

Нитритредуктазы (1) и, вероятно, редуктазы окиси (2) и закиси (3) азота акцептируют электроны на уровне цитохрома *c*, осуществляя следующие реакции:



Денитрифицирующие бактерии содержат один из двух типов нитритредуктаз: медьсодержащий фермент или цитохром с гемами типа *c+d*. Химическая природа остальных редуктаз пока не установлена.

В дыхательной цепи денитрификаторов при переносе электронов на нитрат функционируют 2 генератора $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (вместо 3 при переносе электронов на O₂). Процесс восстановления нитрата до нитрита локализован на цитоплазматической стороне мембраны. По другим данным,

ферментный комплекс имеет трансмембранную ориентацию, в результате чего поглощенные из цитоплазмы протоны переносятся на противоположную сторону, где участвуют в нитратредуктазной реакции. В любом из вариантов это приводит к созданию трансмембранного протонного градиента нужного направления (см. рис. 25). Восстановление нитрита и окислов азота происходит на наружной стороне ЦПМ и, вероятно, некоторые из выделенных протонов должны для этих целей поглощаться из периплазматического пространства. Однако не исключено, что участие цитохрома *c* в переносе электронов на редуцтанты нитрита и окислов азота приводит к функционированию еще одного генератора $\Delta\mu_{H^+}$. Тогда в любом случае при денитрификации перенос 2 электронов будет сопряжен с трансмембранным переносом, приблизительно, 4 протонов, т. е. энергетический выход составит около 70% сравнительно с дыханием.

Все денитрифицирующие бактерии — факультативные анаэробы, переключающиеся на денитрификацию только в отсутствие O_2 , поэтому, вероятно, их приспособление к анаэробным условиям — вторичного происхождения. Способность к денитрификации развилась после формирования механизмов использования O_2 как конечного акцептора электронов. Первым шагом на пути вторичного приспособления к анаэробным условиям явилось развитие нитратного дыхания. Следующий шаг — совершенствование способности использовать нитраты для акцептирования электронов дыхательной цепи — привел к возникновению денитрификации.

Денитрифицирующие бактерии — обитатели пресных и морских водоемов, почв разного типа, в связи с чем денитрификация широко распространена в природе. Этот процесс служит источником атмосферного азота, являясь необходимым звеном в круговороте азота в природе. В то же время денитрификация имеет отрицательное значение, так как приводит к обеднению почв азотом. Потери азотных удобрений в почвах в результате денитрификации могут составлять от 5 до 80%. Один из способов борьбы с денитрификацией — рыхление почвы, создающее в ней аэробные условия, что заставляет денитрифицирующие бактерии перестраивать электронтранспортные системы, осуществляя перенос электронов на O_2 , а не на нитраты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предположение, что в основе эволюции прокариот лежит совершенствование способов получения энергии, достаточно четко прослеживается на современном материале. Имеющиеся данные можно интерпретировать в эволюционном плане, если исходить из того, что существующие в настоящее время разные физиологические группы прокариот дошли до нас в основном неизменными с того времени, когда они впервые были сформированы.

Представление о том, что первыми формами жизни были анаэробы, получающие энергию в процессе брожения за счет субстратного фосфорилирования, хорошо согласуется с общей теорией происхождения жизни, выдвинутой А. И. Опариним. Наиболее древними из суще-

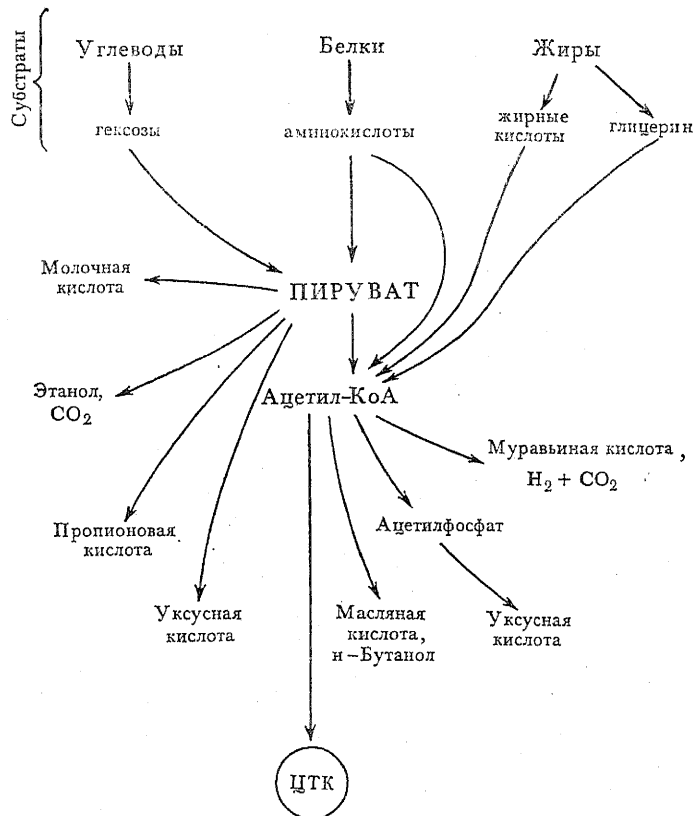


Рис. 110. «Судьба» пирувата в процессах брожения у первично анаэробных прокариот

ствующих прокариот являются группы бактерий, получающие энергию в результате функционирования гликолитического пути сбраживания углеводов. Можно предполагать, что гликолиз — первый сформированный механизм получения клеткой энергии. (Вероятно, гликоли-

зу — сложной системе последовательных ферментативных реакций — предшествовали более простые пути получения энергии. Однако нет четких доказательств существования среди современных прокариот форм с энергетическим метаболизмом догликолитического типа.) Основная проблема на этом этапе сводилась к тому, чтобы создать «ловушки» для возникающего при окислительных преобразованиях субстрата водорода. Разные варианты решения донор-акцепторной проблемы привели к появлению разных видов брожений (рис. 110).

Источником энергии и всех органических соединений, необходимых для построения веществ клетки, первоначально служили органические субстраты абиогенного происхождения. Поскольку извлечение энергии из органического субстрата (преимущественно углеводов) при его метаболизировании по гликолитическому пути было весьма незначительным (в процессе гликолиза из молекулы глюкозы извлекается приблизительно 1/20 часть той энергии, которая извлекается из нее при полном окислении), это привело к довольно быстрой переработке доступных органических субстратов и обеднению ими окружающей среды.

Поиск новых источников энергии и углерода привел к созданию метаболических систем, осуществляющих использование света и углекислоты. Важными моментами в формировании механизма использования световой энергии были: 1) создание фоторецепторов; 2) формирование фотосинтетической цепи переноса электронов; 3) формирование нового механизма фосфорилирования, сопряженного с переносом электронов, — фотосинтетического фосфорилирования. Использование углекислоты в качестве основного или единственного источника углерода привело к созданию эффективного циклического механизма ее фиксации — цикла Кальвина, расширившего конструктивные возможности живых организмов.

Таким образом, на этом этапе эволюции прослеживается четкая тенденция создания энергетических и конструктивных систем, обеспечивающих наибольшую независимость существующих прокариотных форм от внешней среды. Вершина эволюции в этом направлении — цианобактерии, у которых такая независимость достигается максимально, и в первую очередь за счет создания механизма, позволяющего использовать воду в качестве донора электронов. С цианобактериями связаны два момента, оказавших решающее влияние на дальнейший ход эволюции прокариот. Первый обусловлен появлением молекулярного кислорода. Второй — тем, что цианобактерии явились на Земле первыми интенсивными продуцентами органического вещества.

Появление молекулярного кислорода открыло новые возможности для совершенствования системы получения живой клеткой энергии из химических соединений. Формируется способ получения энергии, основанный на глубоком окислении неорганических и органических соединений окружающей среды. (Органические соединения — теперь соединения, имеющие биогенное происхождение). Этот способ связан с созданием новой системы электронного транспорта, в принципе сходной, но не идентичной фотосинтетической системе переноса электронов, и сопряженному с ней механизму фосфорилирования, так называемому окислительному фосфорилированию. Последний, по современным представлениям, аналогичен механизму фотофосфорилирования. В мире прокариот обнаружено огромное разнообразие типов жизни, у которых основным источником энергии служит окислительное фосфорилирование. Различия заключаются в природе доноров и акцепторов электронов.

Таким образом, все современные способы получения энергии жи-

выми организмами сформировались на уровне прокариотной клеточной организации. Схема всех возможных энергетических процессов у прокариот представлена на рис. 111. В процессе дальнейшей эволюции развитие получили только наиболее совершенные варианты.

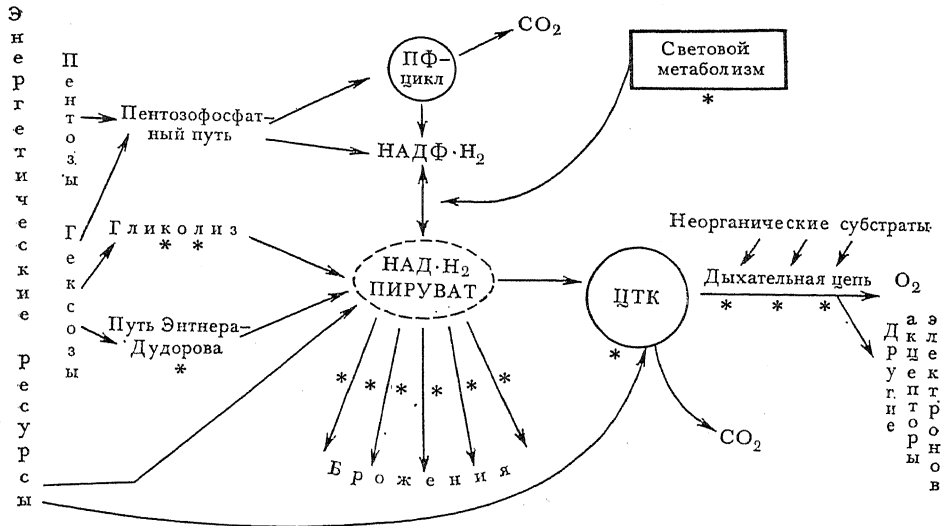


Рис. 111. Общая схема энергетических процессов у прокариот. Звездочками обозначены места фосфорилирования

В мире эукариот развились два полярных способа существования: хемоорганогетеротрофия и фотолитоавтотрофия. Первый лег в основу метаболизма представителей царств Animalia и Fungi, второй — Plantae. Все животные и грибы получают энергию в результате функционирования механизмов субстратного и окислительного фосфорилирования. Высшие растения сочетают в себе оба типа метаболизма и получают энергию за счет функционирования всех механизмов фосфорилирования: фотосинтетического, субстратного и окислительного. Доминирующим и первичным у них является фотолитоавтотрофный тип метаболизма и сопряженный с ним механизм фотосинтетического фосфорилирования.

ЛИТЕРАТУРА

- Акименко В. К. Цианидрезистентное дыхание микроорганизмов. — Успехи микробиол., 1981, т. 16, с. 3.
- Брода Э. Эволюция биоэнергетических процессов. М., Мир, 1978.
- Гоготов И. Н., Кулакова С. М. Функции и свойства супероксиддисмутаза микроорганизмов. — Успехи микробиол., 1981, т. 16, с. 30.
- Горленко В. М., Дубинина Г. А., Кузнецов С. И. Экология водных микроорганизмов. М., Наука, 1977.
- Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М., Мир, 1982.
- Громов Б. В. Ультраструктура синезеленых водорослей. Л., Наука, 1976.
- Гусев М. В., Гохлернер Г. Б. Свободный кислород и эволюция клетки. М., Изд-во Моск. ун-та, 1980.
- Дубинина Г. А. Успехи в изучении пресноводных бактерий. — Успехи микробиол., 1978, т. 13, с. 164.
- Дуда В. И. Особенности цитологии спорообразующих бактерий. — Успехи микробиол., 1982, т. 17, с. 87.
- Дуда В. И., Эль-Регистан Г. И. Физиолого-биохимические и цитологические особенности новых хемоорганотрофных анаэробных бактерий. — Успехи микробиол., 1978, т. 13, с. 143.
- Жизнь микробов в экстремальных условиях. М., Мир, 1981.
- Заварзин Г. А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии. М., Наука, 1978.
- Заварзин Г. А. Прокариотные системы в связи с филогенией бактерий. — Журн. общей биол., 1979, № 1, с. 5.
- Кондратьева Е. Н. Хемолитотрофы и метилотрофы. М., Изд-во Моск. ун-та, 1983.
- Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М., Наука, 1981.
- Кондратьева Е. Н., Горленко В. М. Пурпурные и зеленые бактерии. — Успехи микробиол., 1978, т. 13, с. 8.
- Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М., Мир, 1980.
- Краткий определитель бактерий Берги. М., Мир, 1980.
- Олескин А. В., Самуилов В. Д. Электрогенная циклическая редоксцепь пурпурных бактерий. — Успехи совр. биол., 1983, т. 95, с. 323.
- Опарин А. И. Материя, жизнь, интеллект. М., Наука, 1977.
- Прангишвили Д. А. Молекулярная биология архебактерий. — Молек. биол., 1983, т. 17, с. 234.
- Родова Н. А. Дыхательная система фототрофных пурпурных бактерий. — Успехи микробиол., 1980, т. 15, с. 3.
- Рэкер Э. Биоэнергетические механизмы: новые взгляды. М., Мир, 1979.
- Свободные радикалы в биологии, т. 1, 2. М., Мир, 1979.
- Скулачев В. П. Аденозинтрифосфат и трансмембранный потенциал ионов водорода — две конвертируемые и транспортабельные формы энергии в живой клетке. — Успехи совр. биол., 1977, т. 84, с. 165.
- Скулачев В. П. Транспорт энергии и электронов вдоль биологических мембран. — Успехи совр. биол., 1979, т. 88, с. 163.
- Скулачев В. П., Козлов И. А. Протонные аденозинтрифосфатазы. М., Наука, 1977.
- Стейннер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов, т. 1—3. М., Мир, 1979.
- Valch W. E. et al. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. — Microbiol. Revs., 1979, vol. 43, p. 260.
- Binder A. Respiration and photosynthesis in energy-transducing membranes of cyanobacteria. — J. Bioenerg. Biomembr., 1982, vol. 14, p. 271.
- Contemporary Microbial Ecology. — Acad. Press. London—New York—Toronto e. a., 1980.
- Gest H. The evolution of biological energy-transducing systems. — FEMS Microb. Letters, 1980, vol. 7, p. 73.
- Gibbons N. E., Murray R. G. E. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. — Intern. J. System. Bacter., 1978, vol. 28, p. 1.
- Haddock B. A., Jones C. W. Bacterial respiration. — Bacter. Revs., 1977, vol. 41, p. 47.
- Haselkorn R. Heterocysts. — Ann. Rev. Plant Physiol., 1978, vol. 29, p. 319.
- Molecular mechanisms of oxygen activation. — Acad. Press, N. Y., 1974.
- Morris J. G. The physiology of obligate anaerobiosis. — Adv. Microb. Physiol., 1975, vol. 12, p. 169.

- Peschek G. A. Phylogeny of photosynthesis and the evolution of electron transport: the bioenergetic backbone. — *Photosynthetica*, 1981, vol. 15, p. 543.
- Raven J. A., Smith F. A. H^+ transport in the evolution of photosynthesis. — *Bio-systems*, 1981, vol. 14, p. 95.
- Robson R. L., Postgate J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1980, vol. 34, p. 183.
- Stanier R. Y. The position of cyanobacteria in the world of phototrophs. — *Carlsberg Res. Commun.*, 1977, vol. 42, p. 77.
- Stanier R. Y., Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria.— *Ann. Rev. Microbiol.*, 1977, vol. 31, p. 225.
- Stewart W. D. P. Some aspects of structure and function in N_2 -fixing cyanobacteria. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1980, vol. 34, p. 497.
- Thauer R. K., Jungermann K., Decker K. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. — *Bacter. Revs.*, 1977, vol. 41, p. 100.
- The Prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, vol. 1, 2. — Springer Verlag, Berlin; Heidelberg; New York, 1981.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Абиогенный синтез
 — — аминокислот 166
 — — моносахаров 167
 — — нуклеозидов и нуклеотидов 167
 — — пептидов 168
 Автотрофы 69
 Адаптация 128
 Аденозинтрифосфат (АТФ) 84
 — абиогенный синтез 167
 — как отрицательный эффектор 124
 Аденозинфосфосульфат 332
 Азид 325
 Азотфиксация 213
 Акинеты 58
 Актиномицеты 151
 Акцепторы электронов (водорода) 81, 180
 Алкалофилы 107
 Аллофикоцианины 229
 Аминокислоты, биосинтез 75
 Амитап 325
 Аммонификаторы 361
 Амфиболиты 68
 Анаболизм 67
 Антимисин А 325
 Антипорт 89
 Анаэробы 98
 Арнона цикл 249
 Ароматические аминокислоты
 — — биосинтез 113
 — — регуляция синтеза 113
 Археобактерии 139
 Ассимиляционная нитратредукция 362
 Ауксотрофы 72
 N-ацетилглюкозамин 26
 Ацетил-КоА 197
 N-ацетилмурамовая кислота 26
 Ацетилфосфат 197
 Ацетон 188
 Ацидофилы 107
 Ацилпереносящие белки (АПБ) 74
 Аэробы 97
 Аэросомы 53
 Баециты 52
 Базальное тело 34
 Бактериальная хромосома 47
 Бактерии
 — аммонифицирующие 360
 — ацидофильно-термофильные 30
 — водородные 342
 — гетероферментативные молочнокис-
 лые 217, 220
 — гомоферментативные молочнокислые
 186
 — денитрифицирующие 361
 — зеленые 232, 260
 — — серные 249, 260
 — — скользкие 261
 — клубеньковые 147, 306
 — метанобразующие 150, 352
 — нитрифицирующие 339
 — окисляющие соединения серы 331
 — олиготрофные 71
 — почкующиеся 143
 — пропионовокислые 199
 — пурпурные 231, 255
 — — несерные 256
 — — серные 256, 258
 — рода *Clostridium* 208
 — скользкие 141
 — стебельковые 143
 — сульфатовосстанавливающие 347
 — тионовые 331
 — уксуснокислые 358
 — хемолитотрофные 150
 — целлюлозные 361
 Бактериородопсин 286
 Бактериохлорофиллы 227
 Бактериоиды 147
 Брожение 81, 177
 — ацетоно-бутиловое 206
 — гетероферментативное молочнокис-
 лое 218
 — гомоацетатное 210
 — гомоферментативное молочнокислое
 180
 — двухфазность 207
 — маслянокислое 200
 — пропионовокислое 194
 — спиртовое 189
 — энергетический выход 178, 186, 190,
 198, 206
 Везикулы 45
 Водород молекулярный
 — — образование 205
 — — окисление 343
 Вологиновые зерна 55
 Ворсинки 37
 Вуда—Веркмана реакция 194
 Выросты 143
 Высокоэнергетические соединения 84
 Газовые выкуоли см. Аэросомы
 Галобактерии 30, 148, 286
 Галофилы экстремальные 148
 Генераторы Δp_{H^+} 326
 Ген-оператор 118
 Ген-регулятор 118
 Генотип 127
 Гетеротрофы 69
 Гетероцисты 280
 — азотфиксация 283
 — строение 281
 Гидрогеназа (ы) 205, 295, 344
 Гидроксидный радикал 297
 Гидроксиламин 341
 Гликолиз 180
 Гликолипиды 39
 Глиоксилатный шунт 320
 Глутаматдегидрогеназа 76
 Глутаминсинтетазы 76, 109
 Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа 215
 Глюконеогенез 73
 Гормогонии 271
 Гранулеза 55
 Дегидрогеназы
 — НАД-зависимые 322
 — флавиновые 323
 ДНК прокариот
 — — репликация 49
 — — содержание ГЦ-оснований 138

- Деление прокариот
 - бинарное 50
 - — множественное 52
- Денитрификация
 - полная 362
 - усеченная 362
- Десатураза 75
- Десульфовиридин 351
- Десульфурубидин 351
- Диацетил 188
- Диоксигеназы 309
- Дипиколиновая кислота 61
- Доноры электронов (водорода) 80
 - — неорганические 328
 - — органические 328
- Дрожжи 193
- Дыхание 81, 308
 - анаэробное 98, 328
 - нитратное 362
 - сульфатное 349
 - флавиновое 200, 314
 - энергетический выход 327
- Дыхательная цепь 321
 - — бактерий 325
 - — митохондрий 326
 - — обратный перенос электронов 330
 - — переносчики 322
- Жгутки 33
 - расположение 33
 - строение 34
- Железо, окисление 335
- Железобактерии 334
 - без клеточной стенки 338
 - нитчатые 336
 - одноклеточные 336
- Железосеросодержащие белки (FeS-белки) 202
- Жирные кислоты
 - — биосинтез 74
 - — ненасыщенные, биосинтез 75
- Ингибирование 112
- Индукция 120
- Жальвина цикл 251
- Капсула 32
- Карбоксидобактерии 345
- Карбоксисомы 53
- Каротиноиды 230, 302
- Катаболизм 67, 80
- Каталаза 300
- α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс 320
- 2 - кето-3-дезоксиглюконат-альдолаза (КДФГ-альдолаза) 221
- Кислород
 - атомарный 299
 - молекулярный 293
 - синглетный 298
- Клеточная стенка
 - — грамотрицательных прокариот 29
 - — грамположительных прокариот 26
 - — необычная 29
 - — функции 31
- Клостридии
 - включение CO_2 213
 - протееолитические 210
 - пуринолитические 212
 - сахаролитические 210
 - фиксация N_2 213
- Коацерватные капли 170
- Конъюгация 131
- Коринебактерии 151
- Кортекс 61
- Кофермент А 196
- Ксантофиллы 231
- Ламеллы 45
- Леггемоглобин 147
- Лизоцим 30
- Липиды, биосинтез 73
- Макроэргические связи 84
- Марганец, окисление 335
- Мезосомы 45
- Мезотрофы см. Миксотрофы
- Мезофилы 102
- Мембрана (ы) 38
 - белки 40
 - внутрицитоплазматические 38, 44
 - инвагинация 44
 - липиды 38
 - наружные 26, 31
 - — липополисахарид 29
 - строение 41
 - фотосинтетические 44
 - химический состав 38
 - цитоплазматическая 38, 42
 - элементарные 15
- Мерозигота 131
- Метаболизм
 - конструктивный 67
 - периферический 67
 - промежуточный 67
 - энергетический 67, 78
- Мета-, образование 355
- Метахроматиновые зерна см. Волутиновые зерна
- Микобактерии 153
- Микоплазмы 31, 144, 157
- Микроаэрофилы 97
- Микроплазмодесмы 66
- Микросферы см. Протоклетки
- Миксобактерии 29, 141
- Миксоспоры 57
- Миксотрофы 96
- Молекулярная сера, окисление 332
- Мононуклеотиды, биосинтез 77
- Моноксигеназы 310
- Мутации 128
- Мутуализм 147
- Нейтрофилы 106
- Нитратредуктаза 71, 363
- Нитритоксидаза 341
- Нитритредуктаза 72, 363
- Нитрификация 339, 341
 - гетеротрофная 342
- Нитрогеназа 213, 295
- Нитроксил 341
- Нуклеоид 47
- Нумерическая систематика 137
- Озон 299
- Окисление
 - аммиака 339
 - водорода 342
 - железа 335
 - марганца 335
 - неферментативное 308
 - нефосфорилирующее 309
 - нитрита 339

- свободное 308
- серы 331
- сопряженное с запасанием энергии 309
- фосфорилирующее 309
- Окислительно-восстановительный потенциал 81
- Окислительный пентозофосфатный путь 215, 219
- Окись углерода 325, 345
- Окрашивание по Граму 25
- Оксидазы 310
- Оперон 118
- Органеллы 15
- Отношение Р/О 327
- Паразиты
 - облигатные 69
 - факультативные 70, 146
- Пастера эффект 190
- Пептидогликан 26
- Перекись водорода 297
- Перенос электронов
 - — нециклический 240
 - — обратный 241, 330
 - — циклический 239
- Периплазматическое пространство 26, 32
- Перитрихи 34
- Пероксидаза 300
- Пили см. Ворсинки
- F-Пили см. Половые ворсинки
- Пилин 37
- Пируват, фосфоролитическое разложение 204
- Пируватдегидрогеназа 197, 318
- Пируватдекарбоксилаза 189
- Пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза 202
- Плазмиды 127
- Плеоморфизм 23
- Поли- β -оксимасляная кислота 55
- Политрихи
 - биполярные 34
 - монополярные 34
- Полиэдральные тела см. Карбоксисомы
- Половые ворсинки 38
- Почкование 51
- Прокариотная клетка 15
 - — клеточная оболочка 24
 - — клеточная стенка 24
 - — поверхностные структуры 24
 - — протопласт 24
 - — химический состав 68
- Прокариоты 16
 - без клеточной стенки 30
 - внутрицитоплазматические включения 52
 - генетический аппарат 47, 125
 - граммотрицательные 25
 - грамположительные 25
 - группы 141
 - движение 35
 - ДНК 49
 - запасные вещества 53
 - многоклеточные 64
 - морфологическая дифференцировка 55
 - размеры 19
 - рибосомы 46
- систематика 135
- способы размножения 50
- способы существования (питания) 94
 - форма 22
- Проспора 60
- Простеки см. Выросты
- Протеиноиды 168
- Протисты 14
- Протоклетки 169
- Протонная АТФ-синтетаза (АТФаза) 87, 311
- Протопласты 30
- Прототрофы 72
- Прохлорофиты 232, 284
- Псевдокаталаза 302
- Псевдомуренн 30
- Психрофилы 102
- Регулон 119
- Редуктаза
 - закиси азота 363
 - окиси азота 363
- Рекомбинации 131
- Репрессия
 - каталитная 122
 - координированная 117
 - мультивалентная 117
- Репрессор 118
- Ретиналь 287
- Рибулозодифосфаткарбоксилаза 252, 295
- Риккетсии 155
- Ротенон 325
- Рустицианин 338
- Самозарождение 160
- Сапрофиты 70
- Септа 60
- Серобактерии
 - бесцветные 333
 - зеленые 262
 - пурпурные 258
- Сероводород
 - образование 349
 - окисление 256, 331
- Симпорт 89
- Сине-зеленые водоросли см. Циано-бактерии
- Сирогем 351
- Скольжение 36
- Слизистые слои 32
- Спириллы 23
- Спирохеты 35, 145
- Способы существования (питания) 94
- Стебельки 143
- Стрептококки 23
- Строматолиты 175
- Сукцинатдегидрогеназа 316, 320, 323
- Сульфатредукция
 - ассимиляционная 350
 - диссимиляционная 351
- Сульфитредуктазы 351
- Супероксиддисмутаза 300
- Супероксидный анион 296
- Сферопласты 30
- Таксисы 37
- Тейхоевые кислоты 28
- Термофилы 103
- Тилаконды 45
- Типы (формы) жизни 96

- Транслоказы 42
Трансмембранный электрохимический градиента ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$) 87
— — — источники 88
- Транспорт
— активный 43
— вторичный 88
— пассивная диффузия 43
— первичный 88
— облегченная диффузия 43
- Трихом 266
- Углеводы, биосинтез 73
- Углекислота (CO_2)
— автотрофная фиксация 249, 251
— акцептор электронов 352
— гетеротрофная ассимиляция 194, 247
- Унипорт 89
- Фактор F_{420} 356
- Факторы роста 72
- Ферменты
— аллостерические 110
— индуцибельные 117
— конститутивные 117
— регуляция синтеза 116
— ретроингибирование 112
- Ферредоксин 202
- Фикобилины 227
- Фикобилипротеиды 53, 227
- Фикобилисомы 53, 235
- Фикоцианин 229
- Фикоцианобилин 229
- Фикоэритрин 229
- Фикоэритробилин 229
- Филамент см. Трихом
- Фимбрии см. Ворсинки
- Флагеллин 34
- Флексибактерии 29
- L-Формы 31
- Фосфоглюконатдегидрогеназа 216
- Фосфоенолпировиноградная кислота (ФЕП) 179
- Фосфолипиды 38, 75
- Фосфорибулокиназа 252
- Фосфорилирование
— мембранное 84
— окислительное 84, 317
— субстратное 81, 84, 178, 320, 332
— фотосинтетическое 84
- Фосфотрансферазная система 44
- Фотодинамический эффект 298
- Фотолитоавтотрофы
— облигатные 95
— факультативные 96
- Фотолитотрофия 94
- Фотоорганотрофия 94
- Фотосенсибилизаторы 298
- Фотосинтез
— бескислородный 253, 276
— бесхлорофильный 253
— вторая (II) фотосистема 244
— доноры электронов 243
— кислородный 253
— нециклический перенос электронов 240
— нециклическое фотофосфорилирование 240
- образование восстановителя 241
— обратный перенос электронов 241
— первая (I) фотосистема 245
— первичные акцепторы 239
— переносчики электронов 242
— реакционные центры 238
— типы 83
— циклический перенос электронов 239
— циклическое фотофосфорилирование 240
- Фотосинтетический аппарат, локализация 233
- Фототрофы 94
- Фруктозодифосфатный путь см. Гликолиз
- Фумаратредуктаза 198
- Фумаратредуктазная система 314
- Хемиосмотическая теория энергетического сопряжения 86
- Хемолитоавтотрофы
— облигатные 95
— факультативные 96
- Хемолитотрофия 94
- Хемоорганогетеротрофы
— облигатные 95
- Хемоорганотрофия 94
- Хемотрофы 94
- Хиноны 323
- Хламидии 156
- Хлоросомы 53, 233
- Хлорофиллы 226, 228
- Хроматофоры 45
- Центроболиты 68
- Цианобактерии 265
— азотфиксация 260
— генетический аппарат 274
— каротиноиды 232
— морфология 266
— систематика 267
— скольжение 36
— способы получения энергии 279
— фотосинтетические мембраны 45
- Цианофитиновые гранулы 55
- Цикл трикарбонных кислот (ЦТК) 318
— — — «разорванный» 277
- Цисты 57
- Цитозоль 46
- Цитоплазма 46
- Цитохромоксидаза 325
- Цитохромы 323
- Цитратлиаза 250
- Чехол 32
- Экзоспориум 61
- Экзоспоры 62
- Эмбдена—Мейергофа—Парнаса путь см. Гликолиз
- Эндоспоры 59
- Энергетические ресурсы 79
- Энергия
— поддержания жизнедеятельности 92
— свободная 78
— стандартная свободная 79
- Энтнера—Дудорова путь 221
- Эукариотная клетка 15
- Эукариоты 16
- Эффекторы 111

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. ВВОДНАЯ ЧАСТЬ	
Глава 1.	Исторический очерк
	3
	Зарождение микробиологии
	3
	Развитие представлений о природе процессов брожения и гниения
	5
	Формирование представлений о микробной природе инфекционных заболеваний
	6
	Научная деятельность Л. Пастера
	7
	Успехи микробиологии во второй половине XIX в.
	9
	Микробиология в XX в.
	12
Глава 2.	Положение микроорганизмов в системе живого мира
	14
Глава 3.	Размеры микроорганизмов
	18
II. МИР ПРОКАРИОТ	
Глава 4.	Структурно-функциональная характеристика прокариотной клетки. Морфологическая дифференцировка у прокариот
	21
	Форма прокариот
	21
	Строение, химический состав и функции компонентов прокариотной клетки
	24
	Клеточная стенка
	24
	Капсулы, слизистые слои и чехлы
	32
	Жгутики и механизмы движения
	33
	Ворсинки
	37
	Мембраны
	38
	Цитоплазма и рибосомы
	46
	Генетический аппарат и репликация хромосомы
	47
	Рост и способы размножения
	50
	Внутрицитоплазматические включения
	52
	Морфологическая дифференцировка и уровни клеточной организации прокариот
	55
	Морфологически дифференцированные клетки
	56
	Покоящиеся формы
	57
	Уровни клеточной организации
	64
Глава 5.	Общая характеристика метаболизма прокариот
	67
	Химический состав прокариотной клетки
	68
	Потребности прокариот в питательных веществах
	69
	Источники углерода
	69
	Азот
	71
	Потребности в источниках серы и фосфора
	72
	Необходимость ионов металлов
	72
	Потребность в факторах роста
	72
	Синтез прокариотами основных клеточных компонентов
	73
	Биосинтез углеводов
	73
	Биосинтез липидов
	73
	Биосинтез аминокислот
	75
	Биосинтез мононуклеотидов
	77
	Энергетический метаболизм прокариот
	78
	Некоторые понятия биоэнергетики
	78
	Энергетические ресурсы
	79
	Общая характеристика энергетических процессов
	80
	Высокоэнергетические соединения. АТФ — универсальная форма химической энергии в клетке
	84
	$\Delta\mu_{H^+}$ — вторая универсальная форма клеточной энергии
	86
	Для чего клетке необходимы две формы энергии?
	90
	Энергетические затраты клетки
	91
	Консервирование энергии
	93
	Способы существования и типы жизни у прокариот
	94
	Прокариоты и факторы внешней среды
	96
	Отношение к молекулярному кислороду
	96
	Влияние излучения
	99
	Влияние температуры
	101
	Отношение к кислотности среды
	105
	Регуляция клеточного метаболизма у прокариот
	109
	Регуляция активности ферментов
	109
	Регуляция синтеза ферментов
	116
	Регуляция различных метаболических путей
	123

Глава 6. Генетические механизмы эволюции прокариот	125
Генетический аппарат прокариот	125
Изменение генетического материала у прокариот	127
Вклад отдельных генетических механизмов в эволюцию прокариот	132
Глава 7. Систематика прокариот. Группы прокариотных организмов	135
О систематике прокариот	135
Группы прокариотных организмов	141
Глава 8. Проблема происхождения и эволюции жизни. Возникновение первичной клетки	160
Развитие представлений о происхождении жизни	160
Условия на древней Земле	164
Возможность образования органических веществ на первобытной Земле	165
Возникновение пространственно обособленных микросистем	169
Эволюция протоклетки на пути возникновения первичной клетки	172
Возникновение и эволюция каталитической активности	172
Возникновение матричного синтеза	173
Данные палеонтологии о происхождении жизни на Земле	175
III. ЭВОЛЮЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У ПРОКАРИОТ	
Глава 9. Типы жизни, основанные на субстратном фосфорилировании	177
Общая характеристика процессов брожения	177
Энергетическая сторона	178
Проблема акцептора электронов	180
Гомоферментативное молочнокислое брожение	180
Гомоферментативные молочнокислые бактерии	186
Спиртовое брожение	189
Микроорганизмы, осуществляющие спиртовое брожение	191
Прокариоты	191
Эукариоты	193
О путях образования этилового спирта	193
Пропионовокислое брожение	194
Пропионовокислые бактерии	199
Маслянокислое брожение	200
Бактерии рода <i>Clostridium</i>	208
Энергетический метаболизм	209
Особенности конструктивного метаболизма	213
Роль в природе и практическое значение	214
Альтернативные пути сбраживания углеводов	215
Окислительный пентозофосфатный путь	215
Гетероферментативные молочнокислые бактерии	220
Путь Энтнера—Дудорова	221
Глава 10. Типы жизни, основанные на фотофосфорилировании	225
Пигменты фотосинтезирующих прокариот	226
Хлорофиллы	226
Фикобилипротеиды	227
Каротиноиды	230
Спектры поглощения клеток разных групп фотосинтезирующих прокариот	232
Структурная организация фотосинтетического аппарата прокариот	233
Фотофизические процессы, лежащие в основе фотосинтеза	236
Фотохимические процессы и пути электронного транспорта при фотосинтезе. Фотофосфорилирование	238
Образование восстановителя при фотосинтезе	241
Природа экзогенных доноров электронов в бескислородном фотосинтезе	243
Возникновение второй фотосистемы	244
Пути использования CO ₂ фотосинтезирующими прокариотами	247
Использование углекислоты хемогетеротрофными прокариотами	247
Пути ассимиляции CO ₂ зелеными серобактериями. Цикл Арнона	249
Цикл Кальвина — основной путь фиксации CO ₂ фотосинтезирующими прокариотами	251
Группы фотосинтезирующих прокариот	253
Пурпурные бактерии	255
Зеленые бактерии	260
Цианобактерии	265
Прохлаорофиты	284
Галобактерии	286
Фототрофные прокариоты в природе	289
Глава 11. Молекулярный кислород как фактор эволюции	293

Взаимодействие прокариот с молекулярным кислородом	293
Токсические эффекты молекулярного кислорода и его производных	294
Защитные механизмы клетки	299
Молекулярный кислород в метаболизме прокариот	307
Формирование у прокариот «оксидазного механизма» взаимодействия с молекулярным кислородом, сопряженного с запасанием энергии	311
О происхождении обратимой протонной АТФазы	311
Растворимые системы переноса электронов на O ₂ у первично анаэробных прокариот	313
Формирование связанных с мембраной путей переноса электронов в анаэробных условиях	314
Глава 12. Типы жизни, основанные на окислительном фосфорилировании	318
Цикл трикарбонных кислот	318
Дыхательная цепь. Перенос электронов по дыхательной цепи	321
Запасание клеточной энергии в процессе дыхания. Окислительное фосфорилирование	325
Группы прокариот, использующих в качестве источника энергии неорганические соединения (хемолитотрофы)	328
Бактерии, окисляющие соединения серы	331
Железобактерии	334
Нитрифицирующие бактерии	339
Водородные бактерии	342
Карбоксидобактерии	345
Бактерии, восстанавливающие сульфаты	347
Метанобразующие бактерии	352
Группы прокариот, использующих в качестве источника энергии органические соединения (хемоорганотрофы)	357
Уксуснокислые бактерии	358
Аммонифицирующие бактерии	360
Целлюлозные бактерии	361
Денитрифицирующие бактерии	361
IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	365
Литература	368
Предметный указатель	370

**Михаил Викторович Гусев,
Людмила Анатольевна Минеева**

МИКРОБИОЛОГИЯ

Зав. редакцией Н. М. Глазкова
 Редактор Г. М. Полехова
 Художник В. Б. Гордон
 Художественный редактор Е. М. Демнина
 Технические редакторы
 М. Ю. Завражнова, Е. Д. Захарова
 Корректоры М. И. Эльмус,
 С. Ф. Будаева, Л. А. Кузнецова

Тематический план 1985 г. № 165
 ИБ № 2111

Сдано в набор 18.09.84.
 Подписано к печати 23.01.85.
 Л-68050. Формат 70×100/16. Бумага тип. № 1
 Гарнитура литературная. Высокая печать
 Усл. печ. л. 30,55. Уч.-изд. л. 30,44.
 Тираж 10 200 экз. Заказ 489
 Цена 1 р. 30 к. Изд. № 2709

Ордена «Знак Почета» Издательство Московского университета.
 103009, Москва, ул. Герцена, 5/7.
 Типография ордена «Знак Почета» изд-ва МГУ.
 119899, Москва, Ленинские горы