

Загальна  
мікро-

БІОЛОГІЯ

Т.Л. ПИРОГ

КИЇВ-ЛВІВ



МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Т.П. ПИРОГ

## **ЗАГАЛЬНА МІКРОБІОЛОГІЯ**

*Затверджено Міністерством освіти і науки України  
як підручник для студентів вищих навчальних закладів*

Київ НУХТ 2004

Т.П. Пирог, доктор біологічних наук

Рецензенти: В.С. Підгорський, член-кореспондент Національної академії наук України, доктор біологічних наук, професор директор Інституту мікробіології і вірусології НАН України; В.К. Позур, доктор біологічних наук, професор завідувач кафедри загальної мікробіології та імунології Київського Національного університету ім. Т.Г. Шевченка; С.С. Ставська, доктор біологічних наук, професор кафедри екології і технології рослинних полімерів Національного технічного університету України (КПН).

Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: Підручник. — К.: НУХТ, 2004. — 471 с.

ISBN 966-612-033-X

Викладено історію розвитку мікробіології, положення, роль і взаємовідносини мікроорганізмів у природі, будову клітин прокаріот і еукаріот, сучасну систематику бактерій, грибів і дріжджів, фізіологію росту, типи живлення мікроорганізмів і шляхи використання ними ростових і неростових субстратів, основні механізми обміну речовини і перетворення енергії у аеробних та анаеробних мікроорганізмів, шляхи перенесення генетичної інформації, принципи регуляції біохімічних процесів, а також шляхи використання мікроорганізмів у біотехнології.

Для студентів вищих навчальних закладів, що навчаються за напрямом "Біотехнологія" і "Біологія", а також для спеціалістів, які працюють у галузі мікробіології та мікробного синтезу.

ISBN 966-612-033-X

УДК 576.8 + 577.1 + 579.01

© Т.П. Пирог, 2004

© НУХТ, 2004

## ВСТУП

У наш час мікробіологія з повним правом вважається однією з основних дисциплін біології, оскільки без знань особливостей мікроорганізмів неможливо зрозуміти всієї різноманітності життя на Землі, умов його появи та еволюції. Вивчення мікроорганізмів за останні роки зробило суттєвий внесок у вирішення важливих проблем загальної біології. Мікроорганізми досить зручні у роботі. Завдяки швидкому росту, високій адаптності до адаптації та ряду інших цінних властивостей вони є улюбленим об'єктом досліджень для біохіміків і генетиків. Велику роль мікроорганізми відіграють у розвитку таких наук, як молекулярна біологія, біофізика, екологія та ін.

Виявлення і швидкий розвиток біотехнології ґрунтується насамперед на використанні мікроорганізмів як продуцентів практично цінних продуктів (антибіотики, ферменти, органічні кислоти, амінокислоти, вітаміни, полісахариди та ін.). На використанні мікроорганізмів базуються методи генетичної інженерії, за якими можна створювати нові штами з новими корисними властивостями.

Велике значення має розробка способів раціонального використання біохімічної активності мікроорганізмів для підвищення родючості ґрунтів, видобутку корисних копалин, поповнення енергетичних ресурсів та очищення довкілля.

Разом з тим актуальною залишається проблема пошуку ефективних методів боротьби з мікроорганізмами — збудниками захворювань людей, тварин і рослин, шкідниками промислових виробів, харчової, сільськогосподарської продукції та ін. Отже, коло проблем, що потребують інтенсивного та глибокого вивчення властивостей мікроорганізмів, досить широке і може бути вирішене лише спільними зусиллями спеціалістів різного профілю.

Бурхливий розвиток сучасної біології та біотехнології потребує постійного оновлення навчальної літератури з відповідних дисциплін.

У підручнику наведено дані про морфологію, систематику, фізіологію та особливості метаболізму різних груп мікроорганізмів (бактерій, мікроскопічних міцеліальних грибів і дріжджів) — потенційних об'єктів біотехнології.

Крім загальних положень мікробіології, які в різному вигляді викладені в ряді російськомовних видань, у даному підручнику розглядаються нові, відсутні у відповідній навчальній літературі, дані, а саме:

сучасна філогенетична систематика мікроорганізмів (бактерій, грибів і дріжджів) і нові молекулярно-біологічні та генетичні методи, на яких вона базується;

антистресові адаптаційні механізми у мікроорганізмів; мікробний метаболізм суміші ростових і неростових субстратів і застосування цих типів трансформації субстратів у біотехнології з метою інтенсифікації процесів росту і синтезу практично важливих метаболітів;

нові продукти біотехнології (полісахариди, лектини, поверхнево-активні речовини, сучасні пробіотики).

Розділи підручника містять:

перший — історію становлення і розвитку мікробіології, фундаментальні відкриття її законів, основні ідеї та концепції, що не втратили свого значення і в наш час;

другий–п'ятий — загальні властивості мікроорганізмів і їх положення у відомих класифікаціях живих організмів, морфологію бактерій, грибів і дріжджів, а також структурні, хімічні, генетичні та функціональні особливості прокаріот і еукаріот;

шостий — дію на мікроорганізми зовнішніх факторів, адаптивні реакції мікроорганізмів на стресові дії, типи живлення, елективні методи культивування і фізіологію росту мікроорганізмів;

сьомий — систематику прокаріот, зокрема принципи класифікації бактерій, термінологію, сучасну концепцію виду у бактеріології, характеристику таксонів за дев'ятим виданням Керівництва Бергі з систематики та Керівництва Бергі з ідентифікації бактерій, а також сучасні напрями в систематиці і філогенетичну класифікацію прокаріот;

восьмий і дев'ятий — загальну характеристику, особливості будови та розмноження, практичне значення, таксономію і систематику, в тому числі і філогенетичну, грибів і дріжджів;

десятий — питання загальної вірусології, зокрема історію розвитку вірусології, будову вірусів, особливості розмноження вірулентних і помірних фагів, класифікацію вірусів;

одинадцятий–вісімнадцятий — особливості енергетичного та конструктивного метаболізму аеробних і анаеробних мікроорганізмів (метаболічна активність аеробних гетеротрофів, шляхи асиміляції ними різних вуглецевих субстратів — від полімерних до одноуглецевих, типи бродіння, анаеробне дихання, фотосинтез та інші процеси);

дев'ятнадцятий — основи генетики мікроорганізмів — синтез білка та генетичний код, мутації та їх виникнення, способи передавання генетичної інформації і механізми рекомбінації;

двадцятий — типи і механізми регуляції метаболізму мікроорганізмів на рівні зміни синтезу і активності ферментів;

двадцять перший — участь мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі та типи симбіотичних і антагоністичних взаємодій між ними, а також етапи еволюції мікроорганізмів;

двадцять другий — шляхи використання мікроорганізмів у біотехнології — біосинтез практично цінних метаболітів, препарати на основі біомаси, одержання енергії, біогеотехнологія металів, трансформація речовин мікроорганізмами.

Кожен розділ закінчується контрольними запитаннями для самоперевірки знань.

Наведені у підручнику матеріали є базовими для подальшого вивчення спеціальних біологічних (генетика, мікологія, вірусологія та ін.) і біотехнологічних (технологія антибіотиків, ферментів, вітамінів та інших біологічно активних сполук) дисциплін.



## СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

АДФ	аденозиндифосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
ВРО	вільнорадикальне окиснення
ГТФ	гуанозинтрифосфат
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕПС	екзополісахариди
ЕР	ендоплазматичний ретикулум
КоА	кофактор А
КДФГ	2-кето-3-дезоксиглюкозо-6-фосфоглюкозоат
ККМ	критична концентрація міцелоутворення
ЛПС	ліпополісахариди
НАД	нікотинамідаденідинуклеотид
НАДН	нікотинамідаденідинуклеотид (відновлений)
НАДФ	нікотинамідаденідинуклеотидфосфат
НАДФН	нікотинамідаденідинуклеотидфосфат (відновлений)
НАДФ(Ф)	нікотинамідаденідинуклеотидфосфат або нікотинамідаденідинуклеотидфосфат
НАД(Ф)Н	нікотинамідаденідинуклеотидфосфат (відновлений) або нікотинамідаденідинуклеотидфосфат (відновлений)
ПАР	поверхнево-активні речовини
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПХХ	піролохінолінхінон
РНК	рибонуклеїнова кислота
УДФ	уридиндифосфат
УЗ	ультразвук
УТФ	уридинтрифосфат
УФ	ультрафіолет
ФАД	флавінаденідинуклеотид
ФМН	флавімононуклеотид
ФЕП	фосфоенолпіруват
Ф	фосфат неорганічний
ЦТК	цикл трикарбонових кислот
ЦТФ	цитидинтрифосфат

## 1. СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТОК МІКРОБІОЛОГІЇ

Мікробіологія — наука про мікроорганізми. Їх представниками є деякі найпростіші, одноклітинні водорості, мікроскопічні гриби, бактерії та віруси. Загальною ознакою мікроорганізмів є їх малий розмір — близько 0,001–0,1 мм. Більшість мікроорганізмів невидимі неозброєним оком, оскільки мають розміри кілька мікро- чи навіть нанометрів. Для дослідження мікроорганізмів використовують мікроскопи. Оптичні мікроскопи дають збільшення у 3000 разів, а електронні — в десятки і навіть сотні тисяч разів.

Мікроорганізми дуже поширені в природі. Вони є у ґрунті, воді, повітрі, на поверхні рослин і тварин, у кишечнику людей і тварин, на всіх предметах навколишнього середовища. Мікроорганізми є значною частиною живої речовини планети. Так, у 1 мл забрудненої води міститься кілька сотень мільйонів мікробів, у 1 г окультуреного ґрунту — кілька мільярдів. Проте впродовж багатьох століть людство нічого не знало про мікроорганізми.

### 1.1. МОРФОЛОГІЧНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ МІКРОБІОЛОГІЇ

Мікроорганізми забезпечували отримання харчових продуктів і напоїв впродовж більш як восьми тисяч років до того, як про їх існування стало відомо. Так, на одному з барельєфів єгипетської гробниці V династії, яка датується 2400 роком до н.е., зображені сцени виготовлення хліба та пива.

Світ мікробів відкрив у XVII ст. (1676 р.) голландський природознавець Антоній ван Левенгук (1632–1723), якого по праву можна назвати піонером мікроскопії. Досліджуючи за допомогою простих лінз воду, зубний наліт, різноманітні гнильні

залишки, ніж виявив крихітні рухливі організми. які за своїми розмірами були в тисячу разів менші, ніж піщинки.

А. Левенгук виявив і описав представників усіх груп мікроорганізмів — найдрібніші, мікроскопічні водорості, дріжджі, всі основні морфологічні форми бактерій — кокові, паличкоподібні, вигнуті та ін. Результати цих досліджень були опубліковані в роботах Лондонського королівського товариства та в монографії "Тамниці природи, відкриті Антоном ван Левенгуком" (1695 р.).

У наступні 150 років було відкрито та описано морфологію сотень нових мікроорганізмів, але їх роль у біології залишалась невідомою. Та дослідники чомусь навіть не ставили перед собою такого завдання. Ніхто з них не міг собі уявити, що такі надзвичайно малі організми можуть мати якесь значення. Тому перший період у розвитку мікробіології називають *описовим*, або *морфологічним*.

Упродовж багатьох століть учні всього світу намагалися вирішити три найважливіші проблеми: *походження життя* (самозародження організмів), *природа процесів бродіння і гниття* та *причини інфекційних захворювань*. Систематичні пошуки в цих напрямках сприяли розвитку мікробіології.

## 1.2. ЕКОЛОГО-ФІЗІОЛОГІЧНИЙ ПЕРІОД РОЗВИТКУ МІКРОБІОЛОГІЇ. ВІДКРИТТЯ ЛУІ ПАСТЕРА

Цей етап розвитку мікробіології починається з другої половини XIX ст. науковими відкриттями французького вченого Луї Пастера (1822–1895). Саме з його іменем пов'язане створення мікробіології як науки. Основні відкриття Л. Пастера такі.

Участь мікроорганізмів у хімічному перетворенні речовин. Л. Пастер довів, що суміш солей виннокислого натрію та амонію утворює два типи кристалів, які є ізомерами. Розчини кристалів одного типу повертають площину поляризованого променя світла тільки в правий, а другого — в лівий бік. Цими дослідженнями Л. Пастер виявив, що пліснявий гриб, який росте в розчині винної кислоти, здатний метаболізувати тільки правоворотні кристали. Отже, вперше було зроблено висновок про те, що мікроорганізми можуть здійснювати хімічні перетворення органічних речовин і що існує досить вузька спеціалізація мікроорганізмів щодо харчових сполук.

**Бродіння.** У першій половині XIX ст. французький ботанік Ш. Каньяр де Латур при дослідженні осадку, що утворився в результаті спиртового бродіння, виявив у ньому живі мікроорганізми. Німецькі природознавці Т. Шванн та Ф. Кьютцинг, досліджуючи незалежно один від одного пливку, що утворюється у процесі оцтовокислого бродіння, та осад, що утворюється у процесі спиртового бродіння, також виявили мікроорганізми. Вчені зробили висновок про те, що процеси оцтовокислого та спиртового бродіння є функцією мікробів. Проте цей висновок не знайшов відповідного визнання, оскільки в той час популярнішою була теорія фізико-хімічної природи бродіння, яку поділяли такі видатні хіміки, як Ю. Лібіх та І. Берцеліус.

Л. Пастер у 1856 р. розпочав вивчення процесів бродіння, які досліджував упродовж 20 років. Він встановив, що типи бродіння, у процесі яких утворюються різні продукти, спричиняються окремими видами мікроорганізмів. Так, збудниками спиртового бродіння (перетворення цукру на спирт) є дріжджі, збудниками молочнокислого бродіння (перетворення цукру на молочну кислоту) — паличкоподібні бактерії.

**Анаеробіоз.** У 1857 р. Л. Пастер виявив, що повітря пригнічує розвиток збудників маслянокислого бродіння. Так, у присутності повітря воли ставали нерухомими, а при продуванні повітря через бродильну масу маслянокисле бродіння припинялося. Так вперше було зроблено висновок про існування мікроорганізмів, які можуть жити тільки в безкисневих умовах. Л. Пастер аперше ввів терміни "*аеробний*" та "*анаеробний*" для визначення мікроорганізмів, які існують у присутності або відсутності кисню. Л. Пастер першим прийшов до висновку, що дріжджі є *факультативними анаеробами*, тобто здатні існувати як у кисневих, так і безкисневих умовах.

**Проблема самозародження життя.** Стародавні вчені вважали, що дрібні тварини зароджуються з неживої матерії. Ідея такого спонтанного виникнення життя була популярною і в середні віки. У середині XVIII ст. італійський вчений Лазаро Спалланцані прийшов до висновку, що проростання органічних розчинів зумовлене потраплянням у них мікроорганізмів з повітря.

Л. Пастер показав постійну присутність мікроорганізмів у повітрі та його стерильність після прогрівання при високій температурі. Простими дослідями він довів, що самозародження в простерилізованих органічних екстрактах не відбувається ні в безкисневих умовах, ні в присутності кисню.

Англійський учений Д. Тиндаль встановив, що після прогрівання настій сіна, на відміну від настій овочів і м'яса, проростає. Так був зроблений висновок про те, що у висушеному сіні бактерії містяться в двох формах — *термолабільній* (гинуть при кип'ятінні) і *термостабільній* (втримують кип'ятіння).

Німецький ботанік Ф. Кон виявив, що у сіні містяться сіна паличка, яка утворює спори, здатні витримувати кип'ятіння впродовж кількох годин. Так було відкрито споротворення у бактерій. Виходячи з цього Д. Тиндаль розробив метод стерилізації повторним нагріванням через проміжки часу, достатні для перетворення спор у термолабільну вегетативну форму бактерій. Цей метод отримав назву *тиндалізації*.

Мікроби — збудники захворювань (1865–1868 рр.). Досліджуючи причини псування вина і пива у процесі їх виробництва та зберігання, Л. Пастер встановив, що скисання та зігрівання цих напоїв спричиняються сторонніми видами мікроорганізмів, які розвиваються у процесі бродіння чи в готових продуктах. Він назвав таке псування “хворобами” вина та пива і запропонував методи попередження цих захворювань (прогрівання готового продукту). Пізніше Л. Пастер встановив, що причиною пологової пропасниці є стрептокок, відкрив збудників остеомиєліту, гнійних абсцесів, курячої холери і зробив висновок про те, що шкірна інфекційна хвороба спричиняється специфічним мікроорганізмом.

На основі досліджень Л. Пастера англійський лікар Дж. Лістер дійшов до висновку, що нагноювання ран після операцій зумовлене потраплянням мікробів у рану з повітря під час операції. Саме Дж. Лістер запропонував обробку хірургічних інструментів карболовою кислотою, а також розбризкування карболки в повітрі операційних кімнат. Цей метод отримав назву *антисептика*, яка пізніше була замінена терміном *асептика*, тобто знезараження усіх предметів, які стикаються з ранною.

**Атенуація мікробів.** У дослідках Л. Пастера з вивчення курячої холери для зараження курчат було використано стару культуру збудника цього захворювання. Виявилось, що всі курчата в цій серії дослідів вижили (раніше гинула їх половина). Причому в результаті повторного зараження свіжою культурою всі ці самі курчата залишалися живими. Л. Пастер зробив висновок про те, що в старій культурі хвороботворні властивості мікроорганізмів зникають, але при цьому зберігається здатність

підвищувати стійкість (резистентність) до збудника. На основі цих спостережень Л. Пастер запропонував ідею *атенуації* (ослаблення вірулентності) патогенних мікроорганізмів з метою використання їх для профілактики інфекційних захворювань. Такі препарати Л. Пастер назвав *вакцинами*. Він виготовив вакцини проти курячої холери, сибірки великої рогатої худоби. Розробивши принципи виготовлення вакцин і методи проведення профілактичних щеплень, Л. Пастер заклав основи науки *імунології*.

### 1.3. ВІДКРИТТЯ РОБЕРТА КОХА. РОЗРОБКА МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Становлення мікробіології як науки зичною мірою пов'язане з ім'ям німецького вченого Роберта Коха (1843–1910). Виявивши перші експериментальні дослідження на мишах, він відкрив збудника сибірки — паличку, яка утворює спори. Вчений довів, що захворювання може спричинитись як вегетативними клітинами, так і спорами. У 1882 р. Р. Кох відкрив збудника туберкульозу — паличку Коха. З культури туберкульозної палички, яка була вирощена на рідкому поживному середовищі, він одержав препарат *туберкулін*, який використовується для діагностики туберкульозу і в наш час. За ці дослідження Р. Кох отримав Нобелівську премію (1905 р.). В експедиції до Єгипту та Індії для боротьби з холерою він відкрив холерний вібрион.

За часів Р. Коха ще не були розроблені лабораторні методи роботи з культурами мікроорганізмів. Для отримання чистих культур використовували метод розведень, запропонований Р. Кохом. Рідину, що містить суміш мікроорганізмів, багаторазово розбавляли стерильною водою з метою отримання в якомусь розведенні однієї мікробної клітини. Проте цей трудомісткий метод не міг забезпечити отримання чистої культури.

У лабораторіях Р. Коха вперше були розроблені способи виготовлення цільних поживних середовищ за допомогою желатини. На такому цільному середовищі мікроорганізми ростуть

<sup>1</sup> *Вірулентність* — кількісна характеристика ступеня патогенності мікроорганізму.

<sup>2</sup> *Патогенний* — організм, здатний спричинити захворювання; *патогенність* — потенційна здатність мікроорганізму спричинити інфекційний процес.



у вигляді окремих колоній, а кожна колонія складається з клітин одного виду, тобто являє собою *чисту культуру*. Пізніше у лабораторії Р. Коха для виготовлення щільних середовищ замість желатини стали використовувати *агар* — полісахарид, який виділяють з червоних морських водоростей. Його розчиняють при температурі 100 °C, а при 44 °C перетворюється на твердий прозорий гелі. У лабораторії вченого були розроблені також способи фарбування мікроорганізмів аніліновими фарбниками, сконструйовано освітлювач для мікроскопа, застосована імерсійна система і розроблено спосіб мікрофотографування бактерій.

#### 1.4. ВНОСОК У РОЗВИТОК МІКРОБІОЛОГІЇ ВІТЧИЗНЯНИХ УЧЕНИХ

**Фагоцитарна теорія імунітету.** Нові напрями у розвитку мікробіології були відкриті видатним біологом І.І. Мечниковим (1845–1916). Упродовж багатьох років він працював над вивченням проблеми запалення і несприйнятливості організму до збудників інфекційних захворювань. Учений виявив, що запальна реакція в організмі має захисний характер. Дослідивши на личинках морської зірки він довів, що клітини з'єднувальної тканини — лейкоцитам і макрофагам — притаманний фагоцитоз. Ці клітини здатні поглинати і руйнувати мікробні субстанції, які проникають в організм. Так була створена теорія імунітету, що отримала назву фагоцитарної теорії імунітету.

Іншою великою заслугою І.І. Мечникова є встановлення антагонізму між молочнокислими та гнильними мікроорганізмами. Саме він уперше висунув концепцію оздоровлення людини та попередження старіння організму включенням у харчовий раціон кисломолочних продуктів.

**Хемосинтез. Накопичувальні культури.** Видатний вчений С.М. Виноградський (1856–1953), вивчаючи сіркобактерії, нітрифікуючі та залізобактерії, відкрив нове біологічне явище — *хемосинтез*. Він виділив бактерії з новим типом живлення, які були здатні використовувати як єдине джерело вуглецю вуглекислоту повітря, а як джерело енергії — процеси окиснення відновлених неорганічних сполуч сірки ( $H_2S$ ), азоту ( $NH_3$ ), заліза і молекулярного водню. Ці бактерії отримали назву *хемоліто-*

*автотрофів*. Дослідженнями С.М. Виноградського було встановлено, що мікроорганізми беруть участь у кругообігу речовин у природі, тобто здатні здійснювати геохімічну діяльність.

С.М. Виноградський розробив *мікроекологічний метод виділення культур*, що базується на створенні для певних груп бактерій специфічних умов, сприятливих для їх розвитку. Цей метод називається також *методом накопичувальних культур*, оскільки він дає можливість накопичувати бактерії, здатні рости в даних умовах швидше за інші види, що присутні у вихідному матеріалі. Суть цього методу полягає в тому, що для виділення конкретного виду мікроорганізмів використовується середовище, на якому може вирости тільки мікроорганізм із заданими властивостями. Наприклад, для виділення бактерій, здатних засвоювати азот повітря, створюється середовище, що містить усі необхідні елементи, за винятком азоту.

**Відкриття вірусів.** В Інституті Пастера були розроблені бактеріальні фільтри, здатні затримувати бактеріальні клітини. Це дало змогу отримувати фільтрати мікробних культур, звільнені від бактерій. Д.І. Івановський (1864–1920) встановив, що фільтрати екстрактів рослин тютюну, уражених мозаїчною хворобою, зберігали інфекційність. Це свідчило про те, що хвороба спричиняється субмікроскопічними формами мікробів, здатних проходити через бактеріальні фільтри. Так були відкриті *віруси*. За матеріалами цих досліджень Д.І. Івановський захистив у Київському університеті докторську дисертацію.

**Широкий розвиток мікробіології.** Автором першого вітчизняного підручника з мікробіології був В.Л. Омелянський (1867–1928). Він уперше виділив бактерії, які здатні розкладати целюлозу. Відомі роботи В.Л. Омелянського з дослідження ролі мікроорганізмів у кругообігу азоту в природі, ливітруванні гірських порід, які стали основою створення геологічної мікробіології.

Уперше застосував променістисту енергію для отримання мутаційних форм мікроорганізмів Г.А. Надсон (1867–1940), заклавши цим основи радіаційної мікробіології.

Основоположником епідеміології є Д.К. Заболотний (1866–1929). Він створив учення про природний осередок чуми, виявив роль диких гризунів як зберігачів чумної палички в природі. Д.К. Заболотний вивчав біологію холерного вібриона, шляхи поширення холери за епідеміологічних осередків інфекції та її потрапляння в Росію. Він брав участь у боротьбі за епідеміями холери



та чуми в Україні, на Поволжі, Кавказі, в Петербурзі, Шотландії, на Близькому Сході. У 1929 р. Д.К. Заболотний заснував в Україні Інститут мікробіології, який нині носить його ім'я.

Одним з перших спостерігав та описав явище бактеріофагії М.Ф. Гамалія (1859–1949). Він вивчав збудників багатьох інфекційних хвороб (скаву, туберкульозу, холери та ін.), розробив теорії інфекції та імунітету, вперше застосував так звані хімічні вакцини.

Інститути мікробіології були створені в кінці XIX ст. у Москві, Харкові, Одесі.

### 1.5. РОЗВИТОК МІКРОБІОЛОГІЇ У XX СТ.

Завдяки появі нових методів досліджень перша половина XX ст. була ознаменована відкриттями надзвичайно різноманітних форм, структури та типів метаболізму мікроорганізмів.

У 30-і роки голландський учений А.Я. Клейвер і представники його школи в результаті досліджень дали нові уявлення про відношення груп мікроорганізмів виявили, що різноманітність типів їх життєдіяльності пов'язана з різноманітністю біохімічних процесів, інакше кажучи, з біохімічною єдністю живого. Принципи біохімічної єдності живого проявляються в єдності структури основних сполук — білків, жирів, вуглеводів, нуклеїнових кислот, в єдності енергетичних і конструктивних процесів у мікроорганізмів, рослин і тварин.

Видатним досягненням стало відкриття антибіотиків, які синтезуються мікроскопічними грибами, актиноміцетами та бактеріями. У 1928–1929 рр. англійський учений А. Флемінг відкрив пеніцилін, у 1940 р. американці А. Шатц та С. Ваксман відкрили стрептоміцин. На початку 40-х років було розроблено технологію очищення пеніциліну і створено його промислове виробництво.

У 40-і роки розпочато генетичні дослідження на бактеріях. Американський учений О. Ейвери із співавторами (1944 р.) довели, що носієм генетичної інформації є дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК). У 1953 р. англійський біохімік Ф. Сеєгер встановив повну структуру білка інсуліну, американські біохіміки Д. Уотсон та Ф. Крік розшифрували структуру ДНК. На початку 60-х років американський біохімік М. Ніренберг здійснив

основоположні дослідження з розшифрування генетичного коду. У середині 60-х років зусиллями вчених багатьох країн генетичний код був розшифрований. Він виявився універсальним для всіх живих організмів. За розшифрування генетичного коду М. Ніренберг, Р.У. Холлі та Х.Г. Корана були удостоєні Нобелівської премії (1968 р.). Кінець 60-х років ознаменований визначенням амінокислотної послідовності білків, 70-і роки — визначенням нуклеотидної послідовності нуклеїнових кислот, 80-і роки — розробкою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і бурхливим розвитком нових методів досліджень на основі ПЛР. Аналіз 16S рРНК у бактерій і 18S рРНК у мікроскопічних грибів і дріжджів здійснив переворот у систематичі цих організмів. У кінці XX ст. створюються філогенетичні класифікації бактерій, грибів і дріжджів.

У 70-і роки було відкрито *архебактерії* (метанотворювальні, галофільні, ряд термофільних бактерій), які за своїми ознаками відрізняються від інших бактерій.

Особливим досягненням стало створення та бурхливий розвиток нової галузі — *біотехнології*, тобто промисловості, що ґрунтується переважно на використанні біологічної діяльності мікроорганізмів. Сама мікробіологія як наука розділилась на ряд напрямів: загальна, медична, сільськогосподарська, водна, геологічна, космічна та технічна (промислова).

#### Контрольні запитання до розділу 1

1. Що вивчає наука мікробіологія?
2. Чому перший період розвитку мікробіології називають описовим?
3. Назвіть основні відкриття Л. Пастера.
4. Які методи досліджень були розроблені в лабораторії Р. Коха?
5. Який внесок у розвиток мікробіології зробили вітчизняні вчені?
6. Які досягнення біології у XX ст. стали підґрунтям для розвитку біотехнології?

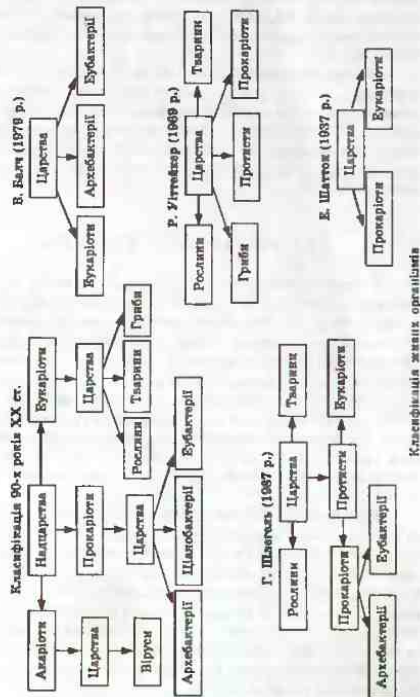
## 2. ПОЛОЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ПРИРОДІ

### 2.1. КЛАСИФІКАЦІЯ ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ

Відмінності у зовнішньому вигляді та будові тварин і рослин, які до минулого століття були основою класифікації живих істот, помітні з першого погляду. Царства рослин і тварин могли бути розмежовані досить чітко до тих пір, поки мало що було відомо про мікроорганізми. Для третього царства живих істот — *мікроорганізмів* — було запропоновано назву *протисти* (Е. Геккель, 1866 р.).

Існує декілька класифікацій живих організмів (рисунк). Найпоширенішою серед мікробіологів є класифікація, наведена у підручнику Г. Шлегеля [31]. За цією класифікацією існує три царства живих організмів: рослини, тварини та протисти. *Царство протистів* охоплює організми, які відрізняються від рослин і тварин низьким морфологічним диференціюванням. Це, головним чином, одноклітинні форми. За будовою клітини протисти можуть бути поділені на дві різні групи: *вищі протисти*, або *еукаріоти*, клітини яких подібні до клітин рослин і тварин. До них належать водорості, гриби та найпростіші. До групи *нижчих протистів*, або *прокаріотів*, належать бактерії, в тому числі і ціанобактерії (синьо-зелені водорості). Після відкриття архебактерій прокаріоти поділяють на *архебактерії* та *еубактерії*. *Віруси* як неклітинні форми можна протиставити всім організмам: вони не здатні розмножуватися самостійно, їх репродукція може відбуватися тільки всередині живих клітин.

За Е. Шаттоном (1937 р.), усі живі організми поділяються на прокаріоти (бактерії) та еукаріоти (найпростіші, гриби, мікроскопічні водорості, рослини та тварини). У 1979 р. В. Балч запропонував виділити архебактерії в окреме царство, і отже, живі організми належать до трьох царств: еукаріоти, архебактерії та еубактерії.



За Р. Уїтгейкером (1969 р.), існує п'ять царств живих організмів: прокаріоти (бактерії), протисти (найпростіші), рослини, тварини, гриби. Мікологи вважають виділення грибів в окреме царство живих організмів найважливішим досягненням мікології у XX ст.

У кінці 90-х років XX ст. було запропоновано ще одну класифікацію, за якою живі організми поділяються на три *надцарства*: *акаріоти (без'ядерні); прокаріоти (доядерні); еукаріоти (ядерні)*. До надцарства акаріотів належить царство вірусів, до надцарства прокаріотів — царства архебактерій, ціанобактерій та еубактерій, до надцарства еукаріотів — царства рослин, тварин і грибів.

## 2.2. ПРОКАРІОТИ ТА ЕУКАРІОТИ

Елементарною фізичною одиницею живого є клітина — найменша життєздатна одиниця. За своїм хімічним складом усі живі істоти схожі. Основними компонентами будь-якої клітини є нуклеїнові кислоти — дезоксирибонуклеїнова та рибонуклеїнова (РНК), білки, ліпіди та вуглеводи. Проте вивчення будови деяких типів клітин дало змогу виявити помітні відмінності між ними. Ці відмінності настільки принципові, що клітини було поділено на дві групи — *прокаріоти та еукаріоти*. Причому прокаріоти розглядаються як реліктові форми, що збереглися з найдавніших часів біологічної еволюції, в поява еукаріотичних форм, що виникли із прокаріот, — як дуже великий крок в історії життя.

*Еукаріоти* мають істинне ядро, у якому міститься переважна частина геному еукаріотичної клітини. Геном представлений набором хромосом, які в ході процесу, що називається мітозом, подвоюються і розподіляються між дочірніми клітинами. В еукаріотичній клітині є інші органели, які містять ДНК — мітохондрії і хлоропласти (у рослин), але в них міститься незначна частина клітинного геному, яка представлена кільцевими молекулами ДНК. Рибосоми в еукаріотичній клітині більші, ніж у прокаріот (80S та 70S відповідно). АТФ-синтаза та дихальний ланцюг містяться в мітохондріях.

*Прокаріоти* не мають ядра, відділеного ядерною оболонкою. ДНК у вигляді замкненої кільцевої молекули вільно роз-

міщена у цитоплазмі. Ця бактеріальна хромосома містить всю необхідну для розмноження клітини інформацію. Крім того, в прокаріотичній клітині можуть міститися невеликі позахромосомні кільцеві молекули ДНК — плазмиди, але без них клітина може обійтися. Прокаріотична клітина не містить органел. Рибосоми менші — 70S. АТФ-синтаза та дихальний ланцюг розміщені в цитоплазматичній мембрані.

Щодо морфології прокаріоти є відносно мало диференційовані: це сферичні форми, прамі чи вигнуті палички. Але з такою зовнішньою однотипністю різко контрастує надзвичайна різноманітність і пластичність метаболічних процесів. У той час як рослинам і тваринам необхідний молекулярний кисень, багато які групи прокаріот можуть існувати без доступу повітря (в анаеробних умовах), одержуючи необхідну для росту енергію в результаті бродиння або анаеробного дихання. Інші групи прокаріот можуть використовувати енергію світла і синтезують потрібні їм речовини з органічних сполук або з вуглекислоти (двоокису вуглецю). Деякі бактерії можуть одержувати енергію шляхом окиснення неорганічних сполук або елементів. Серед бактерій дуже поширена здатність до фіксації молекулярного азоту.

Завдяки такій фізіологічній різноманітності, а також високій швидкості синтетичних процесів і росту, простій будові клітини і нескладній структурі генетичного апарату прокаріоти в останні десятиріччя стали для дослідників найулюбленішим об'єктом вивчення багатьох проблем біології.

## 2.3. ЗАГАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Головною ознакою мікроорганізмів, що відображено в самій їх назві, є мала величина особин. Вона не тільки стала причиною відокремлення цих організмів від рослин і тварин, але з нею суттєво пов'язані й особливості морфології мікроорганізмів, активність і пластичність їх метаболізму, поширення в природі, а також зручність роботи в лабораторії.

Розмір особини та співвідношення між поверхнею та об'ємом. Діаметр більшості бактерій не перевищує тисячної частки міліметра. Ця величина — мікромметр, або мікрон ( $10^{-3}$  мм). Дані про тонку структуру клітини наводяться в нанометрах:  $1 \text{ нм} =$

$= 10^{-3} \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ мм}$ . Розмір дрібних планобактерій, дріжджів і найпростіших становить близько 10 мкм. Але для таких надзвичайно малих організмів характерним є дуже велике співвідношення поверхні до об'єму. Якщо куб з довжиною грані 1 см (об'ємом  $1 \text{ см}^3$ ) розбити на кубики з довжиною грані 1 мкм, то отримаємо  $10^{12}$  кубиків об'ємом по  $1 \text{ мкм}^3$  кожний. Сумарна поверхня цих кубиків у 10 000 разів перевищує поверхню вихідного кубика. Об'єм  $1 \text{ мкм}^3$  є характерним для середньої бактеріальної клітини.

Велике відношення поверхні до об'єму зумовлює інтенсивну взаємодію з навколишнім середовищем. З цим пов'язаний дуже швидкий обмін речовинами між середовищем і клітиною мікроорганізмів. Правило німецького фізіолога М. Рубнера (1893 р.) говорить, що енергетичний обмін тварини у спокої пропорційний не масі, а поверхні її тіла. Якщо це правило поширити і на клітини, то слід чекати, що рівні метаболічної активності будуть відрізнятися на кілька порядків. Відповідно високими є і швидкості росту мікроорганізмів. Так, в організмі вола масою 500 кг за добу утворюється приблизно 0,5 кг білка, за такий самий час 500 кг дріжджів можуть синтезувати понад 50 000 кг білка.

**Пластичність метаболізму.** У вищих рослин і тварин зміни обміну речовин відносно жорстко обмежені набором ферментів. У процесі індивідуального розвитку організму склад ферментів змінюється, але в різних умовах зовнішнього середовища ці зміни незначні. Мікроорганізми характеризуються більшою пластичністю метаболізму. Для бактерій висока здатність до адаптації просто необхідна. Це визначається їх малими розмірами. У бактеріальній клітині розміститься тільки кілька сотень тисяч білкових молекул. Тому не потрібні на даний час ферменти не можуть міститися про запас. Деякі ферменти, які необхідні для перероблення поживних речовин, утворюються тільки тоді, коли відповідна речовина з'являється поблизу клітини. Такі **індуцибельні** ферменти можуть становити до 10 % білка, що міститься у клітині. Отже, клітинні регуляторні механізми у мікроорганізмів відіграють суттєву роль і проявляються чіткіше, ніж в інших живих істот.

**Поширення мікроорганізмів.** Малі розміри мікроорганізмів мають велике значення і для їх екології. Багато рослин і тварин існують лише на певних континентах, а мікроорганізми є скрізь. Завдяки своїм малим розмірам вони легко поширюють-

ся з повітряними потоками. Як правило, достатньо 1 г садового ґрунту, щоб виділити з нього вид бактерій, який буде рости за рахунок будь-якої природної сполуки. Створюючи в пробірці певні селективні умови, можна з невеликої кількості зразка ґрунту чи мулу одержувати накопичувальні культури, а з них і чисті культури більшості відомих мікроорганізмів.

Малі розміри мікроорганізмів дають можливість одержувати в одній пробірці чи чашці Петрі та досліджувати популяції, які складаються з  $10^5$ – $10^{10}$  окремих клітин, і завдяки цьому виявляти такі рідкісні явища, як мутація чи передача набутої ознаки. При цьому немає потреби у використанні складної техніки, наявності великого простору і часу. Великі успіхи біохімічних і генетичних досліджень досягнуті завдяки простоті роботи з мікроорганізмами.

#### Контрольні запитання до розділу 2

1. Яке місце серед живих організмів займають мікроорганізми?
2. Які мікроорганізми належать до прокаріот і еукаріот?
3. Назвіть принципові відмінності між прокаріотами та еукаріотами.
4. Якими загальними властивостями характеризуються мікроорганізми?
5. Охарактеризуйте відомі класифікації живих організмів.



### 3. МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Світ мікроорганізмів надзвичайно різноманітний. Більшість мікроорганізмів є одноклітинними, зустрічаються ценоцитні, багатоклітинні, але диференціація клітин на органи і тканини у них відсутня.

Назви бактерій, мікроміцетів, дріжджів наводяться в латинській транскрипції. Номенклатура мікроорганізмів є бінарною: кожному виду присвоюється родова та видова назви. Вид є основною таксономічною одиницею в мікробіології, види об'єднуються в роди.

#### 3.1. БАКТЕРІЇ

Ці організми за формою поділяються на кілька груп: сферичні, циліндричні, спіральні, незвичної форми та нитчасті.

**Сферичні бактерії**, або *коки* (від грец. *kokkos* — зерно) мають округлу форму. Залежно від розташування клітин після їх ділення поділяються на групи (рис. 3.1).

**Мікрококи** (*Micrococcus*) (від грец. *mikros* — малий) — коки, що діляться в одній площині і після поділу розміщуються поодинокі, наприклад, *Micrococcus aqua* — звичайний мешканець води (*Micrococcus* — назва роду; *aqua* — андова назва).

**Диплококи** (*Diplococcus*) (від грец. *diplous* — подвійний) — коки, що діляться в одній площині і після поділу розміщуються попарно, наприклад, *Methylococcus capsulatus* — бактерія, що окиснює метан; *Neisseria gonorrhoeae* — збудник гонореї.

**Стрептококи** (*Streptococcus*) (від грец. *streptos* — ланцюжок) — коки, що діляться в одній площині. Після поділу між клітинами зберігається зв'язок, і вони розміщуються у вигляді ланцюжків, наприклад, *Streptococcus lactis* — молочнокисла бактерія, що спричиняє скисання молока. Ланцюжки можуть бути короткими (3–4 клітини) або довгими (кілька десятків клітин).

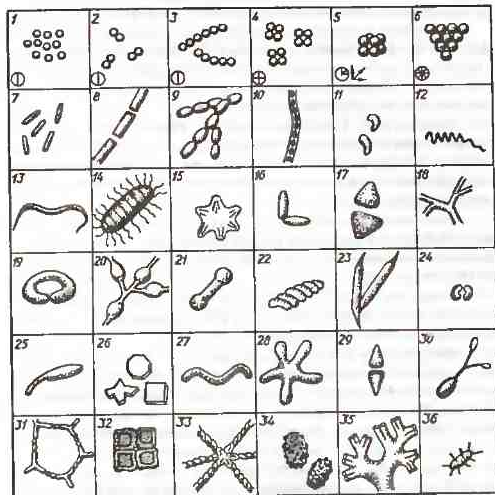


Рис. 3.1. Форми бактеріальних клітин:

1 — мікрокок; 2 — диплокок; 3 — стрептокок; 4 — тетракок; 5 — сарцина; 6 — ствільжок; 7 — маленька паличка; 8 — велика паличка, з'єднані в ланцюжок; 9 — яйцеподібні коки; 10 — трихоми клітини; 11 — вібріон; 12 — спірохета; 13 — червоподібна клітина; 14 — багатоклітинна форма; 15 — зіркоподібна; 16 — палички, розміщені під кутом одна до одної; 17 — трикутні; 18 — форми, що гілкуються; 19 — торіодальні; 20 — клітини, які брунькуються; 21 — гантелеподібні; 22 — нециліндричні трихоми; 23 — палички з загостреними кінцями; 24 — бобоподібний диплокок; 25 — клітина зі стеблинкою; 26 — пластинчасті клітини археобактерій; 27 — спірила; 28 — амейбодні; 29 — ланцетоподібні; 30 — клітина з гіфами, на яких утворюються бруньки; 31 — ланцюжок клітин, що утворюють петлю; 32 — з'єднані клітини у пластини; 33 — зіркоподібна розетка з клітин; 34 — туберодні клітини; 35 — слизові стеблинки бактерій; 36 — клітина з шипами

**Тетракоки** (*Tetracoccus*) (від грец. tetra — чотири) — коки, що діляться в двох взаємно перпендикулярних площинах і після поділу утворюють тетради. Наприклад, *Aerococcus*.

**Сарцини** (*Sarcina*) (від грец. sarco — з'єдную) — коки, що діляться в трьох взаємно перпендикулярних площинах і після поділу розміщуються у вигляді пакетів з 8, 16, 32, 64 клітин. Наприклад, *Sarcina flava* — жовта сарцина; *Methanovarcina methanica* — метанотворювальна сарцина.

**Стафілококи** (*Staphylococcus*) (від грец. staphyle — виноградне гроно) — коки, що діляться в кількох площинах і після поділу розміщуються у вигляді виноградного гроно. Наприклад, *Staphylococcus aureus* — золотистий стафілокок, збудник гнійних інфекцій.

Коки не завжди бувають правильною круглою форми, вони можуть бути ланцетоподібними (*Streptococcus pneumoniae* — збудник пневмонії), овальними (*Peptostreptococcus*), подовженими (*Ruminococcus*).

Більшість коків є нерухомими і не утворюють ендоспор, хоча деякі можуть мати джгутики (*Planococcus*, *Planosarcina*) та ендоспори (*Sporosarcina*).

**Циліндрична форма бактерій** (від грец. bacteria, лат. bacillum — паличка) є характерною для більшості бактерій. Паличкоподібні бактерії поділяються на такі, що утворюють ендоспори (*Bacillus*, *Clostridium*), і на такі, що не утворюють ендоспор (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*). Паличкоподібні форми бактерій розрізняються за довжиною, поперечним діаметром, формою кінців клітин і характером їх розміщення. Розрізняють палички довгі (понад 3 мкм) (*Bacillus megaterium* — гнильна бактерія; *Clostridium botulinum* — збудник ботулізму), короткі (1 мкм) (бактерії кишкової групи), дуже короткі (менше 1 мкм), довжина яких не набагато перевищує діаметр клітини, тому їх називають коккобактеріями (*Brucella abortus* — збудник бруцельозу). За поперечним діаметром бактерії поділяються на тонкі (*Mycobacterium tuberculosis* — збудник туберкульозу) і товсті (*Escherichia coli* — кишкова паличка). Кінці паличок можуть бути закруглені, з обрізаними кінцями, загострені, потовщені. Розміщуються палички поодинокі, по дві клітини (*Pseudomonas*), ланцюжками (*Bacillus mycolides* — типова ґрунтова бактерія). Деякі палички розміщені під кутом одна до одної, утворюючи фігури, подібні до Х чи Y, наприклад, втробактерії, корінебактерії, кокардії, мікобактерії.

**Бактерії спіральної форми** розрізняються за кількістю і характером завитків, довжиною та товщиною клітин. Їх можна поділити на форми, що не гнуться (вібріони, спірили), і на такі, що вигинаються (спірохети).

**Вібріони** (від фр. vibration) мають вигляд зігнутої палички чи коми (*Vibrio cholerae* — збудник холери).

**Спірили** (від лат. spirare — вигин) — спірально вигнуті клітини, що мають великий поперечний діаметр і невелику кількість високих завитків (*Spirillum volutans* — сапрофітна бактерія; *Spirillum minus* — патогенна, здатна спричинити захворювання спірилла).

**Спірохети** (від лат. spirare — вигин, грец. chaite — волосся) — твікі, що вигинаються, тонкі, спірально вигнуті клітини (рис. 3.2).

Вони складаються із зовнішнього чохла, протоплазматичного циліндра, аксіальних ниток. Аксіальні нитки обвивають протоплазматичний циліндр, вони є внутрішньоклітинними структурами (розміщені в периплазматичному просторі). Аксіальні (або периплазматичні) нитки спірохет є аналогами джгутиків бактерій. До спірохет належить *Spirochaeta plicatilis* — звичайний мешканець прісних, морських і стічних вод, *Treponema pallidum* — збудник сифілісу, *Treponema macrodentium* — зубна спірохета, мешканець ротової порожнини при зубному карієсі.

**Бактерії незвичної форми** морфологічно різноманітні. **Торіодальні** (завмкнуті чи незавмкнуті кільця), **зіркоподібні**, **тубе-**

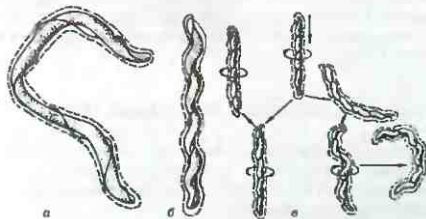


Рис. 3.2. Схема висинчення завиткової клітини спірохети: а — аксіальна нитка; б, в — скорочення аксіальної нитки

роїдні клітини показані на рис. 3.1. Форма плоских квадратних пластинок і коробочкоподібних плоских клітин геометрично різноманітної форми є характерною для архебактерій.

**Нитчасті форми бактерій** (трихомні, від грец. *trichoma* — волосина) — це здебільшого паличкоподібні клітини, з'єднані в довгі ланцюжки, які об'єднані слизом, чохлами-півхами, плазмодесмами (місточками) або єдиною оболонкою. Зазвичай зовні трихом покритий додатковими оболонками, які не беруть участі в утворенні перегородок між клітинами. Клітини трихом переважно є паличкоподібними.

Всі бактерії характеризуються постійністю форми клітини завдяки особливостям будови однієї з оболонок — клітинної стінки. Але є бактерії, для яких характерним є поліморфізм. Це мікоплазми, L-форми, клітини яких не мають клітинної стінки, а також артро-, нокардіо- та корінебактерії, в яких у циклі розвитку спостерігається зміна форми клітини: кок — паличка — кок.

Розміри бактеріальних клітин сильно вріюють. Діаметр сферичних бактерій становить від 0,2 до 2,5 мкм. Найменшими є мікоплазми — 0,15 мкм. Цей розмір є теоретичною межею клітинного рівня організації життя, у якому в клітині це може бути мінімум молекул білків (близько 1200) і мінімум ферментних реакцій, необхідних для підтримання клітинної структури. Паличкоподібні бактерії мають товщину 0,5–1,0 мкм, довжину від 1–2 до 10 мкм. Нитчасті форми можуть досягати макроскопічних розмірів (1 мм) і їх можна побачити неозброєним оком. Довжина спірохет коливається від 1–3 до 100–500 мкм. Нижній розмір одноклітинних бактерій визначається простором, необхідним для упаковки апарату, який забезпечує незалежне існування клітини, верхній — оптимальним співвідношенням між поверхнею клітини і об'ємом.

### 3.2. МІКРОСКОПІЧНІ МІЦЕЛІАЛЬНІ ГРИБИ

Гриби — це еукаріотичні організми, серед яких зустрічаються одноклітинні, нитчасті та міцеліальні форми.

Мікроскопічні міцеліальні гриби називаються також мікоміцетами, пліснявими грибами.

**Вегетативне тіло гриба (талом)** складається з ниток завтовшки близько 5 мкм — *гіфів*. Сукупність гіфів грибного

талом називається *міцелієм*. Міцелій буває *субстратним*, коли гіфи врастають у поживне середовище, *повітряним* — гіфи піднімаються над субстратом. Гіфи можуть не мати поперечних перегородок (утворюють несептований міцелій) і можуть бути розділені такими перегородками (септами) на клітини (утворюють септований міцелій). Проте у цьому разі цитоплазма однієї клітини сполучається з цитоплазмою сусідньої клітини через пору, яка міститься у центрі перегородки (рис. 3.3).

До **нижчих грибів (фікоміцетів)** належать гриби, вегетативні тіла яких (навіть за сильного розгалуження гіфів) не мають перегородок і тому є багатондерними. Такий талом називають *ценоцитним*. До **нижчих грибів** належать хитридіоміцети, ооміцети, зигоміцети, до **вищих грибів (еуміцетів)** — аскоміцети, базидіоміцети, дейтероміцети. Для вищих грибів характерними є гіфи, розділені поперечними перегородками.

Гіфи грибів ростуть з подовженням кінчиків (*апікальний ріст*). У більшості грибів будь-яка частина міцелію здатна до

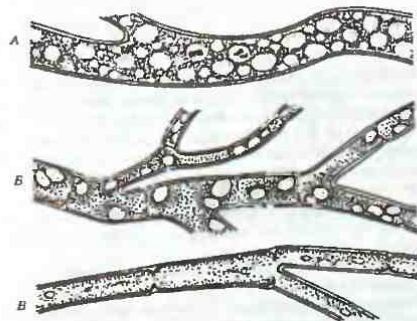


Рис. 3.3. Вегетативні гіфи грибів:

А — гіфи фікоміцетів (нижчих грибів) несептовані, тобто не мають поперечних перегородок; Б — для еуміцетів (вищих грибів) характерними є септовані гіфи (з перегородками); В — у ооміцетів *Leptomitium lacteus* гіфи розділені неопонними перетяжками

росту. Для посіву достатньо маленького кусочка міцелію, щоб утворився новий талом. Розмножуються двома способами — **статевим** і **безстатевим** (таблиця).

Розмноження мікроорганізмів (органи розмноження)

Мікроорганізми	Способи розмноження	
	Безстатеве	Статеве
Бактерії	Вікарний поділ	Немає
Дріжджі	Варіанти: брунькування (найчастіше) поділ (рідко) утворення безстатевих спор (хлалідоспори, балістоспори)	Утворення статевих спор: ендоспори (аскоспори у <i>Ascomycetes</i> ); екзоспори (спориції у <i>Basidiomycetes</i> )
Гриби	Варіанти: фрагментація міцелію; брунькування; утворення безстатевих спор: а) екзоспори (конідії) б) ендоспори (спорангіоспори)	Утворення статевих спор: ооспори (утворюються при злитті жіночої гамети оогонія та чоловічої антеридія), клас <i>Oomycetes</i> ; зигоспори (утворюються при злитті морфологічно однакових жіночої та чоловічої гамети), клас <i>Zygomycetes</i> ; аскоспори (утворюються в асках), клас <i>Ascomycetes</i> ; базидіоспори (утворюються на спеціальних виростах — базидіях), клас <i>Basidiomycetes</i>

**Безстатеве розмноження грибів** здійснюється зазвичай за допомогою спор, брунькуванням чи фрагментацією міцелію.

Найпоширенішим і найдиференційованішим є **споруутворення** (рис. 3.4, II, III, IV). Безстатеві спори бувають екзогенними (конідії) та ендогенними (спорангіоспори). Утворення конідій характерне для грибів родів *Penicillium*, *Aspergillus*, спорангіоспор — для представників *Mucor*, *Rhizopus*.

Органами **статевого розмноження грибів** є спори (ооспори у ооміцетів, зигоспори у зигоміцетів, аскоспори у аскоміцетів та базидіоспори у базидіоміцетів).

Залежно від типу міцелію та наявності статевого процесу гриби поділяються на чотири класи:

**Phycomycetes** (включають *Oomycetes* та *Zygomycetes*) — фікоміцети, що мають несептований міцелій і статевий процес; **Ascomycetes** — сумчасті нитчасті гриби, що мають септований міцелій і статевий процес;

**Basidiomycetes** — базидіоміцети, що утворюють статеві спори на спеціальних виростах — базидіях;

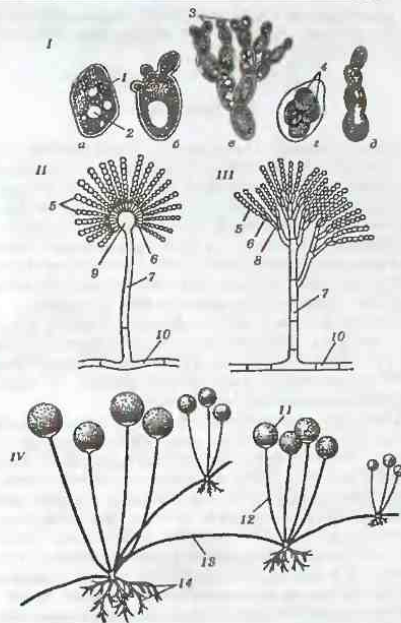


Рис. 3.4. Морфологія мікроскопічних грибів:

I — дріжджі; II — аспергил; III — пеніцил; IV — ризопус;  
а — клітина в стані спокою; б, в — клітина під час брунькування;  
г — аскоспори; д — утворення нової особини; 1 — ядро; 2 — вакуоля; 3 — брунька; 4 — аскоспори; 5 — конідій; 6 — стеригми; 7 — конідіофор; 8 — метули; 9 — булавоподібне розширення конідієносія; 10 — вегетативна гіфа; 11 — спорангій; 12 — спорангіофор; 13 — столон; 14 — ризодія



*Deuteromycetes (Fungi imperfecti)* — недосконалі гриби, що не мають статевого процесу і характеризуються наявністю септованого міцелію.

### 3.3. ДРІЖДЖІ

Термін “дріжджі” не має таксономічного значення. До цієї групи мікроорганізмів належать мікроскопічні одноклітинні гриби, які розмножуються переважно брунькуванням або поділом. Таке визначення є недостатньо точним, оскільки окремі види дріжджів здатні в певній фазі розвитку утворювати міцелій, а деякі мікроскопічні міцеліальні гриби в певних умовах культивування ростуть у дріжджоподібній формі. Проте переважне їх існування у вигляді одноклітинних форм дає можливість розглядати дріжджі як окрему групу еукаріотичних мікроорганізмів.

Клітини дріжджів мають різноманітну форму (рис. 3.5): круглу, овальну (*Trichosporon*), яйцеподібну (*Candida*), циліндричну (*Endomyces*), трикутну (*Trigonopsis*), лимоноподібну (*Nadsonia*), грушоподібну (*Schizoblastosporion*), стрілоподібну (*Brettanomyces*), серцеподібну (*Selenotila*).

Для деяких дріжджів форма клітин настільки характерна, що може бути використана для встановлення їх родової належності (наприклад, у *Trigonopsis* клітини трикутні). У представників роду *Candida*, навпаки, морфологія клітин не постійна, вона змінюється залежно від складу середовища та умов культивування, тому не може використовуватися як таксономічна ознака.

Розміри дріжджових клітин також варіюють у широких межах, мкм: діаметр найдрібніших клітин становить 1,5–2,0, довжина — 3–5, діаметр великих клітин — 8–10, їх довжина — 11–18, довжина витягнутих клітин може досягати 20–25.

Розмножуються дріжджі **безстатевим** (брунькування, поділ, безстатеві спори) і **статевим** способами (див. таблицю). Найпоширенішим способом безстатевого розмноження дріжджів є брунькування (див. рис. 3.4). На поверхні клітини утворюється брунька, яка збільшується до розмірів материнської клітини і відділяється від неї, залишаючи шрам або рубець. На одній материнській клітині може утворюватися не одна, а кілька бруньок. Таке брунькування називають множинним.

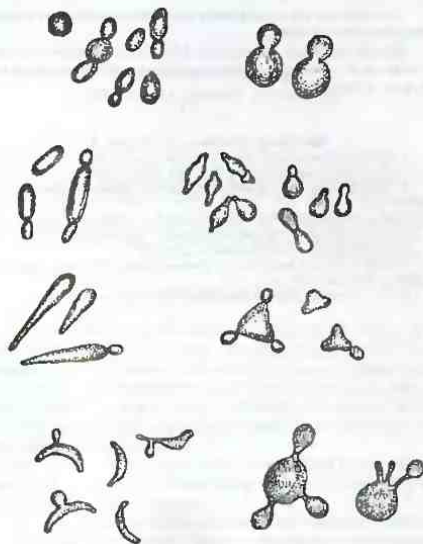


Рис. 3.5. Форма дріжджових клітин

Органами статевого розмноження дріжджів є спори, які бувають енд- та екзогенними. Ендогенними є **аскоспори** (див. рис. 3.4), екзогенними — **споридії**.

Залежно від наявності та типу статевого процесу дріжджі поділяють на три класи грибів:

*Ascomycetes* — утворюють сумки з ендогенними статевими спорами;

*Basidiomycetes* — утворюють базидіоподібні спороформи з екзогенними статевими спорами;

*Deuteromycetes* — не мають статевого процесу, утворюють лише безстатеві спори.

Більш повні дані про будову клітини, розмноження грибів і дріжджів, їх сучасну систематику та практичне значення наведені в розділах 8 і 9.

#### Контрольні запитання до розділу 3

1. На які групи за морфологічними ознаками поділяються бактерії?
2. Які розміри мають клітини бактерій і дріжджів?
3. Чому дріжджі розглядають як окрему групу еукаріотичних мікроорганізмів?
4. За якими ознаками гриби поділяються на вищі та нижчі?
5. Назвіть способи розмноження бактерій, грибів і дріжджів.
6. До яких класів грибів належать дріжджі?
7. Назвіть органи безстатевого розмноження грибів роду *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*.
8. Як називається і з чого складається вегетативне тіло гриба?

## 4. ХІМІЧНИЙ СКЛАД БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ

Хімічний склад бактеріальної клітини подібний до хімічного складу клітин інших живих організмів. Компонентами мікробної клітини є вода, мінеральні речовини та органічні сполуки — білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та ліпіди.

### 4.1. КЛІТИННА ВОДА

Вода становить 75–90 % маси вегетативної клітини. Вміст води в спорах значно нижчий. Нормальний метаболізм, ріст і розмноження мікроорганізмів можливі тільки у водному середовищі. Вода є розчинником органічних і мінеральних речовин, дисперсійним середовищем для колоїдів, джерелом протонів і гідроксильних іонів, а також джерелом водню та кисню в процесах метаболізму бактерій.

Вода в клітині міститься в двох станах: *вільна* — є розчинником, бере участь у процесах асиміляції та дисиміляції; *зв'язана* з клітинними колоїдами.

З прикладного погляду, що відповідає інтересам біотехнології, для оцінки стану води в клітині важливим є принцип використання енергії зв'язку, яким вода асоційована із структурами та метаболітами клітини. Виходячи з цього може бути запропоновано три типи зв'язку:

1) *хімічно зв'язана вода*. У цьому разі енергія зв'язку досягає найбільшого значення. Практично ця вода не вилучається, якщо не застосовувати спеціальних методів. При тепловому висушуванні вона зберігається в клітинах;

2) *вода, яка має фізико-хімічну форму зв'язку*. До такої води належить *адсорбційно та осмотично зв'язана вода*. *Адсорбційно зв'язана вода* утворює, як правило, мономолекулярний шар. За властивостями вона відрізняється від звичайної води. Так, в адсорб-

ційно зв'язаній воді не розчиняються ті речовини, які є розчинними в звичайній воді. Питома теплосмість адсорбційно зв'язаної води є меншою за одиницю, замерзає така вода при температурі, значно нижчій від нуля. Частина такої води не замерзає навіть при  $-78^{\circ}\text{C}$ . Адсорбційно зв'язана вода має підвищену густину.

Кількість *осмотично зв'язаної води* значно вища від адсорбційно зв'язаної. За фізико-хімічними властивостями осмотично зв'язана вода не відрізняється від звичайної вільної води. Вміст осмотично зв'язаної води регулюється завдяки структурним та функціональним особливостям цитоплазматичної мембрани і залежить від концентрації розчинних компонентів клітини, зокрема мінеральних речовин. Осмотично зв'язана вода може бути вилучена при висушуванні біомаси:

3) *механічно зв'язана вода*. Вона, як правило, не входить до складу самої клітини і легко видаляється з біомаси при фільтрації або під вакуумом при слабкому нагріванні.

## 4.2. ЕЛЕМЕНТНИЙ СКЛАД КЛІТИНИ

До складу бактеріальної клітини входять такі елементи, % до маси сухої речовини: вуглець — 50; кисень — 20; азот — 10–14; водень — 8; фосфор — 3; сірка, калій, натрій — 1; кальцій, магній, хлор — 0,5; залізо — 0,2; решта елементів — близько 0,3.

Вуглець, кисень, водень та азот є основними компонентами органічних сполук, з яких побудована клітина. Сірка необхідна для синтезу амінокислот цистеїну та метіоніну, а також деяких коферментів. Фосфор входить до складу нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, тейкоєвих кислот і таких нуклеотидів, як АТФ, ГТФ, НАД та ФАД. Іони калію, магнію, кальцію та заліза є кофакторами ферментів і компонентами металокомплексів. Так, більшість біологічно активних фосфорних ефірів міститься в клітинах у вигляді комплексів з магнієм. Іони заліза входять до складу компонентів дихального ланцюгу (цитохроми, залізосіркові білки).

## 4.3. ОРГАНІЧНІ СПОЛУКИ

Органічні сполуки, з яких складається клітина, наведено у таблиці. Вміст білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів і ліпі-

дів у бактеріальній клітині не постійний і змінюється залежно від виду бактерій, віку культури, складу поживного середовища та інших умов вирощування. У таблиці наведено середні дані щодо вмісту органічних сполук.

Білки. Білки становлять 40–80 % маси бактеріальної клітини і представлені простими білками (*протеїнами*) і складними (*протеїдами*). Протеїни складаються тільки з амінокислот, протеїди — з амінокислот і речовин небілкової природи. До складу бактеріальних білків входять ті самі 20 найважливіших амінокислот, що і до складу білків рослин і тварин. Амінокислотний склад білків різних видів бактерій кількісно та якісно різний. Так, у складі білків сарцин міститься багато лізину, у бацил — глютамінової кислоти. Більшість бактерій самі синтезують всі необхідні їм амінокислоти (наприклад, *Escherichia coli*). Але деякі бактерії не мають такої здатності і потребують готових амінокислот, які вносять у поживне середовище. Це так звані *ауксотрофи*. Мікроорганізми можуть бути ауксотрофами не тільки за амінокислотами, а й за вітамінами, нуклеотидами та ін.

За біологічними функціями білки є ферментами, токсинами, антигенами<sup>1</sup>, транспортними білками (див. таблицю).

Нуклеїнові кислоти. Нуклеїнові кислоти — це біополімери, що складаються з великої кількості (1500–5 000 000) мононуклеотидів.

Мононуклеотиди побудовані з азотистої основи (пуринової — аденін (А) або гуанін (Г), піримідинової — урцил (У), тимін (Т), цитозин (Ц)); рибози або дезоксирибози; залишку фосфорної кислоти.

До кожного залишку рибози (дезоксирибози) приєднуються одна з азотистих основ. Сполук азотистої основи з цукром називається *нуклеозидом*. Окремі нуклеозиди зшиваються між собою в полімер за допомогою залишків фосфорної кислоти. Нуклеозид із залишком фосфорної кислоти називається *нуклеотидом*. Мононуклеотиди ковалентно зв'язуються між

<sup>1</sup> Антиген — речовина, що сприймається організмом як чужорідна і яка викликає імунну відповідь: з'єднання із специфічними білками — *антибідами* або поглинання особливими клітинами. *Антибіло* — білок (імуноглобулін), що синтезується організмом на введення антигена. Комплекс антиген-антибіло з нерозчинним, він поглинається спеціальними клітинами і перераховується ними або виводиться з організму.

## Хімічний склад бактеріальної клітини. Органічні сполуки

Органічна сполука	Вміст, г/100 г сухих клітин	Характеристика	Функції в клітині
Білки	62,4	Протеїни (прості білки, складаються тільки з амінокислот). Протеїди (складні білки, складаються з амінокислот і речовин небілкової природи) — нуклеопротеїди, глікопротеїди, ліпопротеїди, фосфопротеїди, металопротеїди	Ферменти, транспортні білки, гормони, антигени, токсени
Нуклеїнові кислоти	РНК — 15,7 ДНК — 3,2	РНК містить рибозу, азотисті основи АГЦУ, залишок фосфорної кислоти. Є три типи РНК: інформаційна (матрична), транспортна, рибосомальна. РНК, як правило, однокільцювата. ДНК містить дезоксирибозу, азотисті основи АГЦТ, залишок фосфорної кислоти. Складається з двох полінуклеотидних ланцюгів, що утворюють подвійну спіраль	Беруть участь у синтезі білка Носії генетичної інформації
Вуглеводи (полісахариди)	16,6	Глікоген, крохмаль, целюлоза. Капсульні полісахариди (екзодотсахариди, гомо- та гетерополісахариди). Специфічні бактеріальні полісахариди (пептидоглікан, тейкові кислоти, ліпополісахариди)	Запасні речовини. Захисна функція. Антигени, можуть сприяти вірулентності бактерій. Входять до складу клітинної стінки та зовнішньої мембрани
Ліпиди	9,4	Вищі жирні кислоти (переважно яскраві, нежасні — тільки з одним подвійним зв'язком, міколові кислоти). Фосфоліпіди (фосфогліцериди, гліцерофосфати) — фосфатидна кислота, фосфатидилсерин, фосфатидітанолеїн, фосфатидіхолін та ін. Нейтральні жири — ефіри вищих жирних кислот (найчастіше пальм'ятинової, масляної, лауринової, лінолевої) та гліцерину Воски — складні ефіри вищих жирних кислот і спиртів	Запасні речовини (поліоксифутири). Структурні компоненти (входять до складу плазмалемми). Входить до складу антигенів. Зумовлюють кислото-стійкість бактерій. Беруть участь у енергетичному обміні та метаболізмі вуглеводів.

собою фосфодіефірними зв'язками, які виникають між третім і п'ятим атомами вуглецю в молекулі рибози (дезоксирибози), тому такі зв'язки називаються 3'-5'-зв'язками. Так утворюються полінуклеотиди — нуклеїнові кислоти. Існують два типи нуклеїнових кислот: рибонуклеїнова, що складається з рибонуклеотидів, і дезоксирибонуклеїнова — з дезоксирибонуклеотидів.

Молекула РНК містить цукор рибозу, азотисті основи АГЦУ та залишок фосфорної кислоти. Як правило, РНК є одноланцюговою. У клітинах містяться три типи РНК: **інформаційна**, або **матрична** (використовується як матриця, що визначає послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюгу, який синтезується); **транспортна** (перевозить на рибосому певні амінокислоти); та **рибосомальна** (міститься в рибосомах).

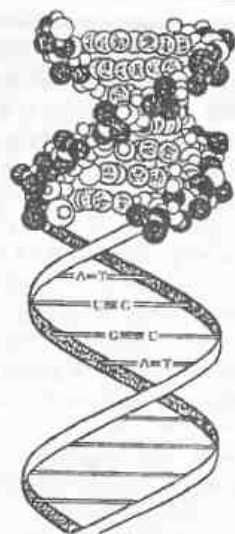
Молекула ДНК містить цукор дезоксирибозу, азотисті основи АГЦТ та залишок фосфорної кислоти.

Ще у 1950 р. американський біохімік Е. Чаргвафф встановив ряд закономірностей ("правила Чаргваффа"): аденін присутній у ДНК у тій самій кількості, що й тимін, в гуанін — у тій самій, що й цитозин, тобто  $A=T$ ,  $G=C$ ; сума пуринових основ дорівнює сумі піримідинових основ: відношення  $(G+C)/(A+T)$  може варіювати в широких межах, проте залишається постійним для даного виду. Але пояснити, чому для практично всіх організмів правила Чаргваффа виявилися справедливими, стало можливим тільки після відкриття структури ДНК.

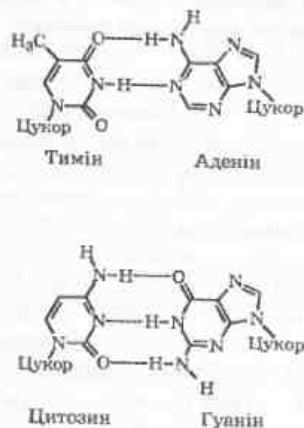
У 1953 р. американські біохіміки Д. Уотсон та Ф. Крік встановили, що молекула ДНК являє собою подвійну спіраль, у якій два полінуклеотидні ланцюги закручені один навколо одного та навколо спільної осі (рисунком). Ланцюги ДНК антипаралельні: в одному ланцюзі міжнуклеотидні зв'язки йдуть у напрямку 3'-5', а в іншому — у протилежному — 5'-3'.

Пуринові та піримідинові основи поєднані всередину спіралі, і кожна з них сполучена водневим зв'язком з певною основою другого ланцюга: аденін — з тиміном (АТ), гуанін — з цитозином (ГЦ). Як видно з рисунка, між гуаніном та цитозином виникають три водневі зв'язки, а між тиміном та аденіном — лише два. При підвищенні температури водневі зв'язки розриваються, полінуклеотидні ланцюги розходяться. Таке руйнування вторинної структури ДНК супроводжується поглинанням світла (при довжині хвилі 259 нм). Це явище називається **гіперхромним ефектом**. Температуру, при якій приріст екс-





Структура дезоксирибонуклеїнової кислоти:  
Ліворуч — подвійна спіраль ДНК; праворуч — показано з'єднання основ — аденіну з тиміном та гуаніну з цитозином. Пунктиром показано водневі зв'язки



тинції (поглинання) світла досягає половини максимальної величини, називають *точкою плавлення* ( $T_{пл}$ ). Точка плавлення (або температура плавлення) тим вища, чим більше в ДНК гуаніну та цитозину — основ, з'єднаних між собою трьома водневими зв'язками. Саме тому точка плавлення очищеної ДНК є показником, який дає можливість легко визначити вміст у ній гуаніну та цитозину. **Вміст пар ГЦ у ДНК** — це відношення суми молей гуаніну та цитозину до суми молей усіх чотирьох основ у даній ДНК (виражається у відсотках). Вміст ГЦ видоспецифічний і розглядається як таксономічна ознака. Вміст ГЦ у різних бактерій коливається від 22 до 75 %.

**Вуглеводи.** У бактеріальній клітині міститься 12–30 % вуглеводів від її сухої маси. Представлені вуглеводи *моно-* та *полісахаридами*.

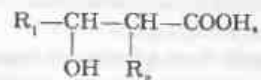
**Полісахариди** мікроорганізмів — це надзвичайно різноманітна група біополімерів, серед яких є сполуки, характерні як для прокаріот, так і для еукаріот (глікоген, целюлоза). Але у бак-

терій виявлені полісахариди, які не зустрічаються в інших організмів (тейхоеві кислоти, пептидоглікани, ліпополісахариди). Детальніше специфічні бактеріальні полісахариди будуть розглянуті в наступних розділах.

Полісахариди мікроорганізмів поділяються на внутрішньо- (ендо-) та позаклітинні (екзо-). Ендополісахариди виконують функції запасних речовин, є структурними компонентами (входять до складу клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани), ендотоксинами та ін. Екзополісахариди утворюють капсулу або виділяються в культуральну рідину. Це речовини з молекулярною масою до 1 000 000, гідрофільні, з негативним зарядом. В основному представлені гетерополісахаридами, але є і гомополісахариди, наприклад, глюкани (складаються тільки з глюкози), левани (до складу входить тільки фруктоза).

**Ліпіди.** Представлені у бактерій вищими жирними кислотами, фосфоліпідами, нейтральними жирами, восками.

**Вищі жирні кислоти.** Насичені жирні кислоти широко зустрічаються у бактерій, ненасичені кислоти представлені лише кислотами з одним подвійним зв'язком (наприклад, пальмітолеїнова). У бактерій виявлені *міколові кислоти*. Це  $\beta$ -оксикислоти з довгим аліфатичним ланцюгом, вони локалізовані в клітинних стінках нокардіо- та корінебактерій, зумовлюють гідрофобний характер клітин:



де  $R_1$  і  $R_2$  — аліфатичні ланцюги, що містять від 20 до 90 атомів вуглецю.

Наявність міколових кислот, а також високий вміст інших ліпідів зумовлюють *кислотостійкість* деяких бактерій (мікобактерій), а також здатність використовувати гідрофобні субстрати (наприклад, парафіни нафти). Кількісний і якісний склад жирних кислот змінюється з віком культури, також залежить від умов культивування.

**Фосфоліпіди** (фосфогліцериди, гліцерофосфати) представлені фосфатидною кислотою, фосфатиділсерином, фосфатиділетаноламіном, фосфатиділхоліном та ін. Основна маса ліпідів міститься в цитоплазматичних мембранах і клітинних оболонках. Фосфоліпіди бактерій подібні до фосфоліпідів рослин і тварин, але відрізняються від них за складом жирних кислот. У бак-

теріальних фосфоліпідах переважають жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом (15–17 атомів вуглецю), у рослинних і тваринних ліпідах — нерозгалужені кислоти. У бактерій значно рідше зустрічається лецитин (фосфатиділхолін).

*Нейтральні жири* (ацилгліцерини або гліцериди) найчастіше містять пальмітинову, масляну, лауринову, лінолеву жирні кислоти.

*Воски* (складні ефіри жирних кислот з довгим ланцюгом і спиртів) містять кислотостійкі бактерії, наприклад, мікобактерії. Так, у туберкульозній паличці міститься до 60 % воску.

Бактерії, на відміну від дріжджів і грибів, не містять як обов'язкові компоненти поліненасичені жирні кислоти, не містять і не потребують (за винятком однієї групи мікоплазм) стеринів і стероїдів.

Загальний вміст ліпідів у клітині варіює від 5 (у дифтерійної палички) до 30–40 % (у збудника туберкульозу). Основна маса ліпідів у клітині зв'язана з іншими компонентами: білками (в цитоплазматичній мембрані), полісахаридами (ендотоксини та О-антигени грамнегативних бактерій).

Ліпіди мікроорганізмів різноманітніші, ніж ліпіди вищих організмів. Вони виконують різні функції: є запасними речовинами (поліоксibuтират), структурними компонентами клітини (цитоплазматична мембрана), беруть участь у метаболізмі вуглеводів, в енергетичному обміні, входять до складу антигенів, зумовлюють кислотостійкість бактерій.

**Пігменти бактерій.** Серед бактерій є велика кількість пігментованих видів. Пігменти синтезуються бактеріями залежно від умов вирощування — складу середовища, природи джерела вуглецю, кількості кисню, наявності освітлення та ін. Важливими елементами для утворення пігментів є азот, магній, залізо, кальцій. Мікробні пігменти поділяються на дві групи: нерозчинні, зв'язані з клітинними компонентами вони зумовлюють забарвлення колоній, але не середовища (пігменти жовтої сарцини, золотистого стафілокока); розчинні в поживному середовищі, яке забарвлюється при культивуванні бактерій. За хімічним складом пігменти надзвичайно різноманітні: каротиноїди, меланіни, хінони, бактеріохлорофіли, піроли.

*Бактеріохлорофіли* відрізняються структурно між собою і від хлорофілу вищих рослин. Більшість фотосинтезувальних бактерій містить бактеріохлорофіл *a*, пурпурові бактерії — бак-

теріохлорофіл *b*, зелені сіркобактерії — *c*, *d*, *e*. Ці бактеріохлорофіли відрізняються за максимумом поглинання світла в діапазоні хвилі від 375 до 1040 нм.

*Каротиноїдні пігменти* відомо понад 300. За хімічним складом каротиноїди є продуктами конденсації залишків ізопрену. Локалізовані, як і бактеріохлорофіли, у внутрішньоклітинних білковоліпідних мембранних структурах клітини. Поглинають світло з довжиною хвилі 400–550 нм. У фототрофних бактерій каротиноїди є допоміжними пігментами, які передають 30–90 % енергії до молекул бактеріохлорофілу, захищають хлорофіл від фотоокиснення, беруть участь у реакціях фототаксису. У нефотосинтезувальних мікроорганізмів каротиноїди виконують захисну функцію.

*Меланіни* (пігменти чорного та коричневого кольору) — це зв'язані з білками полімери, які завдяки наявності вільних радикалів і здатності зворотно окиснюватись та відновлюватись зумовлюють захист клітини від дії різних стресових факторів. Зустрічаються у бактерій, грибів і дріжджів.

#### 4.4. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ

Сукупність фізико-хімічних властивостей залежить від видових особливостей бактерій, їх віку та умов культивування.

*Броунівський рух.* Притаманий нерухливим бактеріям розміром менше як 4 мкм. Це явище може пригнічуватись додаванням електролітів чи колоїдів у поживні середовища.

*Показник заломлення.* Встановлюється шляхом внесення бактерій у розчини з різними показниками заломлення. При мікроскопуванні бактерії стають невидимими, коли показник заломлення клітини та середовища збігаються. Наприклад, холерний вібріон стає невидимим у фенолі з показником заломлення 1,55.

*Густина мікробної клітини.* Вона залежить від віку, виду бактерій і складу середовища. Золотистий стафілокок має густину 1,118, кишкова паличка — 1,094.

*В'язкість мікробної клітини.* У середньому вона перевищує в'язкість води у 800 разів (в'язкість гліцерину). Для визначення внутрішньоклітинної в'язкості за допомогою мікроанупулятора в цитоплазму вводять металеву пластину. За інтенсивністю її руху судять про величину в'язкості. Контролем служить

інтенсивність електромагнітного поля, яке спричиняє рух такої самої пластини у воді.

**Еластичність** — це здатність клітини відновлювати форму після тимчасових деформацій.

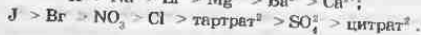
**Електричний заряд поверхні бактерій.** В електричному полі бактерії рухаються до катода (катафорез) або до анода (анофорез), або за певних значень pH перестають рухатись (ізоелектрична точка). Більшість бактерій мають негативний заряд.

**Окисно-відновний потенціал (Eh).** Виражається у вольтах (В). Аеробні мікроорганізми розвиваються на середовищах з Eh +0,2...0,4 В (за нейтрального pH). Вони легко змінюють Eh, тому що характеризуються наявністю добре розвиненої ферментної системи окиснення-відновлення (цитохромоксидази, каталаза та ін.). Анаеробні бактерії не можуть рости, якщо Eh середовища перевищує 0,2 В.

**Гідрофобність і гідрофільність.** Зумовлена наявністю в поверхневих структурах відповідних хімічних груп: гідрофільних — OH, NH<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>, COOH, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, —C=O; гідрофобних — CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> та ін. Більшість бактерій гідрофільні, а кислотостійкі палички — гідрофобні.

**Неспецифічна аглютинація (склеювання).** У процесі вирощування бактерій на рідких поживних середовищах спостерігається або рівномірне помутніння середовища, або утворюється осад і над ним — більш-менш прозора надосадова рідина. В останньому разі йдеться про аглютинацію бактерій. Залежить вона від ряду факторів: ступеня гідратації полярних іонізуючих та неіонізуючих груп, кількості солей та іонів, адсорбованих на поверхні клітини, електричного заряду.

**Адсорбція іонів.** Інтенсивність проникнення іонів у клітину визначається їх положенням у катіонному та аніонному рядах:



Це значить, що розчинність солей певного катіона знижується внаслідок дії іншої солі, катіон якої розміщений праворуч. Так, проникність для солей літію знижується в присутності солей магнію, барію та кальцію. В аніонному ряду проникність тим більша, чим лівіше розміщений катіон. Так, проникність аніону хлору менша, ніж бром.

**Осмотичний тиск.** Завдяки наявності в клітині великої кількості вільних електролітів внутрішній тиск у клітині висо-

кий. Деякі бактерії (галофільні) здатні витримувати високий внутрішній тиск. Їх називають осмофільними.

**Світлі бактерії.** Всі організми, які світяться, мають однакову природу світіння — їх біоломінесценція являє собою хімічну реакцію, що каталізується специфічним ферментом. **Біоломінесценція** — це окиснення субстрату люциферину в присутності ферменту люциферази. При цьому утворюється велика кількість енергії, яка переводить проміжний продукт у збуджений стан.

#### Контрольні запитання до розділу 4

1. У якому стані перебуває вода в мікробній клітині?
2. Які органічні сполуки входять до складу мікробної клітини?
3. З яких елементів складається мікробна клітина?
4. Які функції в клітині виконують білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та ліпіди?
5. Що таке гіперхромний ефект?
6. Назвіть специфічні бактеріальні полісахариди.
7. Які властивості бактерій зумовлені наявністю нікотових кислот?
8. Як поділяються бактеріальні пігменти за розчинністю та хімічним складом?
9. Які фізико-хімічні властивості притягують бактеріальні клітини?

## 5. БУДОВА МІКРОБНОЇ КЛІТИНИ

### 5.1. КЛІТИННІ СТІНКИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Клітинна стінка є одним з найважливіших структурних елементів. Її основна функція полягає в захисті вмісту клітини від дії зовнішніх факторів і збереженні характерної для організму форми. На частку клітинної стінки припадає від 10 до 50 % маси клітини. Товщина клітинної стінки у бактерій досягає 10–80 нм. При старінні організму клітинна стінка потонщується. Поверхневі структури клітинної стінки визначають контакт клітини з зовнішнім середовищем.

#### 5.1.1. Поверхневі структури клітинної стінки бактерій

Джгутики і рухливість. За здатністю переміщуватися всі бактерії поділяються на рухливі та нерухливі. У більшості бактерій здатність рухатися зумовлена наявністю **джгутиків**. Рухатися без джгутиків можуть ковальні бактерії (до них належать міксобактерії, ціанобактерії) та спірохети.

Розміщення джгутиків у рухливих еубактерій є ознакою, характерною для певних груп, тому вона має таксономічне значення. У паличкоподібних бактерій джгутики можуть бути розміщені **полярно** або **латерально** (моно- і біполярне розміщення) (рис. 5.1). Серед бактерій з монополярним джгутикуванням лише деякі мають один, але товстий джгутик (монотрихи) (*Vibrio*). Більшість бактерій є політрихами. Монополярне-політрихальне розміщення джгутиків називається також **лофотрихальним** (*Pseudomonas*, *Chromatium*), а біполярне-політрихальне — **амфітрихальним** (*Spirillum*). При **перитрихальному** розміщенні (ентеробактерії, бацили) джгутики розміщуються по боках клітини або по всій поверхні.

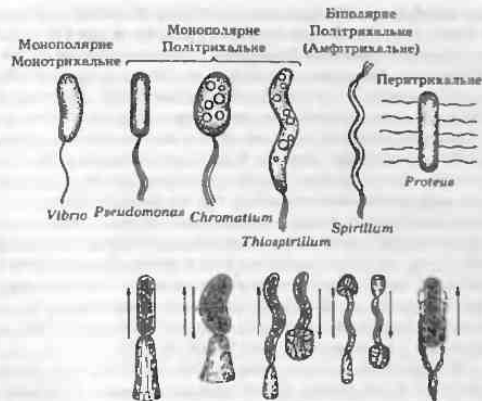


Рис. 5.1. Основні типи джгутикування та типи руху бактерій

Джгутики являють собою спірально закручені нитки. У різних бактерій вони розрізняються за товщиною (12–18 нм), довжиною (до 20 мкм), а також за довжиною та амплітудою аитка. Нитки джгутиків складаються із специфічного білка **флагеліну**. Флагелін має молекулярну масу до 40 000.

За функціями флагелін часто порівнюють з міозином м'язових тканин (скорочувальним білком), який забезпечує рух. Але на відміну від більшості скорочувальних білків, функція яких пов'язана з гідролізом АТФ (тобто для забезпечення руху використовується енергія гідролізу АТФ), базальне тіло повертається навколо своєї осі за рахунок енергії, що генерується протонною силою. Джгутик складається з трьох частин: спіральної нитки, "крюка" поблизу поверхні клітини і базального тільця. За допомогою базального тільця джгутик закріплюється в плазматичній мембрані та клітинній стінці.

**Фібрилі та пілі.** Поверхня деяких бактерій покрита великою кількістю (від 10 до кількох тисяч) довгих тонких прямих ниток завтовшки 3–25 нм та завдовжки до 12 мкм, які назива-



ються **фібріями**. Фібрії зустрічаються у бактерій, які мають і не мають джгутиків. Одна з перших робіт із вивчення хімічного складу фібрій (у бактерій *Escherichia coli*) була здійснена у 1960 р. А. Брінтоном. Експерименти показали, що до складу фібрій входять **лектини** — вуглеводні зв'язувальні білки. Залежно від вуглеводної специфічності лектинів існує кілька типів фібрій. Так, лектини фібрій першого типу є манозоспецифічними. G-фібрій — специфічними до N-ацетилглюкозаміну. В амінокислотному складі фібрій першого типу переважають дикарбонові та аліфатичні амінокислоти, у той час як сірковмісні амінокислоти присутні у слідових кількостях. У складі фібріальних лектинів виявлено до 40–50 % гідрофобних амінокислот (пролін, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін). Незважаючи на те що фібрії першого типу утворюються великою кількістю ентеробактерій, амінокислотний склад цих білків встановлений тільки для деяких штамів. Молекулярна маса лектинів, з яких складаються фібрії, становить близько 16 000–25 000.

Крім фібрій, клітини багатьох бактерій містять статеві пілі (*F*-пілі). Їх не більше однієї-двох на клітину. Пілі мають вигляд порожніх всередині білкових трубочок завдовжки від 0,5 до 10 мкм. За допомогою статевих пілей чоловіча клітина прикріплюється до жіночої, утворюючи кон'югаційний тунель, по якому відбувається передача ДНК від донора до реципієнта.

**Таксиси** (від *грец.* taxis — розміщення) бувають позитивними або негативними, залежно від руху бактерії до фактора чи від нього. Є кілька типів таксисів.

**Хемотаксис** — рух, який зумовлюється хімічними речовинами. За здатністю індукувати (тобто викликати, зумовлювати) позитивний чи негативний хемотаксис розрізняють дві групи речовин: **атрактанти** — речовини, що зумовлюють скупчення клітин у ділянці вищої концентрації сполуки; **репеленти** — речовини, що зумовлюють скупчення клітин у ділянці найнижчої концентрації. Слід зазначити, що не всі сполуки, які використовуються мікроорганізмами як поживні речовини, є аттрактантами.

**Аеротаксис** — рух бактерій до (від) молекулярного кисню. У рухливих бактерій тип метаболізму (аеробний чи анаеробний) можна визначити за аеротаксичним рухом і скупченням клітин на певних відстанях від накривного скла. При цьому строго анаеробні бактерії будуть розміщуватися в центрі скла, аеро-

бі — біля його країв чи біля бульбашок повітря, факультативні анаероби — між аеробами та анаеробами.

**Фототаксис** — рух бактерій, зумовлений світловою енергією. Так, фототрофні бактерії, яким для одержання енергії необхідне світло, в результаті фототаксису згущуються в освітленому місці. Якщо витримати в темноті препарат, у якому суспензія клітин *Chromatium* рівномірно розподілена під накривним склом, а потім спрямувати на нього промінь світла, то бактерії накопичаться в ділянці світлової плями.

**Магнітотаксис** — рух бактерій за силовими лініями магнітного поля Землі або магніту, зумовлений наявністю в спеціальних гранулах **магнітосомах** великої кількості заліза (до 0,4 % сухої речовини) у вигляді феромагнітного оксиду. Магнітосоми розміщені біля місць прикріплення джгутиків.

**Термотаксис** — рух бактерій, зумовлений джерелом тепла.

**Віскозитаксис** — рух бактерій у напрямку збільшення чи зниження в'язкості розчину. Наприклад, для сірохет-паразитів людини й тварин, які переміщуються до поверхні слизових оболонок, ця властивість має пристосувальний характер. Механізм цього процесу поки що не встановлений.

**Капсула та слизовий шар**. Капсула розміщена поверх клітинної стінки. Її можна побачити під світловим мікроскопом, якщо обробити препарат такими барвниками, як нігрозин, конго червоний і китайська туш. Як і в капсулу не проникають. При цьому маємо як би негативне контрастування: світла капсула виділяється на темному фоні.

Розрізняють **мікрокапсули** завтовшки 0,2 мкм. Мікрокапсули невидимі у світловому мікроскопі, їх можна виявити тільки імунологічно (за набуханням при змішуванні із специфічними антитілами). **Макрокапсула** завтовшки більш як 0,2 мкм добре видима у світловому мікроскопі. **Слизовий шар** за товщиною в багато разів перевищує розміри клітини. Являє собою гідратовану в'язку масу, що накопичується на поверхні клітини.

Капсулу легко відокремити від клітини механічно, наприклад, центрифугуванням або вилученням у вигляді водних, буферних чи слабкожидких розчинів.

За хімічним складом капсули поділяються на: **капсули полісахаридної природи**, що складаються з гомополісахаридів (побудовані з одного й того самого моносхариду, наприклад, у *Leuconostoc mesenteroides* — з глюкози, у бакте-

рій роду *Klebsiella* — з галактози); гетерополісахаридів (побудовані з різних моносахаридних залишків, наприклад, у *Pseudomonas aeruginosa* — із залишків глюкози, галактози, манози, рамнози, глюкуронової кислоти);

капсули, що складаються з поліпептидів і полісахаридів, наприклад, у *Bacillus megaterium*.

Капсулу можна розглядати як пристосувальне утворення у сапрофітних і патогенних бактерій. Утворення капсули стимулюється присутністю живої тканини для патогенних мікробів (паличка сибірки), наявністю вуглеводів і низькою температурою (тифозна паличка), наявністю сахарози (азотобактер). Полісахариди капсули деяких бактерій є антигенами, вони здатні також сприяти вірулентності бактерій (так, капсульні штами пневмококів спричиняють пневмонію у білих мишей, а декарсульзовані втрачають цю здатність).

Капсула утримується на поверхні клітинної стінки за рахунок як іонних, так і ковалентних зв'язків.

Полісахариди, що утворюють капсулу, належать до екзополісахаридів (ЕПС). У біотехнології мікробних полісахаридів їх називають **капсульними**, а полісахариди, що виділяються в культуральну рідину, — **екзополісахаридами**.

Здатність до синтезу екзополісахаридів притаманна багатьом мікроорганізмам — представникам різних фізіологічних і таксономічних груп. Синтезуються ЕПС грибами (*Aureobasidium pullulans* — полісахарид пулулан, *Sclerotium rolfsii* — склероглюкан), дріжджами (*Cryptococcus laurentii*, *Hansenula*), бактеріями. Серед бактеріальних продуцентів ЕПС є фітопатогенні бактерії (*Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas*, *Erwinia*), азотфіксуювальні (*Azotobacter beijerinckii*), метилюсильні (*Methylocystis parvus*, *Methylobacterium mucosa*). Серед ЕПС, як і серед капсульних полісахаридів, є гомо- та гетерополісахариди. Розрізняють також нейтральні ЕПС (складаються тільки з залишків моносахаридів), кислі ЕПС (містять залишки уронових, пірролінотрадних та інших кислот), лужні ЕПС (містять залишки аміноцукрів).

### 5.1.2. Будова і хімічний склад клітинних стінок прокариот

Хімічний склад клітинних стінок мікроорганізмів спочатку привертав увагу дослідників у галузі систематики. Основою

тому були дані про якісні відмінності у складі клітинних стінок між еукаріотними та прокариотними мікроорганізмами, а також серед прекаріотів — між грампозитивними та грамнегативними бактеріями (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Хімічний склад клітинних стінок мікроорганізмів

Полімери	Еукаріоти	Прокариоти (бактерії)	
		Грампозитивні	Грамнегативні
Пептидоглікан	—	+	+
Тейхоева кислота	—	+	—
Ліпополісахарид	—	—	+
Ліпопротеїн	+	—	—
Білок	+	±	+
Полісахарид	+	+	+

**Фарбування за Грамом.** Диференційоване фарбування бактерій генціановіолетом було запропоновано у 1884 р. датським фармакологом Г.Х. Грамом. У мікробіології забарвлення за Грамом є важливою таксономічною ознакою, з якою корелюють інші властивості бактерій. Суть методу полягає в тому, що при фарбуванні бактерій генціановіолетом (кристаловіолетом, метиліовіолетом) фарба з йодом утворюють сполуку, що утримується клітинами при обробці їх спиртом. Такі бактерії забарвлені в синьо-фіолетовий колір і їх називають **грампозитивними**.

Бактерії, які знебарвлюються при обробці спиртом, називаються **грамнегативними**. Їх потім дофарбовують контрастною фарбою (фуксином).

У 1978 р. Н.Е. Гіббонс та Р.Г.Е. Муррей пропонували грамнегативні істинні бактерії (еубактерії) виділяти у відділ Грацилікутних (*Gracilicutes*), а грампозитивні — у відділ Фірмікутних (*Firmicutes*). Але терміни "фірмікути", "грацилікути" бактерії не мають широкого використання в мікробіології.

**Пептидоглікан (глікопептид, мукопептид, муреїн).** Основним компонентом клітинної стінки бактерій є пептидоглікан (глікопептид, мукопептид, муреїн). Пептидоглікан виявлено тільки у прекаріот. Винятком є еубактерії, що не мають клітинної стінки (мікоплазми, L-форми), та архебактерії — деякі метаноутворювальні та галофіли (*Halobacterium*, *Halococcus*). Для гало-

фільних бактерій наявність міцної клітинної стінки не обов'язкова, оскільки вміст їх клітин є ізоосмотичним з навколишнім середовищем.

Специфічний гетерополімер пептидоглікан складається: із залишків N-ацетилглюкозаміну та N-ацетилмурамової кислоти, з'єднаних між собою  $\beta$ -1,4-глікозидними зв'язками. N-ацетилглюкозамін є похідною сполукою глюкози, в якій гідроксильна група при другому атомі вуглецю замінена на аміногрупу. N-ацетилмурамова кислота — це ефір N-ацетилглюкозаміну та D-молочної кислоти (рис. 5.2);

із діамінокислот, з яких найчастіше зустрічаються мезодіамінопімелінова кислота, LL-діамінопімелінова кислота, лізин, оригін. Наявність таких амінокислот з двома аміногрупами має принципове значення для просторової організації пептидоглікану. Вони забезпечують утворення двох пептидних зв'язків між пептидними угрупованнями в молекулі;

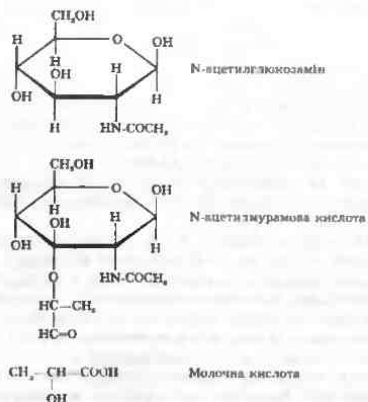


Рис. 5.2. Основні складові гетерополімеру пептидоглікану

з інших амінокислот (D- та L-аланин, D-глютамінова кислота, L-серин, гліцин).

Фрагмент пептидоглікану показано на рис. 5.3. За допомогою пептидних місточків гетерополімерні ланцюги зв'язані між собою в мішкоподібну гігантську молекулу — **мурейновий мішок (мурейнова сітка)**.

Мурейновий мішок виконує функцію **опорного каркаса клітинної стінки**. За будовою цього каркаса, а також за вмістом інших речовин у клітинній стінці грампозитивні бактерії відрізняються від грамнегативних.

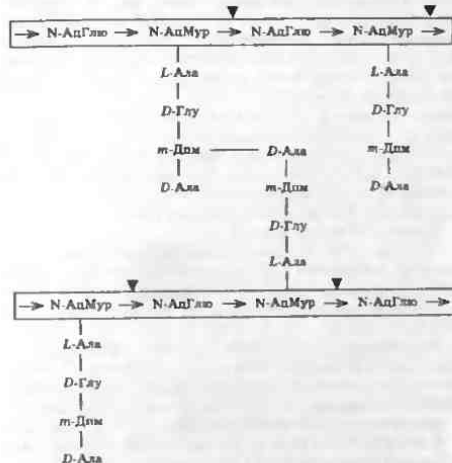


Рис. 5.3. Структура пептидоглікану *Escherichia coli*: N-АцМур — N-ацетилмурамова кислота; N-АцГлю — N-ацетилглюкозамін; Ala — аланін; Глу — глютамінова кислота; m-Дип — мезодіамінопімелінова кислота; ▼ — лізоцим

**Клітинна стінка грампозитивних бактерій.** У грампозитивних бактерій частка муреїнової сітки становить 30–70 % сухої маси клітинної стінки (завтовшки 40 шарів). Замість *мезо*-діамінопічмелінової кислоти часто міститься LL-діамінопічмелінова кислота або лізин. У клітинній стінці грампозитивних бактерій полісахариди, якщо вони є, зв'язані між собою ковалентно. Вміст ліпідів і білків невисокий. У білках клітинних стінок грампозитивних бактерій набір амінокислот менший (4–12), ніж у грамнегативних (містяться практично всі амінокислоти, з яких складаються білки).

Характерною особливістю грампозитивних бактерій є наявність у клітинній стінці *тейхосових кислот*. Тейхосові кислоти — це ланцюги, які складаються з 8–50 залишків гліцерину чи рибітолу, зв'язаних між собою фосфатними містками. У молекулі тейхосової кислоти поліол може містити моносахариди як замісники. Деякі з тейхосових кислот містять еритритол чи мніні. Припускається, що тейхосові кислоти зв'язані з муреїном через фосфат за типом аміду. У складі тейхосових кислот деяких грампозитивних бактерій містяться жирні кислоти, які утворюють ефірні зв'язки з гліцериновими залишками. Їх називають *ліп*-*тейхосовими кислотами*. Тейхосові кислоти містяться в клітинах у значних кількостях. У деяких бактерій вони становлять більше половини маси клітинної стінки.

**Функції тейхосових кислот:**

фосфатні групи тейхосових кислот є місцем зв'язування катіонів магнію, необхідного для багатьох ензиматичних і фізико-хімічних процесів, що проходять на цитоплазматичній мембрані; тейхосові кислоти беруть участь у регуляції активності автолітичних ферментів;

було показано, що цукрові компоненти тейхосових кислот є відповідальними за зв'язування фагів з клітинною стінкою. Якщо тейхосова кислота з будь-яких причин втрачає глікозильні замісники, то бактеріальна клітина стає фагорезистентною (фагостійкою); ліп-тейхосові кислоти беруть участь в імунологічних реакціях.

**Клітинна стінка грамнегативних бактерій.** У грамнегативних бактерій муреїнова сітка є одношаровою і становить менше 10 % сухої маси клітинної стінки. Муреїн містить тільки *мезо*-діамінопічмелінову кислоту і не містить лізину. У складі клітинних стінок грамнегативних бактерій тейхосові кислоти не виявлено.

У всіх грамнегативних бактерій зверху одношарового чи навіть більше двохшарового муреїнового мішка розміщується зовнішній шар клітинної стінки. Це так звана *зовнішня мембрана*, що складається з білків, фосфоліпідів і ліпополісахаридів (ЛПС) (рис. 5.4).

З муреїном, очевидно, ковалентно через діамінопічмелінову кислоту зв'язані ліпопротеїни. Вони орієнтовані своїми ліпофільними кінцями назовні і таким чином закріплені в ліпофільному подвійному шарі (завдяки гідрофобній взаємодії). У цьому ж шарі містяться фосфоліпіди та гідрофобні кінці ліпополісахаридів. Гідрофільні кінці ЛПС орієнтовані назовні.

Ліпополісахариди — складні молекули з молекулярною масою більш як 10 000. Вони складаються з трьох частин — *ліп*-*іду* А, *ядра* (кор, *серцевинна зона*) та *О специфічного бокового ланцюга*. ЛПС *Salmonella typhimurium* та інших ентеробактерій досліджені досить повно.

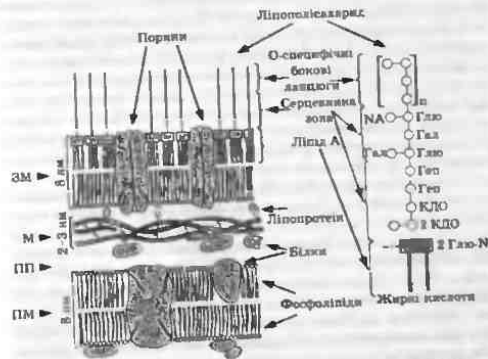


Рис. 5.4. Модель будови клітинної стінки грамнегативних бактерій. Проворуч — ліпополісахаридна молекула: Глю — глюкоза, Глю-Н — глюкозамін; NA — N-ацетилглюкозамін; Гал — галактоза; Гве — гентіоза; КЛО — 2-кето-8-азоксикетонтова кислота; М — муреїн; БМ — зовнішня мембрана; ПМ — плазматична мембрана; ПП — периплазматичний простір



**Ліпід А** складається з глюкозаміндісахариду, до гідроксильних груп якого ефірними зв'язками приєднані жирні кислоти ( $C_{12}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{16}$ ). Ця частина молекули має гідрофобні властивості. Далі міститься **R-серцевинна зона** — трисахарид, що складається з трьох залишків 2-кето-3-дезокситоктової кислоти (КДО) і який зв'язаний також з фосфотаноламіном. Далі йдуть дві молекули гептози і **зовнішня серцевинна зона**. Остання складається з розгалуженого ланцюга, що містить глюкозу, галактозу і N-ацетилглюкозамін. Ця базова структура є однаковою у всіх сальмонел. До серцевинної зони прилягає **O-специфічний боковий ланцюг**. Це довгі ланцюги, що складаються з повторюваних олігосахаридів, які можуть містити галактозу, манозу, рамнозу, абеквону, фукозу та інші моносахариди у послідовності, що варіює від штаму до штаму.

ЛПС набули великого значення в бактеріологічній діагностиці і розпізнаванні епідемій. Виявилось, що збудники різних захворювань відрізняються один від одного O-специфічними боковими ланцюгами. Незначні відмінності в їх складі можуть бути виявлені за допомогою імунологічних методів. За серологічними реакціями у роді *Salmonella* вдалося виділити понад тисячу видів і штамів. Є так звані місцеві раси сальмонел, які можна ідентифікувати за імунохімічними особливостями. Це часто дає можливість встановити, де відбулося зараження хворого чи звідки почала поширюватися епідемія. Наприклад, можна встановити, де хворий отримав інфекцію — у південно-американському чи скандинавському регіоні.

**Функції зовнішньої мембрани.** Зовнішня мембрана грамагативних бактерій виконує не тільки механічну, а й важливі фізіологічні функції. В її подвійний ліпідний шар, що складається з ліпиду А, полісахаридів і фосфоліпідів вбудовані білки, які пронизують цей шар наскрізь. Ці трансмембранні білки називаються **поринами**. Порины пропускають через мембрану гідрофільні низькомолекулярні речовини (до молекулярної маси близько 6 000).

Зовнішня мембрана прилягає до муреїнового шару і зв'язана з ним ліспротейнами. Очевидно, муреїновий шар є проникним для різних сполук. Проміжок між муреїном і плазматичною мембраною називають **периплазматичним простором**. У ньому містяться ферменти, в тому числі і деполімерази (протеїнази, нуклеази), периферійні білки і так звані зв'язувальні білки. Останні беруть участь у перенесенні деяких субстратів у цито-

плазму і є рецепторами хемотаксичних сигналів. Периплазматичний простір, очевидно, відіграє певну роль в осморегуляції.

**Дія лізоциму та пеніциліну.** Структура клітинної стінки та муреїну була встановлена у зв'язку з вивченням дії лізоциму та пеніциліну на бактерії. Відкритий англійським мікробіологом А. Флемінгом у 1922 р. лізоцим є бактерицидним ферментом, що міститься в слюнному білку, носовому слизі, в слизовій рідині. Лізоцим виділяли також з бактерій (*E. coli*, *Streptomyces*) і бактеріофагів. При дії лізоциму на суспензію грампозитивних бактерій спостерігали швидке її просвітлення. Так, *Micrococcus luteus* лізується (розчиняється) вже у концентрації 1 мкг лізоциму на 1 мл. Для лізису клітин *Bacillus megaterium* необхідною є концентрація 50 мкг/мл, а грамнегативні бактерії розчиняються тільки за наявності в суспензії ЕДТА.

Лізоцим розриває в муреїні глікозидний зв'язок між першим вуглецевим атомом N-ацетилмурамової кислоти і четвертим вуглецевим атомом N-ацетилглюкозаміну (див. рис. 5.3). При цьому полісахаридні ланцюги розщеплюються до дисахаридних фрагментів. Отже, лізоцим є N-ацетилмурамідазою.

Слід зазначити, що повному руйнуванню бактеріальних клітин можна запобігти, здійснюючи лізис в ізотонічному чи слабкогіпертонічному розчині (0,1–0,2 М сахарози). У цих умовах під дією лізоциму з клітин утворюються надзвичайно чутливі до осмотичних умов округлі **протопласти**. У гіпертонічних та ізотонічних розчинах протопласти стабільні, у гіпотонічних — лопаються. Протопластами слід називати тільки такі округлі клітини, в яких немає ніяких залишків клітинної стінки, тобто не можна виявити ні мурамової кислоти, ні специфічної для клітинної стінки діамінопіримідинової кислоти. Лізис клітинної стінки не супроводжується порушенням метаболізму.

Крім лізоциму, є ряд інших ферментів, що руйнують муреїновий каркас, наприклад, муреїнодепептидази.

Антибіотик пеніцилін діє переважно на грампозитивні бактерії (пневмококи та стафілококи), а також на деякі грамнегативні (гонококи, менінгококи, ентеробактерії), збиваючи їх. Але бактерицидний дії піддаються тільки клітини, які ростуть. Клітини, що перебувають у стані спокою, залишаються живими. Найцікавіший феномен, який спостерігається під дією пеніциліну, — це поява так званих *L-форм*, які утворюються з нормальних бактеріальних клітин у результаті незбалансованого росту

в довжину та ширину. При цьому вихідні палички збільшуються в об'ємі в багато разів. Якщо діяти пеніциліном на клітини, що ростуть, у гіпотонічному розчині вони лопаються. В ізо- та гіпертонічних розчинах палички перетворюються на шароподібні утворення, які називаються *Л формами* або *сферопластами*. Від протопластів вони відрізняються тим, що зберігають залишки клітинної стінки. Пеніцилін порушує процес утворення клітинної стінки.

### 5.1.3. Клітинні стінки еукаріот

Клітинні стінки дріжджів. До складу клітинних стінок дріжджів входять переважно полісахариди, структурними одиницями яких є глюкоза та маноза. Так, глюкан клітинних стінок хлібопекарських дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae*) складається із скелета, в якому залишки глюкози з'єднані  $\beta$ -1,6-зв'язками. Бокові ланцюги мають  $\beta$ -1,3-зв'язки. Кількість повторюваних одиниць у бокових ланцюгах може досягати семи, кількість структурних одиниць у молекулі глюкану може бути від кількох десятків до кількох тисяч. Скелет іншого полісахариду — манану, виділеного з клітинних стінок хлібопекарських дріжджів, містить залишки манози, з'єднані  $\alpha$ -1,6-зв'язками. Манан має багато розгалужень від лінійної структури, в них маноза з'єднана  $\alpha$ -1,2- та  $\alpha$ -1,3-зв'язками.

У клітинних стінках дріжджів *Candida albicans* скелет також складається із залишків манози, з'єднаних  $\alpha$ -1,6-зв'язками. У молекулах мананів деяких дріжджів одночасно зустрічаються  $\alpha$ - і  $\beta$ -зв'язки (*Pichia pastoris*). Деякі манани містять фосфор.

Крім гомополімерів, у клітинних стінках дріжджів присутні гетерополімери, що складаються з манози та галактози. Ці полісахариди називаються *галактомананами* (роду *Trichosporon*, *Torulopsis*). У складі клітинних стінок дріжджів виявлено також амінополісахарид хітин.

У клітинних стінках дріжджів містяться білки. Їх склад і локалізація в стінках досліджені недостатньо. Відомо, що у хлібопекарських дріжджів у складі білків переважають дикарбонові амінокислоти. З фракцій клітинних стінок деяких дріжджів були виділені манан-білкові фракції, в яких між полісахаридами та білками існує хімічний зв'язок.

Клітинні стінки грибів. У клітинних стінках грибів основним найпоширенішим полісахаридом є амінополісахарид хітин. Структурними елементами хітину є залишки N-ацетилглюкозаміну, з'єднані між собою  $\beta$ -1,4-зв'язками. Хітин у стіnce зв'язаний з речовинами неполісахаридної природи, головним чином, з білками та неорганічними солями. Полісахариди, що містять аміноцукри чи їх похідні, називаються *мукрополісахаридами*. Крім хітину, у клітинних стінках деяких грибів міститься його дезацетильоване похідне — хітозан. Хітин і хітозан зустрічаються також у клітинних стінках дріжджів.

Іншим найважливішим полісахаридом стінки грибів є целюлоза — полімер, що складається з  $\beta$ -1,4-глюкози. Целюлоза — найпоширеніша органічна речовина. Щороку синтезується близько  $10^{11}$  т целюлози. У клітинних стінках целюлоза міститься у вигляді мікрофібрил, кожна з яких має довжину до кількох тисяч нанометрів.

Як і в клітинах дріжджів, у клітинних стінках грибів містяться глюкани та манани. При розгляді компонентів клітинної стінки як одного з критеріїв для класифікації грибів за таксономічними рангами було виявлено, що багато з них в основі будови мають характерні пари полісахаридів. Так, гриби, що належать до *Hypochytridiomycetes*, містять целюлозу та хітин, *Chytridiomycetes* — хітин і  $\beta$ -глюкан, *Zygomycetes* — хітин і хітозан.

Крім вуглеводних компонентів, у клітинних стінках грибів присутні білки, що утворюють полісахарид-білкові комплекси.

## 5.2. МЕМБРАНИ МІКРОБНИХ КЛІТИН

### 5.2.1. Цитоплазматична мембрана

Клітина будь-якого організму містить різні мембрани, що розрізняються морфологічно та функціонально. Безпосередньо під клітинною стінкою розміщена *цитоплазматична мембрана* (плазматична мембрана, плазмалема).

Ця мембрана покриває цитоплазму. У житті клітини вона має велике значення, виконуючи роль не тільки структурного морфологічного компонента. Мембрана є осмотичним бар'єром організму, який регулює осмотичний тиск всередині клітини. Через мембрану здійснюється вибірково транспорт поживних

речовин із середовища в клітину та вихід із неї продуктів обміну — метаболітів. Мембрана є місцем, де відбувається синтез деяких клітинних структур, зокрема клітинної стінки та капсули. У мембрані локалізований і з мембраною асоційований ряд ферментів (ферменти перенесення електронів та окисного фосфорилювання, які в еукаріот містяться в мітохондріях, у бактерій локалізовані всередині чи на поверхні плазматичної мембрани; компоненти електрон-транспортного ланцюга — дихального ланцюга — містяться тільки в мембранах). У мембрані містяться весь фотосинтетичний апарат у пурпурових бактерій. Цілоком можливо, що на мембрані локалізується центр реплікації ДНК.

Мембрани можна виділити, якщо піддати осмотичному тиску протопласти, одержані за допомогою лізодому. Мембрани багаті на ліпіди, особливо фосфоліпіди (табл. 5.2). Маючи у складі всього 8–15 % сухої речовини клітини, мембрани містять 70–90 % усіх її ліпідів.

Таблиця 5.2

Склад мембран деяких бактерій

Компоненти	Вміст, % від сухої маси мембрани	
	<i>Micrococcus luteus</i>	Пурпурові бактерії
Ліпіди:	28–37	40–50
нейтральні	9	10–20
фосфоліпіди	28	30
Білки	50	50
Гексози	15–20	5–30

За своєю будовою мембрани мікробних, рослинних і тваринних клітин дуже подібні. Це дає підставу говорити про універсальну "елементарну мембрану".

Класичною, однією з перших моделей будови мембран, була *модель Данієллі—Давсона—Робертсона* (рис. 5.5). Мембрана складається з подвійного шару ліпідів, що містяться між тонкими шарами білка. Внутрішній шар мембрани складається з ліпідів, у яких, як відомо, є полярний кінець (гідрофільний), здатний до іонізації, та неполярний (гідрофобний), що за своєю хімічною природою являє собою вуглеводневий ланцюг. Ліпіди в мембрані орієнтовані вуглеводневими кінцями один до одного, полярними кінцями — назовні, тобто утворюють подвійний шар (бімолекулярний шар). З полярними кінцями стикується мономолекулярний шар неліпідної природи. Здебільшого це білок.



Рис. 5.5. Модель мембрани Данієллі—Давсона—Робертсона.

На схемі видно два шари ліпідів: водонерозчинні кінецьві групи (жирні кислоти) спрямовані одна до одної і всередину, а водорозчинні групи — назовні (середня частина схеми). Подвійний шар ліпідів розміщений між двома шарами білка (загущені смуги).

кулярний шар). З полярними кінцями стикується мономолекулярний шар неліпідної природи. Здебільшого це білок.

Вперше припущення про те, що в мембрані присутні білки, було висловлено англійськими вченими Дж.Ф. Данієллі та Х. Давсоном у 1935 р. для пояснення низького поверхневого натягу клітинних мембран. Оскільки на межі поділу м'ясло—вода повинен виникати великий поверхневий натяг, ці вчені прийшли до висновку, що гідрофобність ліпідних компонентів повинні компенсуватись якимсь гідрофільним білком. У 1959 р. на основі робіт американського вченого Дж.Д. Робертсона (за допомогою електронної мікроскопії) було виявлено два електроннощільних шари мембрани, розділених менш щільною ділянкою) була сформульована гіпотеза елементарної мембрани. Наявність електроннощільних зовнішніх шарів мембрани пояснювалась тим, що з гідрофільними поверхнями, що утворюються ліпідними молекулами, зв'язаний білок. Але проти цієї моделі свідчили результати електронно-мікроскопічних досліджень препаратів мембран, які були одержані методом заморожування-сколювання: виявилось, що білкові молекули розміщуються не тільки на поверхні мембрани, а є і такі, що пронизують її наскрізь. *Рідинно-мозаїчна модель* структури мембрани була запропонована у 1972 р.

Г. Ніколсоном та С.Д. Сінгером (рис. 5.6). Згідно з цією моделлю, що отримала в наш час загальне визнання, білки можна уявити як айсберги, що плавають у ліпідному морі.

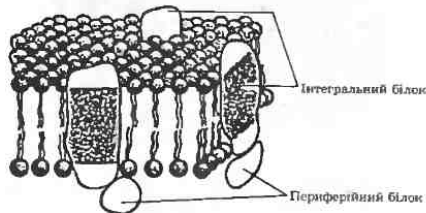


Рис. 5.6. Рідино-мозаїчна модель плазматичної мембрани Ніколсона—Сінгера.

У подвійний шар ліпідів занурені інтегральні білки. Периферійні білки розміщені на поверхні мембрани.

**Мембранні білки.** Існують два типи мембранних білків: *інтегральні* та *периферійні* (див. рис. 5.6).

Периферійні білки легко вимиваються з мембрани м'якими детергентами або навіть дистильованою водою, вони зв'язані з поверхнею мембрани. На відміну від периферійних інтегральні білки пронизують товщу мембрани наскрізь. Як правило, інтегральні білки перебувають у комплексі з ліпідом. Білки цих двох типів повинні різнитися між собою за розміщенням гідрофобних амінокислотних залишків. Поверхня периферійних білків гідрофільна (ці білки розчинні у воді), а гідрофобні амінокислотні залишки занурені всередину білкової глобули. В інтегральних білках гідрофобні залишки локалізовані на поверхні, забезпечуючи максимальну взаємодію з неполярним середовищем всередині мембрани. Проте у деяких інтегральних білків полярні групи теж розміщені на поверхні і взаємодіють з полярними групами ліпідів і з периферійними білками.

За біологічними функціями мембранні білки умовно поділяються на три групи:

з притаманною ферментативною активністю;

специфічно зв'язують різні речовини, необхідні для клітини, тобто білки, яким притаманна рецепторна функція (білки-перемеси);

структурні, але вони хімічно мало досліджені. Відомо, що всі вони слабкорозчинні у воді із-за наявності великих гідрофобних ділянок. Це створює умови для утворення міцних структур з ліпідами — ліпопротеїдів.

**Мембранні вуглеводи.** Вільних вуглеводів у клітинних мембранах мало, більшість вуглеводних залишків входить до складу гліколіпідів і глікопротеїдів. В їх складі виявлені одні й ті самі моносахариди: галактоза, глюкоза, N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозамін, фукоза, маноза, ксилоза.

**Ліпіди мембран.** Ліпіди представлені в основному фосфоліпідами та гліколіпідами. З фосфоліпідів найчастіше у бактерій зустрічаються фосфатидилгліцерин і фосфатидилетаноламін. Фосфатидилхолін, фосфатидилінозит зустрічаються рідше. Фосфоліпіди містять у своїй молекулі фосфор, зв'язаний двома ефірними зв'язками. До складу фосфоліпідів входить один сильний компонент — гліцерин, з яким з'єднані ефірним зв'язком дві жирні кислоти з довгим ланцюгом, а також фосфорамісна сполука. Наявність двох неполярних залишків жирних кислот у складі мембранних структур є їх характерною особливістю. У бактеріальних культур ліпіди, у тому числі й фосфоліпіди, містять переважно насичені жирні кислоти (хоча є і ненасичені). Присутні в мембранах і жирні кислоти з розгалуженим ланцюгом (особливо у сарцин і мікрококків).

Вважається, що однією з ознак, які відрізняють бактеріальні ліпіди від ліпідів інших мікроорганізмів, є відсутність стеринів у бактерій.

Крім ліпідів, що містять гліцерин, у деяких сполуках присутній стиленгліколь. Такі ліпіди називають *диольними*. У великих концентраціях диольні ліпіди руйнують мембрани. Але в дуже обмежених кількостях вони лише змінюють їх властивості, наприклад, підвищують проникність для невеличких іонів і молекул. Очевидно, клітини використовують цю властивість. Так, у період швидкого росту вони інтенсивно синтезують диольні ліпіди. Коли ріст сповільнюється, синтез диольних ліпідів припиняється.

Гліколіпідів є вуглеводними похідними ліпідів.

У структуру мембран входять також іони двовалентних металів. Передбачається, що вони утворюють з фосфоліпідами



хелатні комплекси і тим самим надають мембрані необхідної міцності за рахунок більшої компактності.

### 5.2.2. Мембранні утворення у прокаріот

У деяких бактерій мембрана охоплює цитоплазму без складок і загибів, тобто без *інвагінацій*. Але коли швидкість росту цитоплазматичної мембрани перевищує швидкість росту клітинної стінки, відбувається інвагінація мембрани, і виникають внутрішньоклітинні мембранні утворення різної складності.

Грамнегативні бактерії. У грамнегативних бактерій мембранні утворення розвинуті слабко і являють собою розміщені по периферії клітини загиби мембрани, наприклад, у *Escherichia coli* та *Proteus vulgaris* (рис. 5.7). Винятком є деякі групи грамнегативних бактерій (азотфіксатори, нітрифікатори, метаноокси-

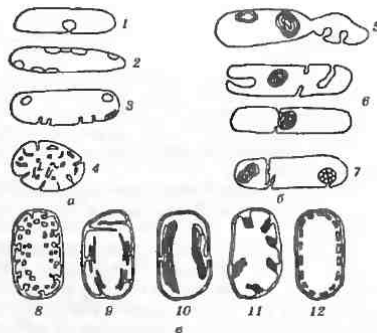


Рис. 5.7. Мембранні утворення грамнегативних (а, в) і грампозитивних (б) бактерій:

1 — *Escherichia coli*; 2 — *Proteus vulgaris*; 3 — *Brucella abortus*; 4 — *Azotobacter* sp.; 5 — *Corynebacterium diptheriae*; 6 — *Bacillus subtilis*; 7 — *Listeria monocytogenes*; 8–11 — фототрофні пурпурові бактерії; 12 — фототрофні зелені бактерії

нювальні та фототрофні бактерії), в яких мембранні утворення організовані складніше.

Так, у нітрифікуючих бактерій (*Nitrobacter*, *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*) мембранні утворення є пластинчастими (ламелярними), розміщені вони купками по периферії клітини, в центрі або біля одного з полюсів клітини.

За організацією внутрішньоцитоплазматичної мембрани метаноокиснювальні бактерії поділені на два типи. У клітин *першого типу* мембранні утворення мають форму здавлених бульбашок, тісно розміщених паралельно одна одній. Це паличкококова група бактерій (*Methylobacter*, *Methylococcus*). У вибродіних метаноокиснювальних мікроорганізмів (*Methylosinus*, *Methylocystis*) є система спарених мембран, що проходять по периферії клітини паралельно цитоплазматичній мембрані — *другий тип* клітин. Припускають, що у метанотрофних бактерій функціонально мембранні утворення є відповідальними за окиснення метану, оскільки непрямыми дослідями встановлено, що вони відіграють певну роль у дихальній активності клітин. Але прямих доказів цього немає. Цілком імовірно, що велика поверхня цих мембранних структур забезпечує необхідний рівень дихальних і фосфорильовальних процесів у клітинах.

*Тилакоїди та хроматофори* є аналогами хлоропластів у рослин і характерні для фототрофних бактерій. Такі фотосинтетичні мембрани аналогічні за будовою та хімічним складом цитоплазматичній мембрані, але містять пігменти, що поглинають світло (бактеріохлорофіли, каротіноїди), а також компоненти фотосинтетичного електрон-транспортного ланцюга і фосфорильовальної системи.

Грампозитивні бактерії. У грампозитивних бактерій мембранні утворення добре розвинуті, складніше організовані і утворюють внутрішньоклітинні мембранні структури, які називаються *мезосомами*. Мезосоми вперше були описані у *Bacillus cereus*. За морфологічними особливостями розрізняють ламелярні (пластинчасті), везикулярні (мають форму бульбашок), тубулярні (трубчасті) мезосоми. Часто в бактеріальній клітині спостерігаються мезосоми змішаного типу. Мезосоми розглядають як ділянки проникнення в клітину трансформувальної ДНК, прикріплення плазмід, місце синтезу екзоферментів, а також як інертне утворення, що виникає за надлишку мембранного матеріалу. Існує припущення, що мезосоми беруть участь у клітинному поділі.

### 5.2.3. Мембрани еукаріот

Мембрани в еукаріот являють собою складнішу систему, ніж у прокаріотів. Для еукаріотичної клітини характерним є поділ цитоплазми на ряд відокремлених просторів. Ця **компартименталізація** частково створюється в результаті інвагінації плазматичної мембрани з утворенням цистери і бульбашок. Але, крім того, в цитоплазмі еукаріот є органели (мітохондрії, ядро), які з усіх боків оточені мембранами.

До мембранних утворень еукаріот належать *плазмалема*, *нуклеолема* (ядерна мембрана, що оточує ядро), *мітохондріальна мембрана* (оточує мітохондрії), *ендоплазматичний ретикулум*, *апарат Гольджі* (діктосоми), *вакуолярна мембрана* (рис. 5.8).

**Ядерна мембрана** під електронним мікроскопом виглядає як подвійна мембрана, пронизана порами. Про ферменти, пов'язані з ядерною мембраною, відомо мало, хоча припускають, що в мембранах є канали, через які можуть проникати молекули РНК і білків. В еукаріотичній клітині ядро є основним, але не єдиним носієм генетичної інформації. Частина такої інформації міститься в ДНК мітохондрій.

Мітохондрії відмежовані від цитоплазми двома мембранами. Внутрішня мембрана утворює складки — *кристи*, які збільшують її активну поверхню. Внутрішня мембрана містить компоненти електрон-транспортного ланцюга та *АТФ-синтазу* (фермент, який бере участь у синтезі АТФ). Більша частина ферментів циклу трикарбонових кислот також міститься в мітохондріях.

З інвагінацій плазматичної мембрани утворюється *ендоплазматичний ретикулум (ЕР)*. Зв'язок між ЕР і іншими органелами клітини не вивчений, але існує неперервність між ЕР, зовнішньою мембраною мітохондрій та плазматичною мембраною. Частина ЕР утворює зовнішню ядерну мембрану і таким чином оточує ядро. Частина мембран ЕР обсапана дуже маленькими гранулами — *рибосомами*. Це так званий *гранулярний ЕР*. На рибосомах здійснюється синтез білка. ЕР бере участь також в утворенні бульбашок, що містяться в клітині.

Вважається, що *апарат Гольджі* характерний для тваринних клітин, в аналогічні структури в рослинних клітинах називаються *діктисомами*. Мікологи розглядають апарат Гольджі та діктисоми як одне й те саме мембранне утворення, а самі терміни — як синоніми. Мікробіологи-дріжджовики стверджу-

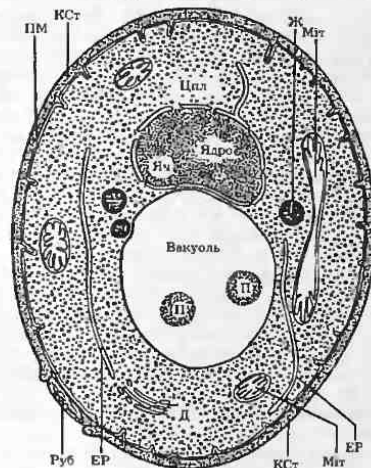


Рис. 5.8. Схематичний поперечний розріз дріжджової клітини:

Д — діктисома; Ж — жирилі; КСт — клітинна стінка; Мит — мітохондрія; П — гранули поліфосфату; ПМ — плазматична мембрана; Руб — рибосоми, який залишилися після брунькування; Цпл — цитоплазма; ЕР — ендоплазматичний ретикулум; Яч — ядречко

ють, що в дріжджових клітинах присутні саме діктисоми, а питання про наявність у дріжджів істинного апарату Гольджі вважають дискусійним.

Апарат Гольджі (діктисоми), а також ЕР забезпечують секрацію різних продуктів, зокрема ферментів. Ферменти синтезуються на цистернах (бульбашках) і накопичуються в них. З часом така бульбашка відділяється, переміщується до плазматичної мембрани, зливається з нею, при цьому вливається весь вміст бульбашки назовні. Цей процес має назву *екзоцитоз*.

**Ендоситоз.** Для еукаріотичної клітини характерна здатність поглинати їжу у вигляді розчинених речовин або оформлених твердих частин. Загальновідомим прикладом поглинання твердих частин є *фагоцитоз* — поглинання їх лейкоцитами крові або амебами. Якщо відбувається поглинання рідких поживних речовин, то це явище називають *піноцитозом*. Обидва способи поглинання позаклітинного матеріалу об'єднують під назвою *ендоцитоз*. Прокаріоти до ендоситозу не здатні. У процесі піноцитозу безпосередню участь бере цитоплазматична мембрана. Так, у дріжджів вона може активно поглинати краплини ліпідів, білків, вуглеводів, що проникли в периплазматичний простір. При цьому утворюється бульбашка, яка, вірогідно, переносить захоплені поживні речовини до цитоплазми до вакуолі.

Здатність еукаріот захоплювати тверді часточки, в тому числі й живі клітини, має фундаментальне біологічне значення. В ендоситозі можна розглянути передумови ендосимбіозу та його механізм. Симбіоз — це взаємовигідне співіснування організмів. Здатність еукаріотичних клітин набувати ендосимбіотів говорить на користь теорії про симбіотичне походження мітохондрій і хлоропластів.

**Ендосимбіотична гіпотеза.** Клітинні органи еукаріот мають багато спільного з прокаріотичними клітинами. Згідно з симбіотичною гіпотезою, мітохондрії походять від безбарвних вербних бактерій, а хлоропласти (в рослинних клітинах) — від ціанобактерій (одноклітинних синьо-зелених водоростей, які є прокаріотами).

### 5.3. ВНУТРІШНЬОКЛІТИННІ СТРУКТУРИ

**Рибосоми.** Рибосоми є місцем синтезу білка. На електронних мікрофотографіях вони мають вигляд частинок, що лежать у цитоплазмі. Рибосоми бактерій мають розміри  $16 \times 18$  нм. Приблизно 80–85 % всієї бактеріальної РНК міститься в рибосомах. Складаються з білка (35–40 %) та РНК (60–65 %). Оскільки інтактні (цілі, незруйновані) рибосоми бактерій при ультратрентрифугуванні осідають із швидкістю близько 70 одиниць Сведберга (S), їх називають 70S-рибосомами. Цитоплазматичні рибосоми еукаріот більші — 80S. З мітохондрій еукаріот (наприклад, з мітохондрій дріжджів) можна також виділити рибосоми, які за розмірами схожі на бактеріальні.

Бактеріальна 70S-рибосома складається з двох субодиниць — 30S та 50S-субодиниць (рис. 5.9). Бактеріальна клітина містить від 5 000 до 50 000 рибосом. Їх кількість тим більша, чим швидше росте клітина. Під час активного синтезу білка на електронних мікрофотографіях можна бачити правильні ланцюжки рибосом. Це рибосоми, нанизані, як намисто, на ланцюги матричної РНК; їх називають *полірибосомами* або *полісомами*.

Різниця між рибосомами бактерій (70S) та еукаріот (80S) має вирішальне значення для боротьби з інфекційними хворобами. Деякі антибіотики частково чи повністю пригнічують синтез білка, який відбувається на 70S-рибосомах, і не порушують функцій 80S-рибосом.

**Вакуолі.** *Газові вакуолі (аеросоми)* характерні для водних бактерій, особливо пурпурових і зелених сіркобактерій, мешканців мулів, окремих ґрунтових бактерій. Газові вакуолі складаються з газових бульбашок, розміщених паралельними рядами, утворюючи стільниковоподібну структуру. Газові бульбашки —

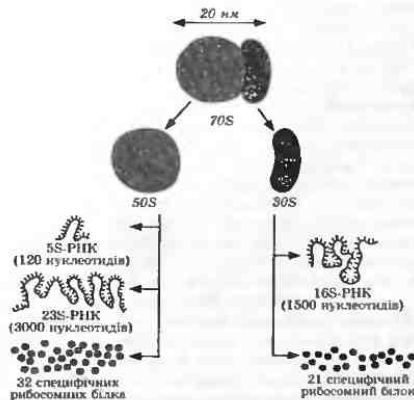


Рис. 5.9. Схема будови бактеріальної рибосоми

це порожнисті циліндри, оточені одношаровою білковою мембраною. У цій білковій мембрані гідрофобні амінокислоти повернуті всередину циліндра, а гідрофільні — назовні. Таке розміщення амінокислот перешкоджає проникненню води і бульбашку. Циліндри заповнені газом, склад якого є аналогічним складу газу навколишнього середовища. Аеросоми є регуляторами плавучості бактерій. Вони дають можливість бактеріям, які не мають джгутиків, здійснювати вертикальний рух у водоймах і капілярах ґрунту і таким чином займати найвигідніше положення відносно джерела світла, концентрації розчиненого кисню і поживних речовин, тобто газові вакуолі у бактерій мають пристосувальне значення.

Щодо еукаріотних клітин, то вони містять велику вакуоль, оточену одношаровою мембраною. Її функції точно не встановлені. Показано, що в ній містяться гідролітичні ферменти, поліфосфати, ліпіди, низькомолекулярні клітинні інтермедіати та іони металів. Ймовірно, що вакуоль є резервуаром для зберігання поживних речовин і гідролітичних ферментів.

**Карбоксисоми.** Ці структури виявлені в клітинах ціанобактерій, деяких пурпурових бактерій, нітрифікуючих бактерій. Вони являють собою чотири- чи шестигранні виключення діаметром до 500 нм, оточені одношаровою білковою мембраною, містять ферменти фіксації вуглекислого газу в циклі Кальвіна.

**Магнітосоми.** Виявлені в клітинах бактерій, яким притаманний магнітотаксис. Це частинки  $Fe_3O_4$ , оточені мембраною, різні за формою, кількістю і характером розміщення в клітні.

**Запасні речовини.** У багатьох мікроорганізмів у певних умовах середовища відкладаються речовини, які можна розглядати як запасні — **полісахариди, жири, поліфосфати та сірка**. Ці речовини накопичуються, якщо в поживному середовищі містяться певні вхідні сполуки, але разом з тим ріст мікроорганізмів обмежений чи взагалі неможливий із-за браку окремих компонентів живлення чи присутності інгібіторів. Запасні речовини містяться в клітині в осмотично інертній формі — вони нерозчинні у воді. В умовах, сприятливих для росту, колін в цих запасних речовинах виникає потреба, вони знову залучаються до метаболізму. Завжди полісахариди, нейтральні жири, полі- $\beta$ -гідроксимасляна кислота можуть бути джерелами вуглецю і енергії, тому за відсутності зовнішніх джерел енергії вони можуть продовжити термін існування клітини, а у спорутоутворювальних видів створити

умови для утворення спор навіть за відсутності екзогенних субстратів. Поліфосфати можуть бути резервним джерелом фосфору, а сірка — потенційним донором електронів.

У деяких мікроорганізмів за допомогою кольорової реакції з розчином Люголю вдається ідентифікувати крохмаль (силе забарвлення) або глікоген (коричневе забарвлення). Запасні полісахариди, на відміну від полісахаридів клітинної стінки, утворюються з  $\alpha$ -глюкози, молекули глюкози з'єднані 1,4- $\alpha$ -в'язками. Завдяки  $\alpha$ -в'язкам поліглюкозні ланцюги не витягують в довжину, а закручені гвинтоподібно. Крохмалеподібна сполука *гранулоза* є специфічною запасною речовиною у бактерій роду *Clostridium*. Глікоген (тваринний крохмаль) схожий на амлопектин, але його ланцюги ще більш розгалужені (за рахунок утворення 1,6-в'язків). У бактерій глікоген зустрічається частіше, ніж крохмаль. Він також виявлений у дріжджів і грибів.

У клітинах мікроорганізмів часто зустрічаються гранули та краплини жиру. Їх можна фарбувати ліпофільними барвниками — суданом III та суданом чорним, при цьому вони стають видимими через мікроскоп. Без забарвлення їх можна побачити через мікроскоп завдяки тому, що вони сильно заломлюють світло.

Гранули багатьох бактерій складаються з полі- $\beta$ -гідроксимасляної кислоти. Це поліефір, що містить близько 60 залишків  $\beta$ -гідроксипропіонату. Частка цієї речовини в сухій біомасі може досягати 80 %. Полі- $\beta$ -гідроксимасляну кислоту утворюють аеробні бактерії, а також ціанобактерії та анаеробні фототрофні бактерії. Утворення полі- $\beta$ -гідроксимасляної кислоти спостерігається у аеробів в умовах браку кисню.

**Нейтральні жири** (тригліцериди) в особливо великих кількостях відкладаються у вакуолях дріжджів і грибів. Воски (складні ефіри жирних кислот і спиртів з довгим ланцюгом) виявлені у мікобактерій (можуть містити до 40 % восків), нокардій та актиноміцетів. Вміст запасних жирів визначається складом поживного середовища (високим співвідношенням C/N), і ці жири можуть бути виділені безпосередньо з клітин.

Гриби, дріжджі, багато бактерій і зелені водорості здатні накопичувати фосфорну кислоту у вигляді гранул поліфосфату. Такі гранули вперше були описані у бактерій *Spirillum volutans*, тому їх часто називають волотининовими гранулами (волотинином).

У багатьох бактерій, які окиснюють сульфід до сульфату, сірка тимчасово зберігається у вигляді кульок, що сильно залом-



люють світло. Кількість сірки, яка може накопичитись, залежить від вмісту сірководню в навколишньому середовищі: за відсутності сірководню сірка окиснюється до сульфату. Для аеробних сіркових бактерій сірка є джерелом енергії, а для анаеробних фототрофних пурпурових бактерій — донором електронів.

**Нуклеоїд.** Питання про наявність ядра у бактерій було дискусійним упродовж багатьох десятиліть. Малі розміри клітин, недосконалість методів дослідження утруднювало виявлення ядерних структур у бактерій, хоча не було сумнівів щодо наявності у них складового апарату, оскільки при розмноженні клітини одного виду бактерій давали нащадків того самого виду. Сучасні електронно-мікроскопічні та генетичні дослідження дали змогу встановити, що бактерії мають структури, аналогічні ядрам клітин еукаріот, але відрізняються від них рядом особливостей:

- 1) ядра бактерій не мають ядерної оболонки (мембрани), і ДНК перебуває в безпосередньому контакті з цитоплазмикою;
- 2) відсутній поділ на хромосоми, і нитка ДНК являє собою аналог хромосоми еукаріот і називається **бактеріальною хромосомою** (в клітині може бути кілька її копій);
- 3) відсутній мейоз і мітоз.

У зв'язку з цим ядерний апарат бактерій називають **бактеріальним ядром**, або **нуклеоїдом**. Встановлено, що бактеріальна хромосома має форму замкнутого кільця. Це гігантська молекула ДНК з молекулярною масою  $10^9$  дальтон. Вона має різну довжину у різних бактерій: у мікоплазм — 0,25, у ціанобактерій — до 3 мм. У клітинах прокаріот може бути кілька нуклеоїдів і кілька копій хромосом (у *Bacillus subtilis* — від 2 до 9 хромосом у кількох нуклеоїдах, у *Azotobacter vinelandii* — близько 40 хромосом в одному нуклеоїді).

Хромосоми бактерій — це високоупорядковані структури двох типів: зв'язані з елементами оболонки та вільні з коефіцієнтами седиментації відповідно 3200–7000S та 1600–2000S. ДНК у цих структурах перебуває в суперспіралізованому стані і утворює 20–140 петель, з'єднаних з щільною центральною ділянкою, яка складається з РНК і є відповідальною за підтримання компактної форми (рис. 5.10). Хромосома бактерій завжди зв'язана з мембраною (кількість місць зв'язку може досягти 20 і більше) безпосередньо із специфічними мембранними білками або через рибосоми, зв'язані з мембраною.

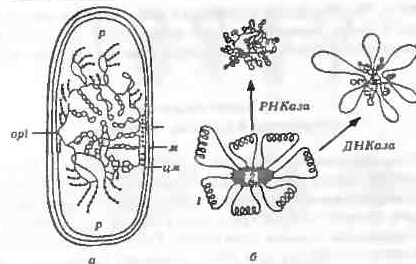


Рис. 5.10. Модель організації нуклеоїду (а) та будова компактної хромосоми *Escherichia coli* (б):

1 — петлі хромосоми; 2 — РНК, що з'єднує петлі; ori — точка origin на хромосомі бактерії; р — рибосоми; м — зовнішня мембрана; м — мурейн; цм — цитоплазматична мембрана.

На відміну від еукаріот, у прокаріот не спостерігається суттєвих змін у стані нуклеоїду в процесі клітинного циклу, за винятком його ущільнення перед спороутворенням. У бактеріальній клітині синтез ДНК відбувається безперервно і приблизно 1–3 % сухої маси клітини припадає на ДНК.

#### 5.4. ЕНДОСПОРИ ТА ІНШІ ФОРМИ СПОКОЮ У БАКТЕРІЙ

До утворення спор здатна лише невелика група бактерій. Велике значення спор пов'язано з їх термостійкістю. У той час, як майже вся решта бактерій, а також вегетативні клітини спороутворювальних видів гинуть при  $80^{\circ}\text{C}$  (температура пастеризації) через 10 хв, терморезистентні спори витримують кип'ятіння впродовж кількох годин. Трудомістка та дорога техніка стерилізації (знезараження) розрахована на знищення спор. З іншого боку, терморезистентність спор є своєрідною можливістю вибіркового збагачення культур спороутворювальних форм. ґрунт чи інший матеріал (mul, сіно, вода) прогрівають упродовж 10 хв

при 80 °С. Така операція призводить до загибелі вегетативних клітин, і тільки терморезистентні спори залишаються життєздатними і проростають у відповідному поживному середовищі.

#### 5.4.1. Характеристика спороутворювальних бактерій

Спороутворювальні бактерії, за одним винятком, належать до паличкоподібних грампозитивних бактерій. Грамнегативними спороутворювальними бактеріями є представники роду *Desulfotomaculum*. Описано понад 10 родів бактерій, які утворюють ендоспори, наприклад, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporolactobacillus*, *Oscillospora* та ін. Більшість із цих бактерій є рухливими завдяки перитрихально розміщеним джгутикам. Бактерії, які належать до роду *Bacillus*, є строгими аеробами або факультативними аеробами. Роди *Clostridium* і *Desulfotomaculum* об'єднують анаеробні бактерії, здатні до утворення спор. Клостридії одержують енергію за рахунок бродіння, види *Desulfotomaculum* — шляхом анаеробного дихання. *Sporolactobacillus* належить до молочнокислих бактерій. *Sporosarcina* має сферичні клітини, але за своїми фізіологічними ознаками належить до бацил.

Характерною особливістю спороутворювальних бактерій є низький вміст ГЦ (гуанін + цитозин) у ДНК клітин. Так, у клостридій ДНК містить від 22 до 27 % ГЦ.

Спори різних видів бактерій розрізняються за формою, розміром, положенням у клітині (рис. 5.11). За формою вони можуть бути круглими, овальними. Поверхня спор буває гладенькою, хвилястою, остеподібною та ін. Спори можуть займати таке положення в клітині:

1) **бацилярне**, коли спора локалізується в клітині центрально, ексцентровано чи термінально, і при цьому клітина не змінює своєї форми. Такі клітини називають бацилами (*Bacillus*);

2) **клостридіальне**, коли при формуванні спори клітина змінює свою форму, набуваючи вигляду човника чи веретена. Такі клітини називають клостридіями (*Clostridium*, від грец. *closter* — веретено);

3) **плектридіальне**, коли спора локалізується термінально, у місці її розміщення клітина розширюється і набуває форми ракетки.

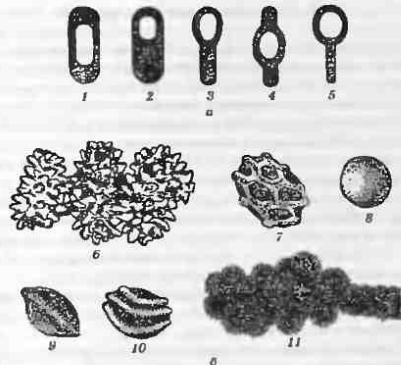


Рис. 5.11. Розміщення спор у клітині (а) і поверхня спор (б): 1 — *Bacillus megaterium*; 2 — *B. thuringiensis*; 3 — *Clostridium polymyxa*; 4 — *C. butyricum*; 5 — *C. tetani*; 6 — остеподібна; 7 — з полігвальними скрутокостями; 8 — гладенька; 9 та 10 — хвиляста; 11 — остеподібна у ковдіеспор актиноміцетів

Клостридіальний і плектридіальний типи розміщення спор властиві в основному видам роду *Clostridium* і нерідко одночасно зустрічаються в культурі одного виду.

Виявлення ендоспор. При мікроскопічному дослідженні спори видні завдяки своєму високому показнику заломлення світла — такому самому, як у зневодненого білка. Це вказує на те, що в спорах велика кількість багатого білкового матеріалу сконцентрована в малому об'ємі. Спора містить майже всю суху речовину материнської клітини, але займає в 10 разів менший об'єм. У сумнівних випадках виявити в клітинах істинні ендоспори можна за допомогою спеціального фарбування. Якщо препарат бактерій, фіксований нагріванням, прокип'ятити з карболовим розчином фуксину, то спори міцно зв'язують барвник і не знебарвлюються навіть при обробці етанолом чи 1М оцтовою кислотою (в умовах, коли решта вмісту клітини стає безбарвною).

### 5.4.2. Спороутворення (споруляція)

Спори утворюються всередині бактеріальної клітини. Цей процес починається з накопчення білкового матеріалу, тому показник заломлення у місці утворення спори збільшується. При цьому відбувається споживання запасних речовин (полі- $\beta$ -гидроксимасляної кислоти у аеробів і полісахаридів у анаеробів). Упродовж перших 5 год спороутворення значна частина білків материнської клітини розкладається. При цьому утворюється специфічна для спор речовина — **дипіколінова кислота**, яка не зустрічається у вегетативних клітинах. У ході синтезу дипіколінової кислоти відбувається поглинання іонів кальцію; очевидно, в арих спорах ця кислота міститься у вигляді хелату з кальцієм і може становити 10–15 % сухої речовини спор. Дипіколінова кислота міститься тільки в термореzистентних спорах.

Спороутворення є одним з найскладніших процесів диференціації бактеріальної клітини. Воно починається з особливого нерівномірного поділу клітини (рис. 5.12).

У результаті інвагінації цитоплазматичної мембрани частини протопласта відділяється від материнської клітини. Цей протопласт містить частину ядерного матеріалу — один геном. Утворення клітинної стінки між обома протопластами (як за звичайного поділу клітини) не відбувається. Замість цього протопласт

майбутньої спори оточується, мовби обростає, плазматичною мембраною материнської клітини. В результаті навкруги протопласта розміщуються дві плазматичні мембрани і кожна з них бере участь у синтезі стінки спори. Мембрана протопласта спори синтезує назовні від себе стінку зародкової клітини, а мембрана, яка походить від материнської клітини, синтезує всередину кору спори (**кортекс**). Кортекс складається з багатощарового пептидогліканового осова, який відрізняється від каркаса стінок вегетативної клітини ступенем зшивання. Зовнішню оболонку спори утворює материнська клітина. Ця оболонка складається з поліпептидів. Материнська клітина утворює також ще один додатковий поліпептидний шар — **екзоспорій**, який оточує спору у вигляді особливого чохла. Екзоспорій міститься тільки у небагатьох бактерій (наприклад у *Bacillus cereus*).

**Індукція спороутворення.** Спори не є обов'язковою стадією життєвого циклу бактерій. За сприятливих умов бактерії можуть не обмежений час розмножуватися поділом, як вегетативні клітини. Утворення спор починається лише тоді, коли не вистачає поживних речовин або коли в надлишку накопичуються продукти обміну. Інакше кажучи, воно відбувається лише тоді, коли для цього створюються певні умови. Висихання не стимулює спороутворення. Якщо помістити вегетативні клітини в дистильовану воду, можна спостерігати "**ендотрофну споруляцію**", тобто утворення спор за рахунок внутрішньоклітинних запасних речовин. У таких випадках утворення спор, очевидно, викликане браком екзогенного субстрату. Індукція спороутворення відбувається впродовж декількох годин. Якщо, наприклад, до суспензії вегетативних клітин *Bacillus cereus* у перші 5 год після внесення їх у дистильовану воду додати глюкозу, то утворення спор припиниться: додавання субстрату пригнічує споруляцію. Але якщо глюкозу додати пізніше, ніж через 6 год, пригнічення спороутворення не відбувається. Індукція спороутворення продовжується, і вже через 10–13 год після внесення у воду близько 90 % клітин утворюють спори. Отже, споруляція регулюється зовнішніми факторами.

Кількість клітин, що утворюють спори, у багатьох випадках збільшується після додавання в середовище солей марганцю.

Здатність утворювати ендоспори поступово атруюється за багаторазових пересівів вегетативних клітин. Оскільки суспензія спороутворювальних бактерій містить і спори, і вегета-

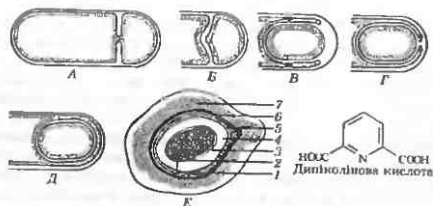


Рис. 5.12. Спороутворення і будова зрілої спори:

А, Б — процес відділення протопласта спори; В, Г, Д — утворення передспори; Е — зріла спора; 1 — цитоплазма; 2 — плазматична мембрана; 3 — клітинна стінка зародкової клітини; 4 — кора спори; 5, 6 — відносно внутрішньої зовнішня оболонка спори; 7 — екзоспорій

тивні клітини, перед кожним пересіванням культуру, як правило, піддають короткочасному кип'ятінню. Це сприяє зберіганню чи підвищеній здатності клітин утворювати спори.

**Властивості зрілих спор.** Спори вивільнюються при автолізі материнських клітин. Зрілі спори не виявляють ніякої метаболічної активності. Вони надзвичайно стійкі до дії високих температур, різного роду опроміненнь, хімічних агентів. Термореізистентність зумовлена низьким вмістом води у спорах — 15 % (стільки само, скільки в сухому казеїні або у вонні) і приблизно пропорційна вмісту в них дипіколінової кислоти.

**Проростання спор.** У відповідних сприятливих умовах більшість спор проростають. Відповідне попереднє оброблення, певні умови зберігання та прогрівання можуть підвищити "схожість" спор — збільшити процент проростання. У випадку *Bacillus subtilis* оптимальними умовами для стимуляції проростання спор вважають семиденний період спокою і п'ятихвилинне прогрівання у воді при 60 °C. Інші спори можуть бути активовані короткочасним кип'ятінням (10 хв, 100 °C). Теплове оброблення спор повинно проводитися безпосередньо перед висіванням, оскільки процес активації є зворотним.

Проростання спор передусь поглинання ними води та набухання. Для проростання активованих спор у ряді випадків необхідною є наявність глюкози, амінокислот, нуклеозидів та інших речовин. У ході проростання відбуваються глибокі фізіологічні зміни: дихання та ферментативна активність швидко підвищуються, починається виділення амінокислот, дипіколінової кислоти та пептидів. У процесі проростання втрати сухої речовини досягають 25–30 %. Під час проростання спори втрачають термостійкість. Ростава трубка, яка виходить із спори, оточена дуже тонкою, не до кінця сформованою клітинною стінкою, так що в протопласт може проникати навіть ДНК. Ростава трубка може утворюватися як у полярному, так і латеральному положенні (рис. 5.13). В одному випадку оболонка спори при цьому розривається, в іншому — ростова трубка її проколює.

**Тривалість життя спор.** Бактерії у вигляді спор можуть тривалий час перебувати у стані анабіозу. Так, у зразках ґрунту, що зберігалися 50–100 років, були виявлені спори бацил. За даними такого роду експериментів, у сухому ґрунті за 50 років зберігання до 90 % спор втрачають життєздатність. Але при цьому 1 т сухого ґрунту навіть через 1000 років міститиме життєздатні спори.

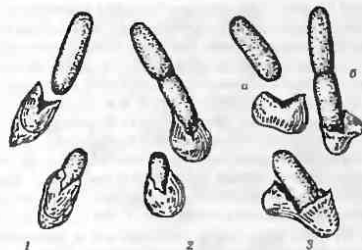


Рис. 5.13. Проростання спор:

1, 2 — полярні; 3 — латеральні; а — *Bacillus cereus*;  
б — *Bacillus subtilis*

У сухому стані багато бактерій (якщо не всі з них) упродовж багатьох років зберігають життєздатність. Для консервації бактерій у колекціях культур вегетативні клітини, як правило, піддають ліофільному висушуванню (висушуванню з замороженого стану) і зберігають при кімнатній температурі або низьких температурах у вакуумі. Бактерії, які не витримують ліофілізації, зберігаються упродовж багатьох років у вигляді суспензій при температурі рідкого азоту.

#### 5.4.3. Інші форми спокою (цисти, екзоспори, мікроспори)

Крім ендоспор, у деяких бактерій спостерігається утворення інших форм спокою — екзоспор і цист. **Екзоспори** утворюють метаноокиснювальні бактерії роду *Methylosinus* і фототрофна пурпурова бактерія *Rhodospirillum rubrum*. Екзоспори утворюються брунькуванням материнської клітини. Екзоспори значно менш термостійкі, ніж ендоспори, але стійкіші до висушування, ультрафіолетового опромінення, ніж вегетативні клітини. Екзоспори не містять дипіколінової кислоти, вони не стійкі до дії лізоциму, погано фарбуються різними барвниками.

Деякі бактерії утворюють купеподібні товстостінні клітини — *цисти*. Цисти містять цитоплазму з нуклеоїдом (і гранулами полі- $\beta$ -гидроксимасляної кислоти у *Azotobacter vinelandii*), оточену цитоплазматичною мембраною та двома оболонками. Виникають у старих культурах за відсутності поживних ресурсів, при цьому в цисту перетворюється вся клітина. На відміну від вегетативних клітин, цисти містять багато ліпідів. Цисти стійкіші до висушування, механічних пошкоджень, дії лізоциму, ніж вегетативні клітини, але малорезистентні до температури. У сприятливих умовах (за наявності джерел вуглецю) цисти проростають. Цисти утворюють бактерії родів *Azotobacter*, *Bdellovibrio*, *Methylococcus*, спірохети. У метанотрофних бактерій роду *Methylococcus* цисти утворюються в несприятливих умовах, наприклад, за браку кисню. У багатьох випадках цистоутворення у цих бактерій супроводжується зміною пігментації клітин від жовтого до темно-коричневого кольору. Культура, яка не утворює цист, залишається кремовато-білою. Але у *Methylococcus thermophilus* цистоутворення не завжди супроводжується посиленням пігментації.

У міксобактерій утворення цист, які називаються *мікроспорами*, є закономірною стадією їх життєвого циклу. Вегетативні клітини міксобактерій після закінчення стадії активного бінарного поділу за умов дефіциту джерел живлення збираються разом у масу і формують різної форми *плодові тіла* (рис. 5.14), які складаються із слизу та мікроспор. При цьому тільки частина клітин перетворюється на мікроспори, решта гине, лізується і є будівельним матеріалом для утворення плодових тіл.

Мікроспори мало відрізняються від вегетативних клітин, але є такі, що сильно різняться за формою, стійкістю до висушування, УФ-опромінення, температури, наявністю додаткових оболонок. Такі мікроспори називаються *мікрочицтами*.

У деяких прокариот спори є одночасно і формами спокою, і репродуктивними системами. У актиноміцетів родів *Thermoactinomyces* та *Actinobifida* спостерігається ендогенне утворення спор, але у більшості родів актиноміцетів спори формуються екзогенно — артроспори, конідіоспори та ін. *Артроспори* формуються виникненням поперечних перетинок у гіфх з відділенням сегментів так, що утворюється ланцюжок спор. *Конідіоспори* утворюються на поверхні особливих гіфів конідіеносців, або конідієфорів. *Спорангіоспори* — спори, що формуються в спо-

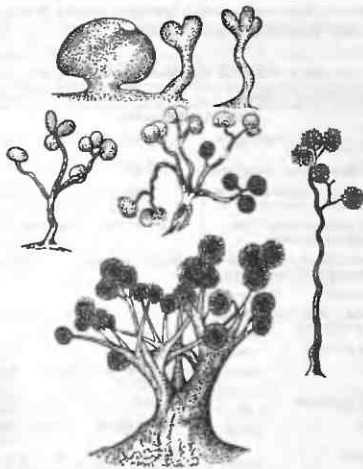


Рис. 5.14. Плодові тіла міксобактерій

рангіях. Оскільки спорангіоспори утворюються всередині спорангіїв, їх називають ендогенними. Спорангії утворюються на гіфх — спорангіофорах.

Форми спокою прокариот характеризуються низьким рівнем метаболічної активності, підвищеною стійкістю до дії несприятливих факторів, здатністю тривалий час перебувати у життєздатному стані.

## 5.5. ВІДМІННОСТІ ПРОКАРІОТ ТА ЕУКАРІОТ

Структурні, генетичні, функціональні та хімічні відмінності прокариот та еукаріот (підсумкові дані), а також харак-



терії ознаки грамдодативних і грамнегативних бактерій (підсумкові дані) наведені у табл. 5.3–5.5.

Таблиця 5.3

Структурні та генетичні відмінності прокаріот та еукаріот

Особливості організації	Прокаріоти	Еукаріоти
<b>Структурні відмінності</b>		
Замкнуті вторинні порожнини, утворені мембранами	Немає	Є
Ендоплазматичний ретикулум	Немає	Є
Розмір цитоплазматичних рибосом (константа седиментації)	70S	80S
Розмір рибосомальних РНК (константа седиментації)	5S; 16S; 23S	5S; 5.8S; 18S; 28S
Частина рибосом асоційована з цитоплазматичною мембраною	Спостерігається	Немає
Мітохондрії	Немає	Є
Органели, оточені подвійною мембраною	Є	Немає
Апарат Гольджі	Немає	Є
Ядро	Є аналог ядра — нуклеоїд	Є
Ядерна мембрана	Немає	Є
Вакуолі	Зустрічаються рідко	Зустрічаються часто
Джгутики	Складаються з однієї чи кількох фібрил	Кожен джгутик складається з 20 фібрил, зібраних у групи $2 \times 9 + 2$
Величина клітини в найменшому вимірі (ширина або діаметр)	Як правило, 0,2–2,0 мкм	Як правило, > 2,0 мкм
<b>Генетичні відмінності</b>		
Організація ядерної ДНК	ДНК не відділена від цитоплазми мембраною	Є ядерна оболонка
Хромосома	Одна кільцева (у клітині може бути кілька її копій)	Відрізки
Мітохондрії	Немає	Є
Мейоз	Немає	Є
Цитоплазматична ДНК	Плазміди (не оточені мембраною)	Мітохондрії, хлоропласти, апарат Гольджі

Таблиця 5.4

Функціональні та хімічні відмінності прокаріот та еукаріот

Відмінності	Прокаріоти	Еукаріоти
<b>Функціональні відмінності</b>		
Дихальна система	Є частинною міжбріжковою чи мезосомою	Здійснюється в мітохондріях — мембранних органах
Хемолітичний тип метаболізму	Є	Немає
Здатність до фіксації молекулярного азоту	Є	Немає
Здатність до дисимільного відновлення нітратів до нітриту та азоту	Є	Немає
Метабогенез	Є	Немає
Аноксигенний фотосинтез	Є	Немає
Анаеробіоз	Факультативний та облигатний	Факультативний
Рух цитоплазми	Відсутній	Часто виявляється
Фагоцитоз	Немає	Є
Піноцитоз	Немає	Є
Внутрішньоклітинне травлення	Немає	Є
Стійкість до у-опромінення	Дуже висока	Низька
Верхня межа температури	75–90 °C	40–60 °C
Секретія речовин у бульбашках	Немає	Є
Гольджі	Немає	Є
Клітинні ендосимбіонти	Немає	Є
Чутливість до антибіотиків	Пеміцилини, Аміноглікозиди, Тетрацикліни, Макроліди	Поліенолі, Глютаріаміди
<b>Хімічні відмінності</b>		
Пептидоглікан у складі клітинної стінки	Є	Немає
Діамінопіримідинова кислота у складі клітинної стінки	Є	Немає
Тейхові кислоти у складі клітинної стінки	Є	Немає
Поліненасичені жирні кислоти у складі мембран	Рідко	Є
Стерини у складі мембран	Немає	Є
Полі-β-гідроксимасляна кислота (як запасна речовина)	Є	Немає
ДНК в органах	Немає	Є

Таблиця 5.5

## Відмінні ознаки грамдодатливих та грамнегативних бактерій

Грамдодатливі бактерії	Грамнегативні бактерії
<b>Морфологічні ознаки</b>	
Морфологічно нерівноманітні: коки, палички, тороїдальні, такі, що галузяться	Морфологічно рівноманітні: коки, палички, тороїдальні, трикутні, зіркоподібні, нитчасті, звивисті, такі, що галузяться
<b>Структурні ознаки</b>	
Клітинна стінка одношарова	Клітинна стінка двошарова — внутрішній ригідний шар і зовнішній шар (зовнішня мембрана)
Клітинна стінка завтовшки 20–100 нм, іноді до 100 нм	Ригідний шар завтовшки 2–3 нм, зовнішня мембрана — 8–10 нм
Клітинна стінка однорідна	Клітинна стінка неоднорідна: ригідний шар шльохий, зовнішня мембрана подібна за структурою до цитоплазматичної мембрани
Можуть утворювати ендоспори, кондії	Ендоспори, кондії відсутні. Деякі види можуть утворювати екзоспори, мікроспори, цисти
Можуть мати повітряний міхалей	Відсутній
Багато видів нерухливі	Вільність видів рухливі
Рухомість коваліна відсутня	Можливі
У рухливих форм розміщення джгутиків перитрихальне, полярне зустрічається рідко	Розміщення джгутиків різноманітне
Як правило, рідко утворюють простеки	Простеки — ниткоподібні вирости клітинної стінки і мембрани (1–2 на клітину) зустрічаються у багатьох бактерій
Периплазматичний простір відсутній	Присутній
Коробисоми відсутні	Присутні
Мезосоми є	Немає
Фотосинтезичний мембранний апарат відсутній	Є
<b>Хімічні ознаки</b>	
Головний компонент клітинної стінки пептидоглікан становить 50–80 %, а іноді і 95 % всієї маси стінки	У ригідному шарі є пептидоглікан у кількості 5–10 % маси стінки, у зовнішній мембрані його немає. Стинки позбавлені пептидоглікану у <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria meningitidis</i>
У складі пептидоглікану мезодіамінопіпельнова кислота відсутня	Присутня

Закінчення табл. 5.5

Грамдодатливі бактерії	Грамнегативні бактерії
У клітинній стінці є тейкоові кислоти (до 50 %)	Немає
Клітинні стінки містять амінокислоти 3–4 типів	Містять 18–20 типів амінокислот
Ліпополісахарид у клітинній стінці відсутній	Є в зовнішній мембрані
Ліпопептид у клітинній стінці відсутній	Завжди є у зовнішній мембрані
Клітинні стінки більшості бактерій не містять ліпідів (за винятком норінебактерій, мікобактерій, нокардій)	Містять ліпідів (до 22 %)
<b>Фізіологічні ознаки</b>	
Більшість хемогеотеротрофи	Багато які хемоавтотрофи
Фотосинтез відсутній	Можливі
Літоавтотрофія відсутня	Можлива
Резистентні до дії протозейтичних ферментів (трипси, пепсини)	Чутливі
Резистентні до 1 %-го КОН, NaOH, азиду Na, солей телуру	Не резистентні
Можливі кислотостійкості	Ніколи не бувають кислотостійкими
Амінокислоти у відносно стабільно не здатні асимілювати	Можуть асимілювати
Ріст пригнічується йодом	Менш чутливі до йоду
Утворюють ендотоксини	Утворюють ендотоксини
Автоліз спостерігається рідко	Часто
Живі клітини прозорі по відношенню до барвників	Слабопрозорі
Порівняно стійкі до високого тиску та ультрависокого тиску	Малостійкі
Малостійкі до низького поверхневого тиску	Більш стійкі
Паразитизм у клітинах бактерій, інфузорій, тварин відсутній	Можливий

## Контрольні запитання до розділу 5

1. Назвіть поверхні структури клітинної стінки бактерій. Які функції вони виконують?
2. Чим зумовлена здатність бактерій рухатися? Як можуть бути розміщені джгутики у бактерій?
3. Що таке таксис? Які є типи таксису?

4. Назвіть принципи відмінності у будові та складі клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних бактерій.

5. Які полісахариди входять до складу клітинних стінок грибів і дріжджів?

6. У чому полягає "універсальність" елементарної плазматичної мембрани? Яка модель будови мембрани є загальноприйнятою у наш час?

7. Охарактеризуйте мембрану утворення у прокаріот та еукаріот.

8. У чому полягає суть ендосимбіотичної гіпотези?

9. Охарактеризуйте внутрішньоклітинні структури мікроорганізмів та їх функції в клітині.

10. Чим відрізняється генетичний апарат у прокаріот та еукаріот?

11. Чим відрізняються такі форми спокою у бактерій, як ендоспори, екзоспори, цисти та мікроспори?

12. Назвіть характерні особливості бактерій, здатних до утворення ендоспор.

13. Як відбувається процес спорудження у бактерій?

14. Назвіть структурні, генетичні, функціональні та хімічні відмінності прокаріот і еукаріот.

## 6. РІСТ МІКРООРГАНІЗМІВ

### 6.1. ДІЯ НА МІКРООРГАНІЗМИ ЗОВНІШНІХ ФАКТОРІВ

Усі фактори зовнішнього середовища, що впливають на існування мікроорганізмів (їх ріст, розмноження) можна поділити на три групи:

1) фізичні (температура, вологість, осмотичний і гідростатичний тиск, промениста енергія, ультразвук, електрика);

2) хімічні (рН середовища, окисно-відновний потенціал, токсичні речовини);

3) біологічні (взаємодія мікроорганізмів між собою, з рослинами, тваринами, людиною). Дія на мікроорганізми біологічних факторів буде розглянута в розділі "Мікроорганізми і навколишнє середовище".

#### 6.1.1. Фізичні фактори

**Температура.** Життя мікроорганізмів можливе лише в певних температурних межах. Вивчаючи вплив температури на ріст мікроорганізмів, можна виділити три основні точки — *мінімальну, оптимальну та максимальну* температуру (рис. 6.1). *Мінімальна* температура (точка А) — температура, нижче якої мікроорганізм не може рости, *оптимальна* (точка Б) — сприяє найбільш інтенсивному і швидкому росту мікроорганізму, *максимальна* (точка В) — температура, вище якої ріст мікроорганізму неможливий. Характерно, що оптимальна температура завжди ближча до максимальної, ніж до мінімальної.

Діапазон між мінімальною та максимальною точками температури у різних мікроорганізмів неоднаковий. Так, для *Bacillus subtilis* він достатньо широкий — від 3 до 52 °C, для гококків

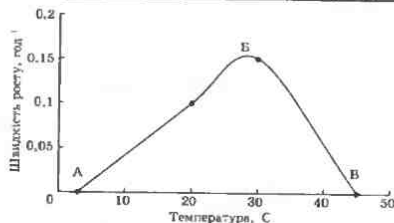


Рис. 6.1. Вплив температури на швидкість росту мікроорганізмів

та менінгококів — 36–38 °C, тобто всього 1–2 °C, а для вірусів — ще менший. Мікроорганізми, які мають широкі температурні межі, називаються *еврітермними*. Вони, як правило, живуть в умовах, де температура значно змінюється (грунт, вода, повітря середовища).

Мікроорганізми другої групи — *стенотермні* — мають вузькі температурні межі існування і живуть у зонах з відносно постійною температурою (гарячі джерела, льодовики).

По відношенню до температури мікроорганізми поділяються на *психрофіли*, *мезофіли* та *термофіли* (рис. 6.2).

Для *психрофілів* оптимальною є температура 5–12 °C. До цієї групи мікроорганізмів належать мешканці холодних морів, океанів, глибоких озер, льодовиків і ґрунтів Крайньої Півночі. Незважаючи на здатність деяких мікроорганізмів до росту при низьких температурах, існує точка, нижче якої розмноження мікроорганізмів неможливе. Клітинний ріст припиняється при –30 °C, хоча ферментативні реакції можуть проходити (зазвичай дуже повільно) і при цій температурі. Нижньою межею біохімічних реакцій у водних системах вважають температуру –140 °C. Саме тому заморожування не є причиною загибелі мікроорганізмів, а тільки перешкоджає їх росту та розмноженню. Заморожування широко використовується в лабораторній практиці для зберігання мікробних культур.

До групи *мезофілів* мікроорганізмів належать такі, які мають температурний оптимум 25–37 °C (у деяких літератур-

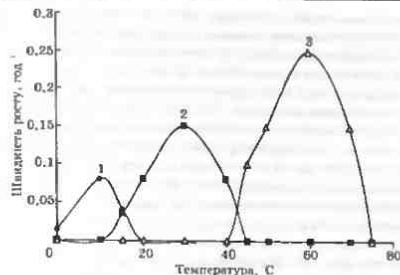


Рис. 6.2. Залежність між температурою росту психрофілів (1), мезофілів (2) та термофілів (3)

них джерелах температурний інтервал росту мезофілів вказаний як 20–42 °C). Ця найчисленніша група мікроорганізмів об'єднує сапрофітні та паразитні форми, мешканців ґрунтів, води, повітря, організму тваринки і людини.

Групу *термофілів* становлять мікроорганізми з температурним оптимумом 40–65 °C. Це мешканці гарячих мінеральних джерел, силосних ям, гнійних куп. *Крайніми термофілами* називають мікроорганізми, у яких температурний оптимум становить вище 65 °C (*Sulfolobus*, *Thermus aquaticus*). Деякі з них здатні рости навіть при температурах, вищих як 70 °C, навіть при 105 °C (*Pyrodicticum occultum* — строгий анаероб, який відіювалася сірку). Слід зазначити, що бактерії найтермостійкіші організми з усіх живих істот на землі.

Нижні температурні межі, °C, для різних груп мікроорганізмів

Найпростіші	45–50
Еукаріоти водорості та гриби	56–60
Фотосинтезувальні прокаріоти (бактерії та ціанобактерії)	70–73
Нефотосинтезувальні прокаріоти (бактерії)	Нижче 99

Вологість і осмотичний тиск. Для життєдіяльності мікроорганізмів необхідна вода, яка є одночасно і середовищем, і без-

посереднім учасником багатьох біохімічних реакцій у клітині. Вода необхідна мікроорганізмам для розчинення в ній поживних речовин (мінеральних солей та органічних речовин). Велика роль води в процесі дихання. Вода, що міститься по відношенню до мікроорганізму у зовнішньому середовищі, може бути доступною і недоступною для нього. Ступінь доступності води для хімічних реакцій і мікроорганізмів визначають *показником активності води  $a_w$ , що характеризує ступінь зв'язаності її молекул*. Активність чистої вільної води дорівнює одиниці. При взаємодії води з поверхнями, аніонами і катіонами, будь-якими гідрофільними групами активність води стає меншою за одиницю. Мікроорганізми можуть рости на середовищах із значеннями  $a_w = 0,99-0,60$ . Іноді для визначення ступеня доступності води користуються показником *відносної вологості* (виражається у відсотках). Обидва параметри стосуються фази пари, яка перебуває у рівновазі з твердим матеріалом чи розчином. *Активність води (відносна вологість)* — це відношення концентрації води у фазі пари в повітряному просторі над даним матеріалом до концентрації води в повітрі над чистою водою при певній температурі.

Водна активність розчину може змінюватися двома шляхами — матричним і осмотичним. Осмотична зміна  $a_w$  відбувається в результаті взаємодії молекул води з розчиненими речовинами. Матрична зміна  $a_w$  зумовлена адсорбцією молекул води на поверхнях твердих субстратів. Часто вважають, що вплив концентрації розчинів на ріст мікроорганізмів опосередкований впливом осмотичного тиску. Насправді цей вплив позначається на зміні водної активності як міри доступної для організму води.

Мікроорганізми, які ростуть у середовищах з високими концентраціями речовин, називають *осмотолерантними*. Це деякі види дріжджів, що розмножуються у варенні, меді, а також бактерії — в солоній рибі. Деякі мікроорганізми є *салофільними*. Вони не тільки витримують середовище з підвищеною концентрацією речовин, а й віддають йому перевагу. Є група мікроорганізмів, які потребують для свого росту значної концентрації хлористого натрію. Це так звані *галофіли*. Наприклад, *Halobacterium* найкраще ростуть у середовищі з вмістом 20–30 % хлористого натрію. Галофіли існують у найбільш солоних морях та озерах (Мертве, Каспійське моря).

**Гідростатичний тиск.** На морських глибинах мікроорганізми витримують гідростатичний тиск, зумовлений масою стовпа

води. Він може досягати значних величин, збільшуючись з кожними 100 м глибини на 1 МПа. Найглибшими (до 11 км) є зони Тихого океану з гідростатичним тиском до 110 МПа. Мікроорганізми, які живуть на великих глибинах і пристосувалися до високого гідростатичного тиску, називаються *баротолерантними*. Більшість же бактерій, ізолюваних з ґрунтів, невеликих водних глибин, найкраще ростуть за атмосферного тиску і гинуть за гідростатичного тиску 20–60 МПа.

**Проміненісна енергія.** Енергія, що поширюється у просторі у вигляді електромагнітних хвиль, називається *променистою*. Різні спектри промєнісної енергії мають різну довжину хвилі, яка визначає характер електромагнітної хвилі. Електромагнітні хвилі — це *радіохвилі, світлові промені (інфрачервоні, видимі та ультрафіолетові), іонізуюча радіація*.

Найбільшу довжину (понад 1500 нм) мають радіохвилі. Інфрачервоні промені мають довжину до 760 нм, видимі — 760–380, ультрафіолетові — 380–200 нм. Найбільш короткохвильовою є іонізуюча радіація.

Різні спектри промєнісної енергії по-різному діють на мікроорганізми. Радіохвилі не чинять біологічної дії, адсорбція організмом інфрачервоних променів спричиняє його нагрівання. Частини інфрачервоних променів з довжиною хвилі менше 1000 нм і видиме світло сприяють дію на фототрофні мікроорганізми, оскільки вони є основним джерелом світла. Нефототрофи краще розвиваються в темноті. Навіть розсіяне світло затримує розвиток бактерій, а видиме світло значної інтенсивності може спричиняти пошкодження і навіть загину клітин. Від згубної дії видимого світла мікроорганізми захищають пігменти.

Найбільш згубним для мікроорганізмів є ультрафіолетове опромінення, яке спричиняє або летальну, або мутагенну дію, залежно від дози і природи мікроорганізму.

Іонізуюча радіація діє на мікроорганізми менш специфічно, ніж УФ опромінення, хоча також впливає на ДНК і спричиняє або бактеріцидний, або мутагенний ефект. При  $\gamma$ -опроміненні великого спектра мікроорганізмів було показано, що  $LD_{50}$  становить, кГр: для кишковий паличок (та інших грамнегативних бактерій) — 0,03–0,04, для стафілококів — 0,17–0,19, грам-позитивних паличок — 0,4, дріжджів — 0,39–0,15, сарцин — до 0,5.  $LD_{50}$  — це доза опромінення, після якої виживає 10 % клітин. Сублетальна доза (виживання становить менше 1 %) для



спор *Bacillus subtilis* становить 8–10 кГр. Серед бактерій є чутливі до іонізуючої радіації (*Pseudomonas fluorescens*), резистентні (*Micrococcus*, *Streptococcus*) та високорезистентні (високорадіостійкі бактерії).

Вперше радіостійкі бактерії (червонопігментовані коки *Micrococcus radiodurans*) були ізольовані у 1956 р. з консервованого м'яса, простерилізованого рентгенівськими променями. Пізніше такі бактерії були виділені з природних місць з підвищеним радіаційним фоном, а також з попередньо опромінених зразків. Усі ці радіостійкі бактерії виявились схожими за своїми властивостями і були віднесені до роду *Deinococcus*. Це і грам-позитивні верховні аеробні коки з вмістом ГЦ в ДНК від 62 до 70 %, колонії рожево-бавовняні (містять каротиноїди). Сублетальна доза для них становить близько 15 кГр. У 1981 р. радіостійкі бактерії були відділені від роду *Micrococcus*, і *Micrococcus radiodurans* був перейменований у *Deinococcus radiodurans*. У 80-х роках ХХ ст. рід *Deinococcus* був узаконений, як і види *D. radiodurans*, *D. radiophilus*, *D. proteolyticus* та ін.

Останнім часом підвищений інтерес до радіостійких бактерій зумовлений аварією на ЧАЕС. Мікробіологічний аналіз ґрунтів 10-кілометрової зони ЧАЕС, проведений у 1993–1996 рр., показав, що кількісний та якісний склад бактерій у них бідишій, ніж в аналогічних контрольних ґрунтах. Типовими представниками радіаційно забруднених ґрунтів були рожево-бавовняні факультативні метилотрофи — представники роду *Methylobacterium*, а також споруутворювальні бактерії *Bacillus subtilis* та *Bacillus cereus*. Сублетальна доза для деяких бактерій роду *Methylobacterium* становила 9–10 кГр.

Цікавими є дослідження видового складу мікроміцетів внутрішніх приміщень об'єкта "Укриття" (4-й енергоблок ЧАЕС). Так, видовий склад грибів представлений 48 видами 24 родів. Понад 80 % таких грибів пігментовані (на частку меланінувмісних грибів припадає близько 40 %). У грибів, виділених з місць високого радіонуклідного забруднення, виявлена здатність засвоювати радіоуглець з реакторного графіту. Найінтенсивніше радіоуглець засвоює *Cladosporium cladosporioides*. У багатьох мікроміцетів, виділених із зони ЧАЕС, виявлено явище *позитивного радіотропізму*.

**Електрика.** Короткочасне проходження постійного чи змінного струму через суспензію мікроорганізмів спричиняє лише

слабку дію. Але тривале проходження струму високої напруги може спричинити електроліз деяких компонентів середовища і утворення при цьому сполук, які агально діють на мікроорганізми. Крім того, проходження струму супроводжується виділенням тепла, яке також може впливати на мікроорганізми.

Мікроорганізми при суспендуванні у водних розчинах несуть на своїй поверхні електричний заряд. Тому при проходженні струму через таку суспензію частини з негативним зарядом спрямовуються до анода (позитивного електрода), а частини, заряджені позитивно, — до катода (негативного електрода). Такий рух частин в електричному полі отримав назву *електрофорезу*. Це явище покладено в основу багатьох аналітичних методів, що дає можливість здійснити виділення речовин із суміші. У мікробіології цей метод використовується для аналізу продуктів метаболізму мікроорганізмів.

**Ультразвук.** Оскільки бактерії мають відносно малу масу і жорстку ригідну оболонку, кизькочастотні коливання (зона звукових коливань 100–10 000 Гц) діють на них слабо. Але якщо бактерії завурити в рідину, в якій поширюються високо-частотні коливання (ультразвук — УЗ), бактерії руйнуються і гинуть. Існує думка, що руйнування клітин під дією ультразвуку зумовлено утворенням всередині клітини піни, яка складається з найдрібніших бульбашок газу, що міститься в розчиненому стані в протоплазмі чи в рідині на поверхні клітини.

Бактерицидний ефект УЗ зменшується, якщо пригнічується *кавітація* (розрив рідини). Це відбувається при дегазації, зауренні об'єкта в гель чи інше в'язке середовище. Бактерицидний ефект УЗ посилюється при насиченні суспензії, що озвучується, азотом, повітрям, киснем, оскільки це підсилює кавітацію.

Дія УЗ спричиняє не тільки механічне пошкодження клітин. При цьому спостерігаються біохімічні та функціональні зміни, які не приводять до загибелі організму (можуть вивільнятися біологічно активні речовини — вітаміни, ферменти та ін.). Тому УЗ використовують для одержання певних клітинних фракцій, для стерилізації субстратів, які пошкоджуються при тепловій обробці. До УЗ чутливі всі мікроорганізми, в тому числі й спорові, але за ступенем чутливості вони відрізняються.

## 6.1.2. Хімічні фактори

Концентрація іонів водню (рН середовища). Іони  $H^+$  та  $OH^-$  найбільш рухомі з усіх іонів, тому найменші зміни їх концентрації сильно діють на мікроорганізми. У зв'язку з цим встановлення і підтримання оптимального значення рН середовища має велике значення для росту того чи іншого мікроорганізму.

Більшість організмів найкраще ростуть за нейтрального рН, або в середовищах, значення рН яких близькі до нейтрального (рН 6–7) (табл. 6.1). Такі мікроорганізми називаються *нейтрофілами*.

Таблиця 6.1  
Відношення мікроорганізмів до рН середовища

Мікроорганізми	рН середовища, за якого можливий розвиток мікроорганізму		
	мінімальне	оптимальне	максимальне
Глизильні бактерії	4,5	7,0	9,0
Будилькові бактерії	4,5	7,0	10,0
Азобактерії	5,0	7,0	9,0
Стрибкобактерії	1,0–5,0	6,0–7,0	10,0
Актиноміцети	4,0–5,0	6,0–7,0	9,0
Мікроміцети	1,5	5,0–6,0	9,0

Мікроміцети, дріжджі і деякі бактерії добре розвиваються в кислому середовищі (рН 5–6). Їх називають *ацидофілами*. Серед бактерій — це лактобацили, бактерії роду *Acetobacter*, деякі види *Thiobacillus*. Багато які бактерії (нітрифікатори, актиноміцети) краще ростуть у лужних середовищах. Їх називають *алкалофілами*. Наприклад, холеркий вібріон має оптимум рН 9,0.

Підтримання рН під час росту особливо важливе для тих мікроорганізмів, які хоча і синтезують кислоти, але не є толерантними до них (лактобацили; молочна кислота, яку вони синтезують, пригнічує їх ріст). Тому у таких випадках використовують забуферені середовища.

Вплив рН на мікробну клітку може бути як прямим, так і опосередкованим. В останньому випадку рН впливає не на мікроорганізм, а на певні компоненти середовища, дисоціація яких

залежить від рН, що впливає на проникнення сполук у клітину. Від величини рН залежить також утворення та активність мікробних ферментів.

**Кисень та аерація.** окисно-відновний потенціал середовища. Молекулярний кисень є життєво важливим і необхідним усім мікроорганізмам (але різною мірою). Щодо кисню всі мікроорганізми поділяються на кілька груп:

**облігатні аероби** — здатні отримувати енергію тільки шляхом дихання і тому потребують кисню, який є термінальним (кінцевим) акцептором електронів при аеробному диханні. Вони не здатні одержувати енергію у процесі бродіння;

**облігатні анаероби** — можуть рости тільки в середовищі, яке не містить кисню. Більше того, кисень для них є токсичним. Багато які ферменти цих мікроорганізмів денатуруються при контакті з молекулярним киснем. Згубна дія кисню на облігатні анаероби зумовлена тим, що в клітині у присутності кисню утворюється перекис водню, який у великих концентраціях може спричинити загибель клітини. У аеробів є ферменти *каталаза* або *пероксидаза*, які розкладають перекис водню. У анаеробів ці ферменти відсутні;

**факультативні анаероби** — ростуть як у присутності кисню, так і без нього. Серед них розрізняють два типи: *аеротолерантні* молочнокислі бактерії можуть рости в присутності кисню, але не здатні його використовувати; вони отримують енергію тільки за допомогою бродіння. Факультативні анаероби другого типу (дріжджі, кишкова паличка) можуть переключатися з дихання (у присутності кисню) на бродіння (за відсутності кисню);

**мікроаерофіли** — живуть за низьких концентрацій кисню. Вони потребують кисню для отримання енергії, але не переносять того парціального тиску  $O_2$ , який існує у повітрі (0,02 МПа); їм потрібно від 0,001 до 0,003 МПа.

**Аерація.** Для облігатних аеробних мікроорганізмів, які ростуть на агаризованих середовищах, кисню достатньо. У рідких середовищах з великим об'ємом рідини аеробні бактерії можуть рости тільки на поверхні, оскільки з віддаленням від поверхні умови наближаються до анаеробних. Для нормального росту аеробів у глибини шарах рідкої культури необхідна аерація. Мікроорганізми здатні використовувати тільки розчинений кисень, але розчинність його дуже низька. Так, 1 л води при 20 °С за умов рівноваги з атмосферним повітрям містить усього 6,2 мл кисню (0,28 ммоль). Такою

кількості кисню достатньо для окиснення всього 8,3 мг глюкози (тобто однієї тисячної від загальної кількості глюкози, яка міститься в нормальному поживному середовищі).

Швидкість розчинення кисню підвищується при збільшенні поверхні розділення між газовою та ріdkою фазами, а також із збільшенням парціального тиску кисню в газовій фазі. Для збільшення поверхні розділення фаз застосовують такі прийоми:

- культивування в тонкому шарі;
- перемішування ріdkини струшуванням (пряме чи кругове);
- обертання посудини, що лежить, навколо поздовжньої осі;
- пропускання повітря через ріdkину за допомогою газорозподільника (скляні фільтри, колби Клайвера);
- механічне перемішування.

**Вирощування анаеробних культур.** Для вирощування строго анаеробних культур необхідно виключити доступ кисню. *Техніка анаеробних культур* передбачає:

- використання прокип'ячених поживних середовищ і посудин, закритих, без бульбашок повітря;
- створення безкисневої атмосфери у вакуумних ексикаторах;
- застосування адсорбентів кисню (піроталол, дитіоніт, хлорид одновалентної міді);

внесення в середовище відновників (аскорбінова кислота, тіогліколят, цистеїн або навіть сульфід, якщо організм його переносить);

безперервне продування азоту чи інертного газу (наприклад, аргону) через культуральні посудини (навіть під час поспілу на повітрі можна запобігти контакту середовища з повітрям). Це тин звана *техніка Ханейта*;

використання анаеробних боксів, заповнених азотом, воднем, аргонем;

застосування кольорових індикаторів (реактури у присутності кисню має рожеве забарвлення, в анаеробних умовах безбарвний; метиленова цинка в анаеробних умовах також згасбавляється).

**Окисно-відновний потенціал.** Ступінь аеробності чи анаеробності середовища може бути охарактеризований кількісно за допомогою окисно-відновного потенціалу ( $\text{H}_2$ ). У одному розчині, повністю насиченому киснем,  $\text{H}_2 = 41$ , а в умовах повного насичення середовища воднем — 0. Отже, шкала від 0 до 41 характеризує будь-який ступінь аеробності. Нижньою межею  $\text{H}_2$  для облігатних аеробів є 10, проте величини понад 30 для них неспри-

ятливі. Облігатні анаероби залишаються життєздатними при  $\text{H}_2$  не вище 18–20, але розмножуватись вони можуть тільки при значеннях  $\text{H}_2$  не вище 3–5. Факультативні анаероби зберігають метаболічну активність у широкому діапазоні  $\text{H}_2$  — від 0 до 30.

**Хімічні сполуки.** Для хімічних речовин на мікроорганізми може бути *стимулювальною* (сприяє росту та розмноженню), *бактеріостатичною*, *функістатичною* (затримує ріст і розмноження бактерій і грибів відповідно) та *бактерицидною*, *функіцидною* (викликає загибель бактерій і грибів відповідно). Прикладом стимулювальної дії на мікроорганізми може бути дія на них вітамінів та інших ростових факторів.

Багато які хімічні речовини згубно впливають на мікроорганізми. Їх називають *антимікробними*. Вони можуть бути органічної (етиловий спирт, формальдегід, фенол) та неорганічної природи (солі важких металів — свинцю, ртуті, срібла, міді). Антимікробні речовини, які використовуються у практиці для пригнічення патогенних мікробів, називаються *дезінфікувальними* (0,5–5,0%-не хлорне вапно, 2%-й розчин йоду, 1–5%-й розчин фенолу — карболова кислота), а прийом їх використання — *дезінфекцією*.

Антимікробні речовини спричиняють такі пошкодження клітини:

*пошкодження поверхневих структур чи оболонок клітини* (етанол, фенол, крезолі, детергенти, поліпептидні антибіотики — поліміксин, бацитрадин, субтілін);

*пошкодження ферментів і порушення метаболізму* (важкі метали зв'язують SH-групи білків і тим самим глибоко змінюють їх третинну та четвертинну структури; шанід (дихальний яд), зв'язуючи залізо, блокує функцію цитохромоксидази; арсенат пригнічує фосфорильовання на рівні субстрату; фторацетат блокує цикл трикарбонових кислот);

*порушення синтезу клітинних компонентів*. Існують сполуки, які називаються *структурними аналогами*, або *антиметаболітами*. Вони схожі за своєю структурою на нормальні клітинні метаболіти. Нормальний метаболіт конкурує зі своїм структурним аналогом за каталітичний центр ферменту. Так, сульфонамід є структурним аналогом п-амінобензойної кислоти, яка в свою чергу входить до складу кофактору тетрагідрофоліної кислоти. У більшості бактерій тетрагідрофоліева кислота синтезується з простіших компонентів. Прони-

кислоти, сульфонамід включається у фоліеву кислоту. При цьому утворюється кофермент, який не здатний функціонувати, в результаті чого ріст припиняється;

*пригнічення синтезу білка антибіотиками.* Дія антибіотиків у прокаріот спрямована на функцію 70S рибосом. Стрептоміцин та неоміцин гальмують процес зв'язування амінокислот, еритроміцин порушує функцію субодиниці 50S. Хлорамфенікол (левоміцетин) пригнічує включення амінокислот у білки;

*пригнічення синтезу нуклеїнових кислот антибіотиками.* Мітоміцин С перешкоджає синтезу ДНК, актиноміцин D порушує синтез РНК, рифаміцин діє на ДНК-залежну РНК-полімеразу і тим самим пригнічує синтез матричної РНК у бактерій;

*гальмування синтезу клітинних стінок.* Синтез пептидоглікана пригнічується пеніциліном, цефалоспорином, бацитрацином.

### 6.1.3. Методи стерилізації

Загибель мікроорганізмів — необоротна втрата здатності до росту та розмноження. Багато які пошкодження, що супроводжуються, як правило, загибеллю клітин, у певних умовах можуть бути оборотними. Наприклад, явище фотореактивації після опромінення культури ультрафіолетом.

**Стерилізація (знепіднення)** — це збільшення будь-якого матеріалу від живих мікроорганізмів або їх форм спокою (спор). Від стерилізації слід відрізняти часткове знепіднення (пастеризацію), а також консервування. Якщо у стерильне середовище чи мікробну культуру потрапили інші мікроорганізми, то йдеться про **контамінацію (забруднення, інфікування)**.

Ефективність різних агентів, використовуваних для знищення мікроорганізмів, характеризують величиною  $D_{90}$  (час, необхідний для загибелі 90 % клітин певної популяції у певних умовах).

Повна або часткова стерилізація здійснюється за допомогою вологого жару, сухого жару, фільтрації, опромінення або різних хімічних засобів.

**Вологий жар.** Вегетативні клітини більшості бактерій і грибів гинуть через 5–10 хв при температурі 60 °C, спори дріжджів і грибів — при температурі вище 80 °C, а спори бактерій — вище 120 °C (15 хв). Для досягнення температур, вищих від точки

кипіння води, користуються автоклавом. При доступі повітря певному тиску відповідає значно нижча температура. Загибель мікроорганізмів під дією вологого жару залежить від температури, а не від тиску. Тому під час автоклавування слід вимірювати температуру, а не тиск, хоча, зважаючи на простоту та безпеку, вимірюють тиск. Температура та тривалість стерилізації залежать від складу поживного середовища. Так, молоко, желатинові середовища та середовища, які містять цукри, вітаміни тощо, стерилізують при температурі 112–115 °C тиску 0,05 МПа впродовж 20–30 хв, м'ясо-пептонні середовища — при 120 °C (0,075–0,1 МПа) впродовж 20–30 хв, розчини солей — при 131 °C (0,15 МПа) впродовж 40–60 хв.

**Сухий жар.** У процесі стерилізації сухим жаром бактеріальні спори переносять вищі температури довше, ніж у процесі стерилізації вологим жаром. Тому жаростійкий скляний посуд, порошки, масла стерилізують впродовж 2 год при 160 °C у сухому стерилізаторі. Стерилізація жаром базується на коагуляції клітинних білків.

**Фільтрація.** Розчини, що містять термолабільні речовини, стерилізують фільтрацією (так звана холодна стерилізація). При цьому використовують мембранні фільтри з різним діаметром пор, що дає можливість затримувати на них організми різної величини та форми.

**Опромінення.** Застосовують ультрафіолетові, рентгенівські та гамма-промені. У лабораторних умовах найширше використовують стерилізацію УФ опроміненням. Так стерилізують приміщення, пластиковий посуд, який не можна стерилізувати в автоклаві.

**Хімічні засоби.** Для стерилізації харчових продуктів, лікарських препаратів, різних приладів застосовують окис етилену, який руйнує і вегетативні клітини, і спори, але діє тільки тоді, коли матеріали, які стерилізують, містять деяку кількість води (5–15 %). Окис етилену застосовують у вигляді газової суміші з азотом чи вуглекислим газом, в якій його частка становить від 2 до 50 %.

Для зберігання термолабільних речовин, що містяться в поживних середовищах, в практику була введена стерилізація  $\beta$ -пропіолактоном. Він значно активніший, ніж окис пропілену, але разом з тим йому притаманні канцерогенні дії.  $\beta$ -пропіолактон у концентрації 0,2 % додавають у готові поживні середовища, які потім інкубують 2 год при 37 °C. Напів стерилізують також диетилпіроксидом (0,003–0,020 %).

Для стерилізації наєння, яке використовується для вирощування стерильних рослин, придатні такі зазвичайні антимікробні засоби, як бромна вода (1 %), сулемма (1%-й розчин  $\text{HgCl}_2$  у спирті), нітрат срібла у вигляді 0,05 %-го розчину та ін.

**Методи консервування.** Органічні матеріали розкладаються мікроорганізмами, якщо не вжито спеціальних заходів. Найбільше значення мають методи, що забезпечують зберігання харчових продуктів. Ці питання вирішувє харчова мікробіологія.

Харчові продукти стають непридатними до використання не тільки тому, що розкладаються мікроорганізмами (в результаті аеробного окиснення чи анаеробного гниття), а й тому, що на них потрапляють бактерії та гриби, які утворюють токсини. Такими продуцентами токсинів є *Clostridium botulinum* і різні види стафілококів. Деякі гриби утворюють мікотоксини, з яких найбільш відомий афлатоксин (продукт життєдіяльності гриба *Aspergillus flavus*).

Для консервування використовують фізичні та хімічні методи.

**Фізичні методи.** Це в першу чергу стерилізація за допомогою високої температури. Металеві консервні банки прогрівають у автоклаві. Для консервування кислих плодкових соків достатньо пастеризації, у процесі якої гинуть лише вегетативні клітини, а спори зберігають життєздатність (сидоспори в кислому середовищі не проростають).

Плодові соки, мінеральні води, лікарські препарати стерилізують через дрібнопористі азбестові чи целюлозні фільтри. Старий поширений спосіб консервування харчових продуктів висушуванням ґрунтується на тому, що для росту мікроорганізмів необхідна певна вологість (понад 10 % води). Висушені пластівці, сушені фрукти, сіно, зерно зберігаються саме завдяки своєму сухому стану.

Опромінення для консервування харчових продуктів ще не досить поширене. УФ промені використовують переважно для стерилізації повітря на молочних заводах, хлібопашодах та ін. Надійним способом, який навіть у домашніх умовах конкурує з солінням, є зберігання при низькій температурі. В камерах для глибокого заморожування продукти зберігають при температурі мінус 20 °C і нижче.

**Хімічні методи.** Консервування шкідливцями ґрунтується на тому, що за низьких рН без доступу повітря росте дуже небагато мікроорганізмів. Термостійкі спори за рН нижче 5,0

не проростають. Для приготування кислій капусти, силюсу, кислих огірків і сирокочених ковбас використовують природне (натуральне) підкислення, яке відбувається в результаті молочнокислого бродіння. Для консервування до продуктів часто додають оцтову, лимонну, молочиу кислоти.

М'ясні та рибні продукти консервують копченням. У копальному димі містяться продукти сублімації — феноли, крезоли, альдегіди тощо, яким притаманні антисептичні властивості.

Для соління продукти вміщують у 14–25 %-й розчин солі. Цукор у високих концентраціях (до 50 %) також пригнічує ріст мікроорганізмів. Так готують мармелади, варення, сиропи.

Для консервування продуктів використовують і хімічні консерванти. У вино добавляють сірчисту кислоту, диетилпірокарбонат, сорбінову, бензойну та мурашину кислоти. Плоди цитрусових обробляють дифенілом та о-фенілфенолатом. Роблять сироби застосовувати для консервування антибіотики.

## 6.2. АДАПТИВНІ РЕАКЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ НА СТРЕСОВІ ДІЇ

У природних місцях існування мікроорганізми зазнають впливу багатьох несприятливих факторів (УФ опромінення, іонізуючої радіації, температури, рН, токсичних сполук тощо). У процесі еволюції у мікроорганізмів сформувалася комплекс адаптаційних механізмів, які дають можливість їм пристосуватися до певних умов існування і вижити під дією несприятливих факторів.

Відоме загальне визначення поняття адаптаційних процесів. Так, М.С. Пляров розглядає адаптацію як сукупність морфологічних, поведінкових, популяційних та інших особливостей даного виду, що забезпечує можливість специфічного способу життя в певних умовах довкілля.

Адаптацію називають також сам процес вироблення пристосувань організмів до умов даного середовища існування. У мікробіології саме таке розуміння терміна є традиційним.

Розрізняють загальні, часткові адаптації і передадаптації.

**Загальні адаптації** — пристосування до існування в широкій зоні середовища, наприклад, у морській воді, ріпі солоних озер, воді гарячих джерел. **Часткові адаптації** — спеціалізації



до певного способу життя, наприклад, до використання певних субстратів, розвитку в певних мікроекозах та ін. **Передаваність** — властивість організму, що має пристосовувати цінність для ще не здійснених форм взаємодії його з середовищем. Наприклад, здатність бактеріальних ендоспор витримувати тривале кип'ятіння, а також здатність деяких мікроорганізмів здійснювати деградацію ксенобіотиків, хімічних сполук, синтезованих людиною і які рідше не існують в природі. Ймовірно, можна розглядати як передаваність, оскільки тільки при зіткненні з людиною подібна стійкість виявляється рятівною.

Вважається, що клітини, піддані несприятливим діям, перебувають у стані стресу. Дії, що спричиняють стан стресу клітин, визначають як стресорні (або стресові).

Розрізняють стрес **летальний** і **нелетальний**. Нелетальний стрес у свою чергу поділяють на **запрограмований** і **незапрограмований**. Істотно відмінність між цими видами стресу полягає в тому, що у разі запрограмованого стресу організм вже є компетентним для переходу у стан переживання (анабіозу). За незапрограмованого стресу працюють принципово інші антистресові механізми, бо організм не підготовлений до переходу в стан спокою. Прикладом незапрограмованого стресу може бути температурна дія на клітини мікроорганізмів, які активно ростуть. Відмінність запрограмованого стресу пов'язана також з тим, що у цьому разі несприятливий фактор діє повільніше, наприклад, у середовищі поступово вичерпуються поживні речовини. Прикладом може бути проходження мікробіцитами всіх попередніх стадій для підготовки до спорутоутворення.

Особливий інтерес становить те, що антистресові адаптаційні механізми виявляються достатньо схожими в еукаріот і прокаріот, тобто не залежать від рівня клітинної організації. У даному разі маються на увазі **зміни в ліпідному складі мембран, синтез білків теплового шоку, протекторних сполук, а також антирадикальний захист організму**. Крім того, всі живі організми — від бактерій до людини — реагують на дію несприятливих факторів синтезом так званих стрес-протеїнів, кількість яких пропорційна дії. Припускається, що стрес-білки утворюються організмами для захисту основних білків.

Розглянемо докладніше функціонування деяких антистресових адаптаційних механізмів у мікроорганізмів.

### 6.2.1. Зміни в ліпідному складі мембран

За сучасними уявленнями основна стресова дія полягає в зміні плинності ліпідного бішару мембран, що призводить до метаболічного дисбалансу в функціонуванні мембран-зв'язаних ферментів. А думка про те, що стійкість організмів пов'язана зі складом мембран, була висловлена ще в 1978 р. при вивченні дії етанолу на склад мембранних ліпідів дріжджів. За складом ліпідів еукаріоти значно відрізняються від прокаріот. Зокрема в останніх відсутні стерини, довголанцюгові жирні кислоти, як правило, відсутній сфінгомеліни, а в деяких еубактерій є гопаноїди (можливі аналоги стеринів), у археобактерій присутні унікальні ліпіди, етерифіковані  $C_{20}$ -спиртом, з'єднаним з гліцерином.

Та незважаючи на відмінності в складі ліпідів, клітинам еукаріот і прокаріот притаманні механізми, що забезпечують адаптивні зміни складу ліпідів мембран відповідно до температури довкілля — це так звана **гомеов'язкісна адаптація**. Зокрема при зниженні температури відбувається підвищення вмісту ненасичених жирних кислот у складі ліпідів мембран. Цим попереджується замерзання ліпідів і надлишкова жорсткість мембрани. На підвищення температури середовища клітини реагують зниженням вмісту ненасичених жирних кислот. Цим попереджується надмірне розрідження ліпідів і забезпечується стабілізація мембран.

Здатність до гомеов'язкісної адаптації виявлена як у мезофілних бактерій, так і психрофілів, але при одній і тій же температурі вміст ненасичених жирних кислот у психрофілів вищий, ніж у мезофілів. У психрофільної грампозитивної бактерії *Micrococcus cryophilus* при зниженні температури не збільшується вміст ненасичених жирних кислот, але зменшується довжина їхніх вуглецевих ланцюгів.

Високотемпературний нелетальний стрес у гриба *Cunninghamella japonica* супроводжується підвищенням ненасиченості гліноліпідів, рівня стеринів і фосфатидилетаноламіну, змінюю співвідношення гліко- і фосфоліпідів. Слід зазначити, що під час тривалого високотемпературного стресу у грибів відбуваються зміни не тільки в ліпідному, а й у вуглеводному складі міцелію, зокрема спостерігається інтенсифікація синтезу трегалози.

Зміни в складі мембранних ліпідів клітин мікроорганізмів можуть бути спричинені не тільки температурними стресами.

ми, а й дією мембранотропних (антибіотики, етанол) і токсичних сполук. Так, дія етанолу на клітини дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* приводить до підвищення насиченості ліпідів за рахунок зростання в них вмісту олеїнової кислоти. Внесення толуолу приводило до значного збільшення молярного співвідношення холестерин/фосфоліпід клітинної мембрани в перші години адаптації клітин *Acholeplasma laidlawii* до толуолу, а в наступні — до збільшення індексу ненасиченості жирних кислот.

Розвиток досліджень з вивчення механізмів стійкості мікроорганізмів до заморозування і висушування пов'язаний з проблемою підвищення життєздатності клітин у процесі їх консервації. Показано, що за певних умов попереднього культивування бактерій можна досягти змін хімічного складу мембрани в бік підвищення вмісту жирних кислот і завдяки цьому підвищити виживання клітин у процесі ліофілізації і наступного низькотемпературного зберігання. Так, при вирощуванні *Serratia marcescens* і *Erwinia aroideae* на поживному середовищі з додаванням 0,2 % олеїнової кислоти і 0,5–1,0 % твіну-80 можна підвищити на 20–30 % виживання клітин у процесі ліофілізації і забезпечити збереження їх стабільності впродовж 1,5 року. Під час низькотемпературного зберігання (–70 °C) високе виживання клітин (88–98 %) забезпечує додавання 0,03 % олеїнової кислоти і 1,0 % твіну-80. Підвищення вмісту ненасичених жирних кислот у складі ліпідів мембран можна досягти внесенням до середовища культивування бактерій ацетону, циклогексану, диоксану, етиленгліколю, дезоксихолату натрію, а також натрієвих солей олеїнової, лінолевої, ліноленової і пальмітинової кислот.

### 6.2.2. Утворення протекторних сполук

У несприятливих умовах протекторними сполуками можуть бути вуглеводи, в тому числі і скандолісахариди, каротиноїди, меланіни, протекторні білки, низькомолекулярні сполуки — осмопротектори та ін. Слід зазначити, що синтез деяких протекторних сполук у мікроорганізмів є конститутивним (ЕПС, пігменти), але у несприятливих умовах може спостерігатися збільшення їх синтезу. Ряд протекторних сполук, у тому числі протекторні білки, утворюються у відповідь на дію несприятливих факторів.

**Осмопротектори.** Для росту кожного мікроорганізму є оптимальне значення  $a_w$ . Якщо водна активність у присутності розчинених речовин стає нижче оптимального для росту рівня, то частину доступної енергії мікроорганізм змушений витратити на осморегуляцію, забезпечення енергією транспортних систем, синтез низькомолекулярних осмопротекторів. Тому в умовах пониженої водної активності спостерігається подовження лаг-фази, зниження швидкості росту та рівня біомаси; організм перебуває в умовах осмотичного стресу. Мікроорганізми притамають досить складні й досконалі системи пристосування до змін концентрації речовин у довкіллі. Серед них слід відзначити наявність у цитоплазматичній мембрані осмосенсорів, що реагують на зміну напруги мембрани, зміну співвідношення в зовнішній мембрані білків поринів, що утворюють гідрофільні пори, через які здійснюється надходження в периплазматичний простір не занадто великих молекул, а також синтез осмопротекторів.

**Осмопротектори** — це низькомолекулярні сполуки, концентрація яких у цитоплазмі врівноважує зовнішній тиск. У прокариот такими осмопротекторами є гліцербетайн, пролін, глікозилгліцерин, глутамат, диметилглїцин. Осмопротектори синтезуються клітиною або можуть поглинатися нею з навколишнього середовища, причому робота відповідних транспортних систем також індукується високою осмолярністю середовища.

Висока осмофільність у нижчих еукаріот, зокрема міцеліальних грибів, супроводжується появою в клітинах трегалози і поліолів. Існує припущення, що різна природа осмопротекторів в еукаріот і прокариот може бути пов'язана з відмінностями в складі ліпідів мембран цих організмів, тобто природа протектора корелює зі складом мембранних ліпідів. Таке припущення ґрунтується на тому, що основна біологічна функція протекторів полягає в стабілізації ліпідного бішару мембрани. Можливо, захист мембрани бактерій, більш поліморфної за будовою і складом ліпідів у порівнянні з мембраною еукаріот, потребував більш вузькоспеціалізованих протекторів, таких як гліцербетайн, глікозилгліцерин, які не виявлені в еукаріот. Слід, проте, зазначити, що у деяких прокариот у певних умовах осмопротектором може бути трегалоza. Архебактерії, в тому числі галофільні бактерії, як осморегулятор використовують тільки натій. Останнім часом у літературі з'явилася повідомлення про те, що деякі нафтоокисувальні галофільні бактерії можуть викорис-

товувати як осмопротекторні сполуки аспарагінову і глутамінову кислоти, пролін і гліцинбетаїн.

**Пігменти.** Здатність до синтезу пігментів різної природи (меланінів, каротиноїдів, продігінінів) є характерною ознакою багатьох мікроорганізмів. Ці пігменти виконують різні функції в мікробній клітині.

**Меланіни.** Функції меланінів полягають головним чином у захисті від УФ та іонізуючого опромінення, висушування, дії літичних ферментів та ін. Існує думка, що роль меланінів у захисті від УФ та іонізуючого опромінення може бути зумовлена антиоксидантними властивостями цих сполук. У літературі зазначається, що меланіни можуть виконувати функції антиоксиданту в клітині. Справа в тому, що при опроміненні відбувається радіоліз води з утворенням активних вільних радикалів (гідроксидних, пероксидних та ін.), які спричиняють пошкодження біомолекул клітини. Антиоксиданти здатні поглинати та нейтралізувати такі активні радикали.

Меланіни, очевидно, відіграють також певну роль у стійкості мікроорганізмів до важких токсичних металів завдяки здатності до їх поглинання. Так, збільшення вмісту меланінів у клітинах *Gaeumannomyces graminis var. graminis* при рості на середовищі, що містить  $\text{CuSO}_4$ , розглядається дослідниками як відповідь на присутність  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Каротиноїди.** Каротиноїди у нефототрофних мікроорганізмів є протекторами фотосенсibiliзації, а у фототрофів, крім того, беруть участь у процесі передачі енергії світла до реакційних центрів фотосистем. Каротиноїди в клітинах аеробних гетеротрофних бактерій *Micrococcus lysodeikticus* (*M. luteus*) захищають клітини від розщеплення. Припущення про те, що каротиноїди стабілізують мембрани клітин гетеротрофних бактерій — *Micrococcus lysodeikticus* і *Sarcina lutea*, не підтвердилося в подальших дослідженнях.

У світі сучасних уявлень каротин є одним з біоантиоксидантів, які захищають клітини мікроорганізмів від дії токсичних перекисних сполук, що також можуть накопичуватися в клітинах під дією УФ опромінення та іонізуючої радіації. Так, радіостійкі бактерії (представники родів *Deinococcus*, *Methylobacterium*, *Rubrobacter*) містять каротиноїди. Грунтові бактерії, ізолявані з 10-кілометрової зони ЧАЕС, також виявилися пігментованими (зabarвлення від жовтого до оранжево-червоного).

**Вуглеводи.** Останніми роками дослідники звернули увагу на той факт, що трегалоза накопичується в значних кількостях у організмі (зокрема мікрометаболітах), здатних пережити стан дегідратації (ангідробії). Кореляція між високим рівнем трегалози і зневодненістю клітин при переході мікроорганізмів у стан анабіозу дає можливість припустити, що цей дисахарид здійснює фізичні властивості мембранних ліпідів так, що вони набувають особливої стабільності в ангідробіотичному стані, тобто трегалоза є своєрідним захисним механізмом, який запобігає зневодненню мембран.

Вважають, що одним із механізмів термостійкості у мікроорганізмів є здатність організму пережити дегідратацію, бо саме завдяки цьому відбувається стабілізація ряду клітинних полімерів і в першу чергу білків. Не менше значення має і збереження цілісності мембрани у разі зневоднення. У бактеріальних спорах функцію захисту молекулярних структур від деформації виконує дипіколінова кислота, у грибів аналогічна роль приписується трегалозі. Відповідно вважають, що з підвищенням рівня трегалози зростає і термостійкість організму.

Показано, що дріжджові культури *Saccharomyces vini* і *Torulopsis dothidea* з високим вмістом внутрішньоклітинних вуглеводів (глікоген, гліколі, манан, трегалоза) є радіостійкими. Радіочутливі культури відрізняються від радіостійких пониженням резерву вуглеводів.

**Екзополісахариди.** Серед різноманітних біологічних функцій ЕПС основне місце відводиться захисній функції цих полімерів. Мікроби ЕПС захищають клітинні продуцентів від різних несприятливих факторів (висушування, дії важких токсичних металів, антибіотиків, біоцидів, детергентів, фазів, ультрафіолетового опромінення).

Позаклітинні полісахариди, завдяки своїй гідрофільності, тривалий час утримують воду, зберігаючи життєздатність клітин. Так, полісахариди, що утворюються ґрунтовими та ризосферними мікроорганізмами, перешкоджають висушуванню ґрунту і зменшують його стреси. Мукоїдні види *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Erwinia stewartii* значно стійкіші до висушування, ніж відповідні мутанти, які не синтезують ЕПС. ЕПС здатні утворювати з важкими металами нерозчинні комплекси "метал-ЕПС".

ЕПС, синтезований *Beijerinckia dextrii*, проявляє захисні функції щодо нітрогенази. Позаклітинні полісахариди деяких

мікроорганізмів здатні захищати екзоферменти продуцентів від протеолітичної деградації. Збереження життєздатності клітин мікроорганізмів в умовах ультрафіолетового опромінення може бути також зумовлене захисною дією екзополісахаридів.

**Протекторні білки.** При переході в експоненційної в стаціонарну фазу росту у *E. coli* спостерігається синтез 20-30 нових специфічних (так званих постекспоненційних) білків, що забезпечують збереження життєздатності клітин у відповідь на дію несприятливих факторів. Процеси, що відбуваються при переході клітини в стаціонарний стан, можна розглядати як такі, що є в природних умовах існування мікроорганізмів. Адже в природі бактерії рідко знаходять оптимальні для росту умови. Між короткими спалахами росту вони тривалий час проводять в умовах голодування, в неабсолютно вільному середовищі тощо. У таких несприятливих умовах клітини не припиняють повністю метаболічної активності, а переходять у нову фазу життєвого циклу — фазу підтримання життєздатності. Вони стають метаболічно менш активними і більш резистентними до несприятливих факторів середовища. Так, клітини *E. coli* в стаціонарній фазі росту є стійкішими до нагрівання, дії перекисів, антибіотиків, осмосу, ніж клітини в експоненційної фази росту.

У відповідь на тривале голодування бактерії синтезують протекторні білки, наприклад, білок  $D_{302}$ , що захищає безпосередньо ДНК. Під дією несприятливих факторів спостерігається синтез так званих стрес-протеїнів, які утворюються для захисту основних білків.

У багатьох мікроорганізмів стійкість до металів зумовлена синтезом металозв'язувальних білків. Механізм детоксикації  $Cd^{2+}$  полягає в утворенні комплексу металу з білком, синтез якого індукується  $Cd^{2+}$ . Металозв'язувальні білки утворюються термоциклофільними бактеріями *Sulfolobus solfataricus* і *Bacillus caldarius* при вирощуванні їх у присутності  $Zn^{2+}$  і  $Cu^{2+}$ . Непаклітинний  $Cu^{2+}$ -зв'язувальний білок виявлений у культурах *Vibrio alginolyticus* і *Pseudomonas aeruginosa*, що перожили  $Cu^{2+}$  стрес. Стійкі до важких металів бактерії роду *Citrobacter* осаджують метали у вигляді асоційованого з клітиною комплексу  $MeHPO_4$  при локсеродинації в'язанні з мембранами кислої фосфатази. Припускалося, що надпродукція цього ферменту є причиною стійкості бактерій до металів. Проте останніми дослідженнями виявлена аварійна залежність між фінансовою активністю і стійкістю бактерій до міді.

### 6.2.3. Антирадикальний захист

Основоположні ідеї про механізм уразливої дії вільнорадикального окиснення (ВРО) були сформульовані радянськими вченими Б.М. Тарусовим і М.М. Емануєлем. Вважають, що в стресових ситуаціях у клітинах мікроорганізмів відбувається відщеплення ВРО. Роль ініціатора ВРО в клітині належить, очевидно, супероксид-аніону  $O_2^-$ . Крім того, токсичними похідними кисню є також такі його активні форми, як перекис водню  $H_2O_2$ , гідропероксидний радикал  $HO_2$ , гідроксидний радикал  $OH$ , синглетний кисень  $^1O_2$ . За сучасними уявленнями, найбільш токсичними для клітини є синглетний кисень і гідроксидні радикали. Перекис водню в цьому відношенні є найменш реакційноздатним, проте його накопичення в клітинах може бути детальним. Вважають, що інактивація клітин перекисом водню пов'язана з утворенням гідроксидних радикалів у так званій реакції Фентона. При цьому  $H_2O_2$ , вступаючи в реакцію з ДНК, відіграє основну роль у пошкодженні цих макромолекул.

Крім пошкодження ДНК, накопичення токсичних перекисних сполук може спричинити інші пошкодження в клітинах: перекисне окиснення ненасичених жирних кислот у ліпідах мембран, окиснення SH-груп білків, руйнування в них триптофанових залишків, деполімеризацію кислих полісахаридів та ін.

Але в клітинах існує відносно складний механізм ферментативного антирадикального захисту. Так, фермент *супероксиддисмутаза* здійснює перетворення супероксидного аніона в перекис водню, перекис водню розкладається за допомогою *каталази* і *пероксидази*.

Крім того, захисну функцію в клітинах здійснюють різні антиоксиданти (токоферолі, убіхіноні, вітаміни групи К і А, сірковмісні амінокислоти та ін.). Слід підкреслити, що біогенні оксиданти є ефективними факторами гальмування ВРО в організмі. Їхня основна роль полягає в пригніченні процесів вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів клітинних мембран. При внесенні до середовища екзогенних антиоксидантів (фенолів, іонів) виживання клітин *E. coli* збільшувалося в 1,5-2,0 рази у порівнянні з контролем. Цікавими є дані про те, що ліпідні деяких бактерій можуть виконувати функцію антиоксидантів при переході організму в стан "спокою". Виродовж процесу індистинування *Azotobacter* sp. відбувається зменшення актив-

ності фосфоліпідного синтезу і збільшення вмісту спеціальних ліпідів — алкілгліцерофосфатів і піролів. Можливо, ці унікальні ліпіди заміщують частину фосфоліпідів у мембрані, формують структуру, що забезпечує "спокій" і стійкість зрілих дієт до зовнішніх дій, і виконують роль біовитоксиканта, що захищають мітогенезу від дії кисню повітря.

#### 6.2.4. Роль міжклітинних хімічних комунікацій в адаптації мікроорганізмів до стресу

Основна увага дослідників при вивченні механізмів адаптації мікроорганізмів до стресових дій приділяється "індивідуальним" механізмам захисту, тобто таким, що відбуваються на внутрішньоклітинному рівні. Так, поряд із змінами в метаболізмі і складі мікробіої клітини ретельно досліджені регуляторні механізми, генетика і молекулярно-біологічні аспекти різноманітних стресових дій. При цьому поза увагою дослідників залишилися міжклітинні контакти, "взаємодопомога" клітин в умовах стресів. У деяких роботах бактеріальні колонії і культури розглядаються як єдине ціле, що координовано і адекватно реагує на зміну факторів зовнішнього середовища, або навіть як багатоклітинні організми.

Одним із можливих і найбільш вивчених каналом міжклітинної комунікації є "хімічна мова", тобто *передача та отримання інформації за допомогою хімічних сполук*. Такі сполуки можна поділити на *ауторегулятори* (спілкування з клітинами свого виду), *атрактанти і репеленти* (реагування на умови зовнішнього середовища через активний рух), *антибіотики* та інші *антибактеріальні сполуки*, синтезовані живими організмами, які пригнічують активність мікроорганізмів.

Відомо, що хімічні сполуки-ауторегулятори відіграють важливу роль у житті мікроорганізмів. Ауторегулятори можуть впливати на ріст і розвиток мікроорганізмів, диференціацію клітин, їхню репродуктивну поведінку, фізіологічний стан. Здатність мікроорганізмів синтезувати в процесі свого розвитку ауторегуляторні позаклітинні метаболіти була вперше описана в кінці 70-х — на початку 80-х років минулого століття.

Галобактерії в умовах низької солоності, яка спричиняє їхній лізис, виділяють у навколишнє середовище сигнали осмотичної тривоги, що підвищують стабільність клітин у цих умовах.

У стресових умовах клітини бактерій можуть реалізовувати інший механізм колективного захисту — *виділення екзометаболітів-протекторів*. Якщо розглядати спільне вирощування двох різних мікроорганізмів як стресову для них ситуацію, то можна констатувати, що в умовах такого стресу клітини деяких бацил починають синтезувати специфічний антибіотик проти мікроміцетів, які культивуються спільно з ними. Клітини дріжджів виділяють ряд протекторних екзометаболітів при вирощуванні в присутності фенолу. Утворення різних екзометаболітів, які зв'язують важкі токсичні метали, у відповідь на їх присутність у ростовому середовищі також можна розглядати як один з проявів хімічних комунікацій у мікроорганізмів в умовах стресу. Спільна присутність певних мікроорганізмів, що належать до різних родів і родин, може спричинити утворення екзополісахаридів. Так, накопичення ЕПС при вирощуванні змішаних культур може бути в 3–4 рази вищим, ніж у разі використання монокультур. Клітини *E. coli*, оброблені тетрацикліном і неспроможні внаслідок цього до росту, утворюють неідентифікований поки що екзометаболіт (екзометаболіти), який прискорює ріст тетрациклінозостійкого штаму цієї бактерії в присутності бактеріостатичної концентрації антибіотика. Цей екзометаболіт виявляє також захисну дію щодо клітин *E. coli*, які ростуть в умовах теплового, холодового, окисного і осмотичного стресів. Захисна дія виявляється в підвищенні швидкості росту в присутності тетрацикліну і при тепловому стресі або в зменшенні тривалості адаптації до інших стресів.

Слід зазначити, що нині існують лише окремі роботи, виконані на стикі двох напрямів — вивченні адаптації до стресів і хімічної мови мікроорганізмів, тобто присвячені вивченню ролі міжклітинних хімічних комунікацій в адаптації бактерій до стресу.

#### 6.2.5. Регуляторні системи відповіді на стресові дії

Процеси, що проходять у клітинах, які перебувають у стані стресу, вивчені здебільшого на моделі кишкових бактерій, передусім *Escherichia coli* і *Salmonella typhimurium*. Останніми роками об'єктами досліджень з генетики і молекулярної біології механізмів адаптації стають також інші бактеріальні і дріжджові культури.



Залежно від природи стресора і характеру завданих пошкоджень, реакція клітини може бути різною. У кишкових бактерій виявлено п'ять регуляторних систем відповіді на стресові дії: "суворий" контроль"; SOS-відповідь; адаптивна відповідь; синтез білків теплового шоку; відповідь на окисний стрес. В усіх випадках відбуваються глибокі перебудови метаболізму, пов'язані з уповільненням або припиненням розмноження і синтезом білків, необхідних для виживання. У деяких випадках у процесах регуляції беруть участь спеціальні сполуки, клітинні гормони, що отримали назву *алармонів*.

**Система відповіді на окисний стрес** контролює синтез ряду білків, серед яких виявлені антиоксидантні ферменти (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), білки теплового шоку, а також ДНК-репарувальні ферменти. ДНК-репарувальні ферменти усувають пошкодження ДНК, що виникають під дією УФ опромінення та іонізуючої радіації, дегідратації, перекисних сполук та інших ДНК-пошкоджувальних факторів. Наприклад, при  $\gamma$ -опроміненні відбуваються одно- та дволанцюгові розриви ДНК. Під впливом УФ опромінення у молекулі ДНК відбувається димеризація тиміну, внаслідок чого притичується рапідкація ДНК, і клітина втрачає здатність до поділу. У багатьох мікроорганізмів є специфічні ферменти, які усувають пошкодження, спричинені УФ променями. Вони розщеплюють димер тиміну. Ці ферменти активуються видимим світлом, завдяки чому весь процес отримав назву *фотореактивації*. Фотореактивація — одна із складових частин системи репарації ДНК. Слід зазначити, що найефективніше система репарації ДНК спрацює при УФ опроміненні, далі йдуть рентгенівське та  $\gamma$ -опромінення,  $\alpha$ -опромінення зумовлює практично незворотні пошкодження ДНК. Системи репарації ДНК є у всіх мікроорганізмів, але ефективність їх дії різна у різних організмів.

**Синтез білків теплового шоку (БТШ)** спричиняється сублетальним температурним стресом, дією УФ опромінення, етанолу, нафтичної кислоти, а також спостерігається за окисного стресу, вичерпування джерел вуглецю і азоту, в разі переходу культури в стаціонарну фазу росту. За сучасними уявленнями БТШ є посередниками зміни конформації білкових молекул у клітині під дією стресових факторів.

**Система SOS-відповіді** спрацює в клітинах мікроорганізмів в умовах УФ опромінення, дії іонізуючої радіації та впливу хімічних мутагенів.

**Система адаптивної відповіді** функціонує під дією метиловальних, стиліювальних та алкілувальних агентів.

**Система суворого контролю** включається у відповідь на вилучення із середовища джерел вуглецю і азоту, сольовий стрес, зниження температури.

Отже, у мікроорганізмів функціонує ціла мережа різноманітних адаптивних механізмів, що дають можливість витримувати стресові дії і виживати в несприятливих умовах існування.

Слід зазначити, що деякі антистресові адаптаційні механізми (зміни під дією стресових факторів у ліпідному складі мембран, синтез білків теплового шоку, протекторних сполук, а також антирадикальний захист організму) виявляються достатньо схожими у еукаріот і прокаріот, тобто не залежать від клітинної організації.

Крім того, для якогось певного стресового фактора не пов'язане з функціонуванням лише одного відповідного адаптаційного механізму. У несприятливих умовах у клітинах мікроорганізмів функціонує комплекс індукованих реакцій, який контролюється складними регуляторними шляхами, тобто існує система інтегральних механізмів стійкості до стресових факторів.

Немає сумнівів у тому, що вивчення біохімічних і генетичних змін у клітинах у стресових умовах дає можливість з'ясувати позиції підійти до вирішення таких ключових проблем біології, як старіння, анабіоз, цитодиференціювання, стійкість до зовнішніх дій.

Крім того, ці дослідження дуже важливі і для розвитку біотехнології. Мікроорганізми-продуценти потрібно розглядати як об'єкти, властивості яких змінюються залежно від умов доглядів. Жодні сучасна техніка культивування не дасть очікуваних поліпшень процесів без знання основ фізіології продуцентів. Жодні глибокі знання біохімії не дають інформації, як підвищити швидкість процесів, які засоби лімування або інгібування застосувати. Мутанти-надсинтетичні продуктів метаболізму, отримані новітніми засобами генної інженерії, не будуть довго розвиватися, якщо не знайти для них оптимальні умови, що забезпечать для самої клітини переваги надсинтезу того або іншого метаболіту.

Отже, фізіологія мікроорганізмів, яка вивчає зв'язок між їхньою метаболічною активністю і змінами умов доглядів, повинна відігравати центральну роль у розвитку біотехнології.

### 6.3. ЖИВЛЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Основними компонентами мікробної клітини є вода, мінеральні речовини та органічні сполуки — білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та ліпіди. Для синтезу всіх цих клітинних компонентів мікроорганізмам потрібні поживні речовини — розчинні у воді сполуки, з яких мікроорганізми будують свою клітину та одержують енергію.

#### 6.3.1. Головні та міnorні біоеlementи

Тільки невелика кількість елементів періодичної системи потрібна мікроорганізмам у відносно високих концентраціях ( $\geq 10^{-4}$  М). Це десять головних біологічних елементів, наведених у табл. 6.2. Крім десяти головних біоеlementів, мікроорганізмам

Таблиця 6.2

Десять головних біоеlementів, їх джерела і деякі функції

Елемент	Джерело	Функції в метаболізмі
C	Органічні сполуки, $\text{CO}_2$	Основні компоненти клітинного матеріалу
O	$\text{O}_2$ , $\text{H}_2\text{O}$ , органічні сполуки, $\text{CO}_2$	
H	$\text{H}_2$ , $\text{H}_2\text{O}$ , органічні сполуки	
N	$\text{NH}_4^+$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{N}_2$ , органічні сполуки	Компонент цистеїну, метіоніну, тiamинпірофосфату, коферменту А, біотину та $\alpha$ -кетоглової кислоти
S	$\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{HS}^-$ , $\text{S}^{2-}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , органічні сполуки сірки	
P	$\text{HPO}_4^{2-}$	Компонент нуклеїнових кислот, фосфоліпідів та нуклеотидів
K	K	Основний неорганічний катіон у клітині, кофактор деяких ферментів
Mg	$\text{Mg}^{2+}$	Кофактор ферментів (наприклад, кінназ), присутній у клітинних стінках, мембранах та вібрах фосфорної кислоти
Ca	$\text{Ca}^{2+}$	Кофактор ферментів, входять до складу екзоферментів (амілаза, протеаза), $\text{Ca}^{2+}$ -дипіколінат є важливим компонентом ендоспору
Fe	$\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$	Міститься в цитохромах, ферредоксинах, інших залізоцірконпротектах, кофактор ферментів

необхідні міnorні біоеlementи (табл. 6.3). У табл. 6.2 і 6.3 зазначено джерела цих елементів, а також їх функції в метаболізмі.

Поживні середовища, на яких вирощують мікроорганізми, повинні відповідати таким мінімальним вимогам: в них повинні бути присутні всі елементи, з яких будуватиметься клітина, причому в такій формі, в якій мікроорганізми здатні їх засвоювати.

У природі більшість біологічних елементів міститься у вигляді солей, мікроорганізми поглинають їх у вигляді катіонів та аніонів. Велика різноманітність сполук, які використовуються мікроорганізмами, спостерігається тільки щодо перших п'яти елементів (сірка, азот, кисень, водень, вуглець).

Так, сірка, як правило, споживається у вигляді сульфатів, відновлюється до сульфідів і потім використовується в біосинтетичних процесах. Проте певні групи бактерій потребують відновлених сполук сірки. Так, деякі метанотворювальні бактерії ростуть тільки в присутності сірководню. Тіобацили і деякі фототрофні бактерії використовують сульфідів, елементну сірку або тіосульфат як донор електронів.

Азот необхідний у великих кількостях, оскільки в клітинах його міститься близько 10 %. У природі азот зустрічається у вигляді аміаку, нітрату, нітриту, азотавмісних органічних сполук та молекулярного азоту. Кращим джерелом азоту для мікро-

Таблиця 6.3

Міnorні біоеlementи, їх джерела і функції в клітині

Елемент	Джерело	Функції в обміні речовини
Zn	$\text{Zn}^{2+}$	Міститься в ферментах (алкогольдегідрогеназа, лужна фосфатаза, альдолаза, РНК- та ДНК-полімераза)
Mn	$\text{Mn}^{2+}$	Міститься в бактеріальній пероксидазидисмутазі, кофактор ферментів
Na	$\text{Na}^+$	Необхідні галофілічним бактеріям
Cl	$\text{Cl}^-$	
Mo	$\text{MoO}_4^{2-}$	Міститься в ферментах (нітратредуктаза, нітрогеназа, форміатдегідрогеназа)
Se	$\text{SeO}_3^{2-}$	Міститься в ферментах (гліциніредуктаза, форміатдегідрогеназа)
Co	$\text{Co}^{2+}$	Міститься в коферменті вітаміну $\text{B}_{12}$ -ферментів (глутаматуктаза, метилмалоніл-КоА-мутаза)
Cu	$\text{Cu}^{2+}$	Міститься в цитохромоксидазах та оксигеназах
W	$\text{WO}_4^{2-}$	Міститься в деяких форміатдегідрогеназах
Ni	$\text{Ni}^{2+}$	Міститься в уреазі, необхідний для автотрофного росту водневих бактерій

організмів є аміак, який може споживатися практично всіма організмами. Нітрат спочатку відновлюється до аміаку і тільки після цього використовується в біосинтетичних процесах.

Нітрит є продуктом нітрат-нітритного дихання і метаболічної активності бактерій *Nitrospoonas* і близьких родів. Нітрит, крім того, може окиснюватися до нітрату бактеріями *Nitrobacter*. Ряд бактерій здатні фіксувати молекулярний азот і відновляють його до аміаку. Ця здатність виявлена тільки у прокариот. І, наразі, багато які мікроорганізми як джерело азоту використовують органічні сполуки.

Вуглець, водень і кисень можуть споживатися мікроорганізмами у формі органічних та неорганічних сполук ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ). Слід зазначити, що жодна з органічних сполук, що утворюються в результаті життєдіяльності різних організмів, на Землі не накопичується. Важливу роль у їх розкладі відіграють мікроорганізми. Велика різноманітність процесів життєдіяльності мікроорганізмів привела до формулювання так званої "доктрини каталітичної безвідомості мікроорганізмів", згідно з якою будь-яка сполука вуглецю, що є в природі, використовується яким-небудь мікроорганізмом.

Метаболізм (обмін) сполук, що містять вуглець, водень чи кисень, має велике значення не тільки тому, що ці елементи є важливими компонентами клітини, а й тому, що ці сполуки є субстратами для одержання мікроорганізмами енергії.

### 6.3.2. Два основні механізми синтезу АТФ

Основним носієм біологічної енергії є аденозин-б'-трифосфат (АТФ), і всі енергозалежні процеси в клітині прямо чи опосередковано спряжені з перетворенням АТФ в АДФ (аденозин-б'-дифосфат) і неорганічний фосфат.

АТФ містить два фосфатні зв'язки з високою вільною енергією гідролізу. Це так звані макроергічні зв'язки і позначаються як зв'язок "—". При утворенні та розщипі макроергічних зв'язків зміни рівня вільної енергії в молекулі виражається величинами 25–50 кДж/моль (для нормального хімічного зв'язку — 12,5 кДж/моль). Для молекули АТФ ця величина становить 32,5–34,7 кДж/моль.

Саме та енергія, яка вивільнюється при розщипі макроергічних зв'язків (гідролізі АТФ), поглинається і використовується клітиною для синтезу органічних сполук з більш високим

рівнем вільної енергії, ніж вихідні сполуки. При цьому АДФ та  $\text{P}_i$  є основними продуктами, що утворюються при витратах енергії в обміні речовин.

У той же час запаси макроергічних зв'язків в організмі постійно поповнюються. Синтез АТФ з АДФ та неорганічного фосфату є життєво важливим для всіх живих організмів.

У мікроорганізмі існує два основних механізми утворення АТФ: фосфориливання при перенесенні електронів; фосфориливання на рівні субстрату.

**Фосфориливання при перенесенні електронів.** За цим механізмом потік електронів від донора з негативним окисно-відновним потенціалом до акцептора з більш позитивним потенціалом спряжений з синтезом АТФ з АДФ та  $\text{P}_i$ . Системами, в яких відбувається фосфориливання при перенесенні електронів, є дихальний ланцюг і фотосинтетичний апарат.

**Фосфориливання на рівні субстрату.** При розкладанні органічних субстратів утворюється багато проміжних продуктів, що містять макроергічні зв'язки. Такими проміжними продуктами, у яких зміна рівня вільної енергії становить, кДж/моль, є: 1,3-дифосфогліцерат — 49,1; фосфосенліруват — 58,6; ацил-фосфат — 43,7; ацилкоензим А — 32,9.

Подальший обмін таких макроергічних сполук спряжений з перенесенням фосфатної групи на АДФ, тобто утворенням АТФ. Цей спосіб синтезу АТФ називається фосфориливанням на рівні субстрату, або субстратним фосфориливанням.

### 6.3.3. Типи живлення (трофії)

У класифікації типів живлення у мікроорганізмів використовується термінологія, запропонована у 1946 р. на симпозіумі в Кода Спринг Харбор. Розглядаються такі типи живлення (трофії):

- 1) щодо джерела енергії (хемо — хімічне, фото — світлове);
- 2) щодо донора електронів (орган — органічна речовина, літо — неорганічна). Такими неорганічними донорами електронів є  $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  та ін.;
- 3) щодо джерела вуглецю (авто — вуглекислота, гетеро — органічна сполука).

Комбінації всіх цих термінів дають можливість описати більшість типів живлення (табл. 6.4). Всім їм відповідають реально існуючі мікроорганізми (табл. 6.5). Найбільш дослідженим

Таблиця 6.4

Характеристика типів живлення у бактерій

Джерело енергії	Донор електронів	Джерело вуглецю	Тип живлення
Окисно-відновні реакції	Неорганічні сполуки	CO <sub>2</sub>	Хемолітоавтотрофія
Те саме	Те саме	Органічні сполуки	Хемолітогетеротрофія
" "	Органічні сполуки	CO <sub>2</sub>	Хемооргановтотрофія
" "	Те саме	Органічні сполуки	Хемоорганогетеротрофія
Світло	Неорганічні сполуки	CO <sub>2</sub>	Фотолітоавтотрофія
" "	Те саме	Органічні сполуки	Фотолітогетеротрофія
" "	Органічні сполуки	CO <sub>2</sub>	Фотооргановтотрофія
" "	Те саме	Органічні сполуки	Фотоорганогетеротрофія

Таблиця 6.5

Типи живлення у різних фізіологічних груп мікроорганізмів

Мікроорганізми	Ростові субстрати			Тип живлення
	Джерело енергії	Донор електронів	Джерело вуглецю	
Цианобактерії, пурпурові та зелені водорості	Світло	H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> S, H <sub>2</sub> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , S <sup>0</sup>	CO <sub>2</sub>	Фотолітоавтотрофія
Пурпурові та зелені бактерії	"	H <sub>2</sub> S, S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub>	Органічні сполуки	Фотолітогетеротрофія
Пурпурові сіркобактерії	"	Органічні сполуки	CO <sub>2</sub>	Фотооргановтотрофія
Пурпурові бактерії	"	Те саме	Органічні сполуки	Фотоорганогетеротрофія
Водневі, метанотворювальні та ацетогенні бактерії	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	Хемолітоавтотрофія
Нітрифікуючі бактерії	NH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub>	CO <sub>2</sub>	Те саме
Залізобактерії	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>3+</sup>	CO <sub>2</sub>	" "
<i>Desulfotomaculum desulfuricans</i>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	Органічні сполуки	Хемолітогетеротрофія
Використовують тільки органічні субстрати	Органічні сполуки	Органічні сполуки	Органічні сполуки	Хемоорганогетеротрофія

типом живлення є органігетеротрофія. У цьому випадку вуглецева сполука використовується мікроорганізмом як єдине джерело вуглецю, енергії та електронів.

### 6.3.4. Ростові та неростові субстрати

Якщо вуглецева сполука використовується мікроорганізмом як єдине джерело вуглецю, енергії та електронів, це класичний приклад для інтерпретації поняття **ростовий субстрат**. У цьому разі розглянемо тільки вуглецеві сполуки як ростові речовини і не будемо зупинятись на джерелах азоту, фосфору та інших елементів, без яких ріст мікроорганізмів неможливий.

Відомо також, що не завжди джерелами вуглецю та енергії є одна сполука. У більшості автотрофних мікроорганізмів джерелом вуглецю є вуглекислота, а джерелом енергії можуть бути органічна або неорганічна сполука або світло, а донором електронів — органічна чи неорганічна сполука. У цьому разі ростовий субстрат складається з двох чи трьох різних сполук, що забезпечують клітину енергією та електронами. Окремо кожен з цих компонентів, безумовно, не забезпечує ріст мікроорганізму. Так, згідно з класифікацією і даними, наведеними у табл. 6.5, автотрофні організми, такі як цианобактерії, пурпурові сіркобактерії реалізують фотолітотрофний тип живлення (джерело енергії — світло, донор електронів — неорганічні сполуки). Такі автотрофи, як нітрифікатори, водневі, метанотворювальні та залізобактерії є хемолітотрофами (джерело енергії — неорганічна сполука, донор електронів — також неорганічна сполука). В останньому випадку ростовий субстрат представлений трьома сполуками.

**Неростовий субстрат** — це речовина (сполука), яка не використовується мікроорганізмом як єдине джерело вуглецю та енергії.

### 6.3.5. Трансформація мікроорганізмами суміші ростових і неростових субстратів

У природних місцях існування мікроорганізмами, як правило, розвиваються в присутності кількох вуглецевих субстратів, у той час як в лабораторних умовах для їх культивування використовуються моносубстрати як єдине джерело вуглецю та евер-

гії. Цим ваші знання про мікроорганізми значно звужуються. Разом з цим існують роботи, в яких доведена здатність мікроорганізмів використовувати суміші двох (чи більше) ростових і неростових субстратів і вивчена регуляція таких процесів.

Якщо мікроорганізм здатний використовувати суміш ростових субстратів, то у даному разі можливі два варіанти споживання цих ростових субстратів:

**мікстротрофія** — одночасна незалежна трансформація мікроорганізми двох (чи більше) ростових субстратів. Для мікстротрофії характерним є одночасне функціонування ферментів асиміляції обох субстратів. Так, при вирощуванні дріжджів *Hansenula polymorpha* на суміші таких ростових субстратів, як метанол і глюкоза, у клітинах одночасно присутні ферменти, що беруть участь у метаболізмі як метанолу, так і глюкози;

**диаксія** — послідовне використання двох ростових субстратів.

Якщо в середовищі культивування мікроорганізму, крім ростового, присутній і неростовий субстрат, то мікроорганізми можуть не реагувати на присутність неростового субстрату або здійснювати його трансформацію до певних продуктів. Причому, якщо трансформація неростового субстрату здійснюється незалежно від ростового субстрату, то такий процес називається **неростовим окисненням**.

Якщо трансформація неростового субстрату здійснюється сприяєно асиміляцією ростового субстрату, такий процес називається **кометаболізмом**. Найпоширенішим варіантом кометаболізму є варіант, коли неростовий субстрат (його ще називають косубстратом) використовується як джерело енергії.

Цікавим виявилось те, що метаноокиснювальні бактерії в певних умовах здатні рости на суміші субстратів, кожен з яких окремо не є для них ростовим. Здатність мікроорганізмів рости на суміші двох чи більше неростових субстратів була визначена як **синтаболізм**.

### 6.3.6. Потреби мікроорганізмів у факторах росту

Крім елементів мінерального живлення, джерел вуглецю та енергії, які повинні входити до складу поживного середовища, багато

які мікроорганізми потребують додаткових речовин, які називаються факторами росту. Ці речовини входять до основного складу клітини, але деякі організми не можуть їх самі синтезувати.

Фактори росту можна віднести до трьох груп: амінокислоти; пурини та піримідини; вітаміни та споріднені сполуки, які потрібні в дуже малих кількостях. Амінокислоти, пурини та піримідини входять до складу білків і нуклеїнових кислот, тому клітина потребує їх у достатніх кількостях. Вітаміни входять до складу кофакторів або простетичних груп, тобто беруть участь у каталітичних функціях, тому вони необхідні в дуже малих кількостях (близько 1 мг на 1 л).

Організми, які потребують факторів росту, називаються **ауксотрофами** і протиставляються **прототрофам**, яким такі фактори росту не потрібні.

Кількість і природа факторів росту різні для різних мікроорганізмів. Для росту молочнокислих бактерій потрібні практично всі амінокислоти, пурини та піримідини, вітаміни. Багатьом мікроорганізмам потрібні вітаміни. Так, *Clostridium kluyveri* росте на середовищі з біотином та пара-амінобензойною кислотою.

Але потреба в ростових факторах встановлена не для всіх організмів. Тому мікробіологи часто додають у середовище дріжджовий екстракт, дріжджовий автолізат або пептон як повноцінні та дешеві джерела таких факторів. У середовища для багатьох фототрофних бактерій додавають розчин вітамінів. Найчастіше у мікроорганізмів спостерігається потреба в таких вітамінах, як біотин, пара-амінобензойна кислота, тіамін, нікотинова кислота і вітамін B<sub>12</sub>.

### 6.3.7. Типи поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів

Отже, поживне середовище для культивування мікроорганізмів повинно містити всі елементи, з яких будується клітина, причому в доступній для засвоєння організмом формі. Такими основними компонентами поживного середовища повинні бути: джерело вуглецю та енергії, джерела мінеральних сполук (азот, фосфор, сірка, калій, магній, кальцій, залізо та мікроелементи), а також (у разі потреби) і фактори росту.

Якщо поживний розчин складений з певних хімічних сполук, то таке середовище називається **синтетичним**. Дослід-

ник намагається визначити для кожного мікроорганізму мінімальні потреби в поживних речовинах і скласти мінімальне середовище, яке містить тільки компоненти (інгредієнти), необхідні для росту. Вільш вимогливі види потребують більшої кількості додаткових речовин (факторів росту). Наприклад, для *Leuconovos teventeroides* було складено синтетичне середовище, яке вміщувало понад 40 компонентів.

**Складні середовища.** У багатьох особливо вимогливих мікроорганізмів потреби в поживних речовинах поки що досліджені недостатньо. Тому їх вирощують на середовищах, що містять пивне сусло, морквинний та сливовий соки, м'ясний екстракт, сінний відвар, кокосове молоко, дріжджовий екстракт. Для зниження вартості до поживних розчинів замість чистих сполук додають складні суміші, такі як молочна сироватка, патока, меліса, кукурудзяний екстракт та ін. Такого роду середовища називають *складними*. Середовища, які складаються з продуктів рослинного та тваринного походження, називають також *натуральними*.

До натуральних середовищ невизначеного складу належать і *напівсинтетичні* середовища, до складу яких входять сполуки відомої хімічної природи і речовин невизначеного складу. До напівсинтетичних середовищ належать м'ясо-пептоновий бульйон з глюкозою та фосфориноксидом калієм, картопляне середовище з глюкозою та пептоном.

Отже, за **складом** середовища поділяються на дві групи: *синтетичні* та *натуральні* (складні).

За **призначенням** розрізняють *елективні* та *диференційно-діагностичні* середовища. Елективні забезпечують переважний розвиток одного виду або групи мікроорганізмів і менш придатні (зовсім непридатні) для розвитку інших. Диференційно-діагностичні (індикаторні) дають змогу досить швидко відрізнити одні види мікроорганізмів від інших.

За **фізичним станом** розрізняють рідкі, тверді та сипкі середовища. Прикладами сипких середовищ є розварене пшона, мисіжки, кварцевий пісок, насичені поживним розчином.

**Щільні середовища.** Для виготовлення щільних середовищ, на яких мікроорганізми ростуть у вигляді колоній, до рідких поживних розчинів додають речовини, які надіють їм гелеподібної консистенції. Желатину використовують дуже рідко, оскільки вона має низьку температуру плавлення — (26–30) °C

і, крім того, розкладається багатьма мікроорганізмами. Майже ідеальним засобом для одержання щільних середовищ є агар, який В. Гессе, німецький лікар, співробітник Р. Коха, авія у бактеріологічну практику у 1883 р. Концентрація агару становить 15–20 г/л. Агар — це полісахарид, який виділяють з червоних морських водоростей. Його розчини плавляться при 100 °C, а при 44 °C перетворюються на твердий прозорий гель. Розкладати агар здатні тільки деякі бактерії. Якщо потрібні щільні середовища, які не містять органічних речовин, для затвердіння використовують силікагель.

### 6.3.8. Елективні методи культивування (накопичувальні та чисті культури)

Багато які мікроорганізми дуже легко виділити з навколишнього середовища, для них без особливих ускладнень можна підібрати умови, які б забезпечували їх ріст. Проте існує дуже багато мікроорганізмів, про які стало відомо лише після того, як була розроблена техніка **накопичувальних культур**. Честь цього відкриття належить нашому співвітчизнику С.М. Виноградському та голландському вченому М.В. Бейєрину.

**Накопичувальні культури.** Метод накопичувальних культур дуже простий. Для накопичення потрібні такі умови, в яких організм доліє конкуренцію інших. Підбираючи ряд факторів (джерела енергії, вуглецю, азоту, акцептори електронів, газову атмосферу, освітленість, температуру, pH та ін.), створюють певні умови та інокулюють (засівають) середовище змішаною популяцією, яка, наприклад, є в ґрунті, мулі, воді тощо. Найбільш пристосований до цих конкретних умов мікроорганізм росте і витісняє всі інші супутні організми. Багаторазовими пересівами на такому самому рідкому поживному середовищі і посівом на агароване середовище такого самого складу можна без особливих зусиль виділити накопичений штам. Найкращим матеріалом для інокуляції є проби з тих місць, де вже є "природне збагачення". Наприклад, якщо потрібно виділити мікроорганізми, які ростуть на вуглеводнях, найкраще відібрати пробу з ґрунту на нафтопромислах або з нафтових відстійників.

Метод накопичувальних культур дає можливість виділяти мікроорганізми з будь-якою комбінацією потреб в поживних речо-



винах, якщо такі організми взагалі існують у природі. Наприклад, мінімальне середовище, яке не містить азоту, при освітленні є вибірково для азотфіксувальних ціанобактерій. Якщо це саме середовище доповнити органічним джерелом енергії та вуглецю, то в темноті в аеробних умовах буде розвиватися азотобактер, а в анаеробних — клостридій. Дуже часто разом з "позитивною" селекцією здійснюється і "негативна". Наприклад, на середовищі, яке містить азал натрію (дихальний ял), у присутності кисню виростають молочнокислі бактерії (факультативні анаероби), а ріст веретіб притуплюється. Для пригнічення росту грампозитивних бактерій у середовище додають пеніцилін. Ріст мікроміцетів пригнічується в присутності антибіотика ністатину.

**Чиста культура.** Це потомство однієї-єдиної клітини (клон). Чисті культури мікроорганізмів виділяють в основному на агризованому середовищі (на його поверхні чи всередині). Чисті культури аеробів одержують за методом Коха (метод посіву на поверхню щільного середовища послідовних десятикратних розведень клітинної суспензії), в анаеробів — методом посіву послідовних десятикратних розведень клітинної суспензії в розплавлений агар (температура 45 °C) і вирощування без доступу повітря.

## 6.4. ФІЗІОЛОГІЯ РОСТУ

### 6.4.1. Визначення поняття "ріст"

Існує кілька визначень поняття "ріст", а саме:

збільшення біомаси клітини. Проте не всяке збільшення біомаси клітини можна розглядати як ріст. Так, у азотобактера збільшення біомаси часто відбувається за рахунок ослиднення культури (виділення слизу);

узгоджене збільшення кількості всіх хімічних компонентів, з яких складається клітина;

незворотне збільшення кількості живої речовини, як правило, пов'язане з поділом клітин і збільшенням їх кількості. У багатоклітинних мікроорганізмів збільшуються розміри тіла, а в одноклітинних росте кількість клітин;

координувана реплікація всіх структур, органел і компонентів мікробної клітини, яка, як правило, закінчується її розмноженням.

### 6.4.2. Розмноження бактерій

Найчастіше бактерії розмножуються *бінарним поділом*, коли з однієї клітини утворюється дві, кожна з яких знову ділиться. Процесу поділу завжди передують подвоєння (реплікація) ДНК. Існує два типи поділу: *перетяжкою* і за допомогою поперечної перегородки.

*Поділ перетяжкою* (констрикція) супроводжується звуженням клітини в місці її поділу, і в цьому процесі беруть участь усі шари клітинних оболонок. Інвагінація оболонок з обох боків усередину клітини все більше її звужує і, нарешті, ділить на дві (рис. 6.3). Поділ перетяжкою характерний для грамнегативних бактерій.



Рис. 6.3. Поділ клітини *Listeria monocytogenes* перетяжкою

*Поділ з утворенням поперечної перегородки* притаманний грампозитивним бактеріям (рис. 6.4). Проте у деяких груп бактерій спостерігається зміна способів поділу (тіомові, міко- та втробактерії).

Період від поділу до поділу бактеріальної клітини називають *клітинним циклом* (*онтогенезом бактерії*). У бактерій розрізняють кілька типів вегетативного клітинного циклу: *монотипний* — утворюється тільки один морфологічний тип клітин (бацили, киш-



Рис. 6.4. Поділ клітини *Staphylococcus aureus* за допомогою поперечної перегородки: цм — цитоплазматична мембрана; кк — клітинна стінка; пл — поперечна перегородка

кова паличка); **диморфний** — виникає два типи клітин (бактерії роду *Caulobacter*) та **поліморфний** — утворюється кілька морфологічно різних типів клітин (актиноміцети, артробактерії).

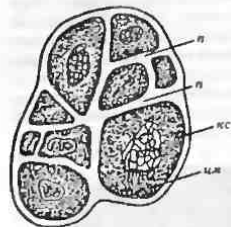


Рис. 6.5. Схема розміщення поперечних перегородок у клітині *Mycobacterium tuberculosis*

п — поперечні перегородки; цм — цитоплазматична мембрана; кк — клітинна стінка

з клітинною стінкою в рості в середині клітини, інвагінації зближуються, з'єднуються, і перегородки розщеплюються.

Бактерії можуть розмножуватися також брунькуванням, яке є різновидом бінарного поділу. Цей спосіб поділу притаманний бактеріям родів *Norphomicrobium*, *Rhodomicrobium*, *Nitrobacter*, які мають диморфні та поліморфні клітинні цикли.

Бактерії характеризуються високою швидкістю розмноження. Наприклад, кишкова паличка ділиться кожні 20–30 хв, тобто за добу з однієї клітини утворюється  $472 \cdot 10^{10}$  клітин ( $2^{23}$ , 72 покоління). Якщо прийняти, що один міліярд сухих клітин мають масу 1 мг, то  $472 \cdot 10^{10}$  клітин будуть мати масу 4720 т в умовах, що виключають загибель клітин.

#### 6.4.3. Ріст бактерій у бактеріальній популяції

**Популяція** — це сукупність бактерій одного виду (чиста культура) або різних видів (змішана культура, асоціація), що розвиваються в обмеженому просторі (поживне середовище та ін.).

У бактеріальній популяції постійно відбувається ріст бактерій, розмноження та відмирання клітин. Для спостереження за розвитком бактеріальної популяції визначають:

**концентрацію бактерій** — кількість клітин в 1 мл літійної суспензії (культуральної рідини);

**бактеріальну масу** (маса клітин, біомаса, густина бактеріальної маси) — кількість міліграмів сухої біомаси в 1 мл літійної суспензії (культуральної рідини).

Під час росту періодичної (статичної) бактеріальної культури (тобто такої культури, яка вирощується в будь-якому середовищі без його зміни) не може бути кореляції між цими двома показниками. Ці показники необхідно розрізняти.

**6.4.3.1. Визначення концентрації бактерій.** У популяції не всі клітини є життєздатними. Живими вважаються ті клітини, які можуть утворити колонію на агаризованому середовищі або суспензію в рідкому поживному середовищі. Ці життєздатні клітини виявляють спеціальними методами, призначеними для визначення кількості живих клітин. У загальну кількість клітин входять живі, пошкоджені та мертві клітини. Тому розрізняють **методи визначення загальної кількості клітин і кількості живих клітин**.

**Загальна кількість клітин.** Існує кілька методів визначення загальної кількості клітин:

найпоширенішим є підрахунок загальної кількості клітин під мікроскопом у тонкому шарі за допомогою лічильної камери; використання стандартів мутності. Це один з найдавніших методів, суть якого полягає у порівнянні мутності досліджуваної клітинної суспензії з мутністю стандартних розчинів, для яких відома концентрація клітин;

використання електронного лічильника. Для його ґрунтується на зниженні провідності розчину електролітів під час проходження однієї бактерії через вузький отвір;

якщо кількість клітин становить менше  $10^4$  на 1 мл, використовують метод мембранних фільтрів (зразок фільтрують через мембранний фільтр, потім цей фільтр сушать, фарбують, просвітлюють і підраховують кількість клітин під мікроскопом).

**Кількість живих клітин.** Визначається за методом Коха (посів послідовних десятикратних розведень клітинної суспензії на чашки Петрі з агаризованим середовищем). Кількість життєздатних клітин визначають за кількістю колоній, які вирости

на чашках (іноді користуються терміном колонійутворювальна одиниця, або КУО).

**6.4.3.2. Визначення біомаси.** Біомасу визначають за допомогою прямих і непрямих методів. У повсякденній практиці перевага віддається непрямым методам (з використанням відповідного калібрувального графіка).

**Прямі методи.** Існує кілька прямих методів визначення біомаси:

суху біомасу визначають після осадження клітин центрифугуванням. Після висушування відмитих клітин можна визначити суху біомасу;

визначення загального азоту (наприклад, за методом К'ельдаль) або загального вмісту вуглецю (наприклад, за методом Тюріна);

визначення вмісту білка (наприклад, за допомогою біуретового методу, методу Лоурі чи Фоліна).

**Непрямі методи.** Відомо кілька таких методів:

біомасу визначають за оптичною густиною клітинної суспензії з наступним перерахунком на суху біомасу за допомогою калібрувального графіка;

визначення показників інтенсивності метаболізму, безпосередньо пов'язаних з ростом (поглинання кисню, утворення  $\text{CO}_2$ ).

#### 6.4.4. Експоненційний ріст

Бактерії розмножуються шляхом бінарного поділу, тому їх кількість збільшується в геометричній прогресії:  $2^0 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3 \rightarrow \dots \rightarrow 2^n$ . Якщо на одиницю об'єму періодичної культури, що росте, припадає  $N_0$  клітин, то після  $n$  поділів кількість клітин стане  $N_0 \cdot 2^n$ . Логарифмуючи, отримаємо:

$$\lg N = \lg N_0 + n \lg 2,$$

звідки кількість клітинних поділів буде:

$$n = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2.$$

Кількість клітинних поділів за 1 год (константи швидкості поділу  $v$ ) визначається за формулою

$$v = n/t = (\lg N - \lg N_0) / \lg 2(t - t_0).$$

Час, необхідний для одного циклу поділу (тривалість генерації  $g$ ), визначається за формулою

$$g = t/n = 1/v.$$

**Приклад.** Якщо за 10 год кількість клітин у суспензії збільшується з  $10^4$  до  $10^8$ , то константа швидкості поділу становить:

$$v = (\lg 10^8 - \lg 10^4) / 0.3010 \cdot 10,$$

де  $\lg 2 = 0.3010$ .

Тривалість генерації становить, хв:

$$g = 1/v = 1/2 = 30.$$

Графічне зображення експоненційного росту. Якщо на осі ординат відкладемо кількість клітин у популяції, що експоненційно росте, а на осі абсцис — тривалість росту (обидві величини в арифметичному масштабі), то одержимо експоненційну криву росту (рис. 6.6). Проте такий спосіб графічного зображення для великої кількості клітинних поділів непридатний, оскільки залежно від вибраного масштабу він дає змогу врахувати або тільки перші,

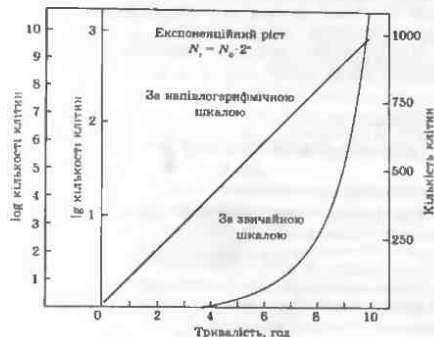


Рис. 6.6. Експоненційний ріст одноклітинних організмів: залежність кількості клітин від тривалості вирощування

або останні поділи. Тому користуються напівологірифічною шкалою, у цьому разі на осі ординат відкладають логарифм кількості клітин. У такій побудові графіка експоненційний ріст бактерій описується прямою. Нахил прямої характеризує швидкість поділу: вона тим більша, чим більший нахил. Оскільки за експоненційного росту існує лінійна залежність між тривалістю росту і логарифмом кількості клітин, такий ріст називають також *логіарифмічним*. Але останнім часом у науковій літературі перевагу надають терміну "експоненційний ріст", а термін "логіарифмічний ріст" використовується дуже рідко і вважається застарілим.

Якщо за кількістю клітин визначити наведеним вище способом тривалість генерації, то одержимо середнє її значення. Але в популяції бактерій завжди міститься якась кількість дефектних клітин, не здатних до поділу, тому у клітин, які активно діляться, істинна тривалість генерації буде трохи меншою за розраховану. У зв'язку з цим при вивченні кінетики росту окремі клітини не беруть до уваги, а розглядають бактеріальну популяцію як систему, що автокаталітично розмножується, і в розрахунках виходять з густини бактеріальної маси (біомаси). Швидкість зміни густини такої бактеріальної маси в кожний момент часу є пропорційною самій густині, тобто зміна відповідає кінетиці реакцій першого порядку.

В експоненційній фазі росту константа швидкості росту визначається за формулою

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt},$$

де  $X$  — біомаса;  $t$  — час.

Інтегруючи це рівняння, отримуємо:

$$X = X_0 e^{\mu t},$$

де  $X_0$  — кінцева та початкова біомаса.

Для подвоєння клітинної біомаси  $2X_0 = X_0 e^{\mu t}$ , звідки час подвоєння  $t_d$  становить:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (\ln 2 = 0,693).$$

Тільки для "стандартних клітин" (в умовах, коли ріст біомаси пропорційний збільшенню концентрації клітин):

$$\mu = \ln 2 / t_d; t_d = g.$$

Розмежування (відмінності) понять "кількість клітин" і "маса клітин" наведені в табл. 6.6.

Таблиця 6.6

Відмінності між поняттями "кількість клітин" і "маса клітин"

Показники	Кількість клітин	Маса клітин
В одиниці об'єму	Концентрація бактерій (кількість клітин в 1 мл)	Густина бактерій (біомаса), мг сухої маси в 1 мл
Кількість подвоєнь за одиницю часу	Константа швидкості поділу $\mu$ , год <sup>-1</sup>	Константа швидкості росту $\mu$ , год <sup>-1</sup>
Тривалість подвоєння (примнож часу, за який відбувається подвоєння)	Тривалість генерації $g$ , год	Тривалість подвоєння $t_d$ , год

#### 6.4.5. Ріст бактерій у періодичній культурі

При внесенні у поживне середовище бактерії ростуть до тих пір, поки вміст якого-небудь необхідного компонента не стане мінімальним або не вичерпається, після чого ріст припиняється. Якщо впровадити усього цього часу в середовище не вносити ніяких поживних речовин і не виводити продукти метаболізму, то одержимо так звану *періодичну культуру* (популяцію клітин в обмеженому життєвому просторі).

Крива, що описує залежність логарифму кількості живих клітин від тривалості культивування, називається *кривою росту* (рис. 6.7). Така крива має S-подібну форму, на ній можна виділити кілька фаз росту: початкову (лаг-фазу), експоненційну (логіарифмічну), стаціонарну та відмирання. У деяких посібниках на кривій росту виділяють не чотири, а шість фаз (див. рис. 6.7): лаг-фазу, експоненційну (логіарифмічну), сповільненого росту, стаціонарну, відмирання та виживання.

**Лат-фаза.** Починається з моменту посіву бактерій у свіже поживне середовище. У цей період клітини адаптуються до даних умов культивування. Тривалість лаг-фази залежить від передісторії інкуляції та його віку, а також від того, наскільки придатним для росту є дане середовище і умови культивування (рН, температура, концентрація розчиненого кисню). Наприклад, якщо джерела вуглецю та енергії в новому середовищі відрізняються від тих, які були в середовищі при одержанні посівного матеріалу, то адаптація до нових умов передбачає синтез нових ферментів, які раніше були непотрібні і тому не синтезувались. Утворення нових ферментів індукуються новим субстратом.

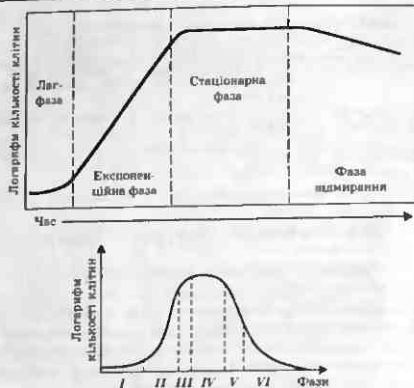


Рис. 6.7. Крива росту бактеріальної популяції. Фази росту: I — лаг-фаза; II — експоненційна; III — сповільненого росту; IV — стаціонарна; V — відмирання; VI — віживання

Прикладом впливу субстрату на синтез ферментів є **диаксія**. Це явище послідовного використання двох субстратів, або явище двофазного росту (рис. 6.8). Із суміші глюкози та сорбітолу бактерії спочатку споживають глюкозу. Ферменти метаболізму сорбітолу утворюються тільки після повного вичерпання глюкози.

Кількісні зміни складу бактеріальної клітини під час лаг-фази стосуються змін РНК: її вміст збільшується у 8–12 разів. Це вказує на участь РНК і рибосом у синтезі ферментних білків.

**Експоненційна фаза.** Ця фаза характеризується максимальною швидкістю поділу клітин. У цій фазі процеси росту проходять збалансовано (тобто подвоєння біомаси супроводжується подвоєнням кількості білка, ДНК, РНК та ін.). Можна сказати, що культура в експоненційній фазі складається із "стандартних" клітин. Але треба мати на увазі, що і в експоненційній фазі клітини періодичної культури зазнають змін, оскільки постій-

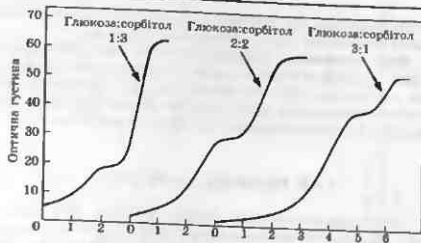


Рис. 6.8. Дифазний ріст (диаксія) *Escherichia coli* на середовищі з глюкозою та сорбітолом у різних співвідношеннях

но змінюється середовище: зменшується концентрація субстрату, збільшується густина клітинної суспензії, накопичуються продукти обміну. У зв'язку з тим що в цій фазі швидкість поділу відносно постійна, вона найзручніша для визначення швидкості поділу та швидкості росту. Вплив факторів зовнішнього середовища, складу поживного середовища на ріст мікроорганізмів визначають, спостерігаючи за показником біомаси чи кількості клітин саме під час експоненційного росту.

**Фаза сповільненого росту.** Настання цієї фази зумовлене якісними змінами поживного середовища (споживання поживних речовин, накопичення продуктів метаболізму, дефіцит кисню, зміна pH). Клітина реагує на це змінюю інтенсивності синтезу РНК, білка, полісахаридів та інших компонентів.

**Стационарна фаза.** Вона настає тоді, коли кількість клітин перестає збільшуватися, тобто характеризується рівновагою між клітинами, що утворюються, та клітинами, що гинуть. У стаціонарній фазі спостерігається максимальна біомаса і максимальна сумарна кількість клітин. Кількість біомаси в стаціонарній фазі називають також *виходом або врожаєм*. Але в науковій літературі термін "вихід біомаси" або "врожай біомаси" зустрічаються рідко. В основному використовуються поняття "рівень біомаси", "концентрація біомаси" чи просто "біомаса".

**Фаза відмирання.** Характеризується зниженням кількості живих клітин, підвищенням гетерогенності популяції. Іноді

клітини лізуються під дією своїх власних ферментів (автолізу). Ця фаза досліджена значно менше, ніж попередні.

**Фаза виживання.** Характеризується наявністю окремих життєздатних клітин в умовах загибелі більшості клітин популяції. Якщо такі клітини пересіяти в свіже поживне середовище, вони починають активно рости та ділитися. Такі виживані клітини характеризуються низькою інтенсивністю процесів метаболізму.

#### 6.4.6. Параметри кривої росту

Основними параметрами кривої росту (рис. 6.9) є врожай біомаси (біомаса), швидкість росту та тривалість лаг-фаз (у разі, якщо ріст періодичної культури аналізують за збільшенням біомаси, а не за кількістю клітин).

**Урожай (біомаса, рівень біомаси)** — це різниця між максимальною та вихідною біомасою бактерій:

$$X = X_{\text{max}} - X_0.$$

Цю величину виражають у грамах сухої речовини. Важливим показником є відношення врожаю клітин до кількості спожитого субстрату —  $X/S$ . Якщо ці дві величини виражені у вагових одиницях, то відношення  $X/S$  називають **економічним коефіцієнтом** ( $Y$ ). Якщо врожай у грамах відноситься до кількості молей спожитого субстрату, то одержану величину називають **модерним економічним коефіцієнтом**.

**Швидкість експоненційного росту** — це міра швидкості росту клітин в експоненційній фазі. Її визначають за формулою виходячи з початкової та кінцевої біомаси  $X_0$  та  $X_t$  у моменти часу  $t_0$  та  $t$ :

$$\mu = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e(t - t_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0},$$

де  $\lg e = 0.43429$ .

Тривалість подвоєння визначається за формулою

$$t_d = \ln 2 / \mu.$$

Для "стандартних" клітин  $\mu = \ln 2$  і  $t_d = g$ .

**Тривалість лаг-фаз ( $T_l$ )** — визначають як проміжок часу між моментом  $t_0$ , в який культура досягла певної біомаси  $X_0$ , і моментом  $t_1$ , в який вона могла б досягти такої самої біомаси, якби відразу ж після інокуляції починався експоненційний ріст.

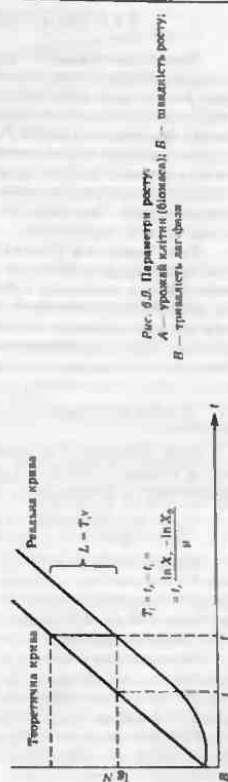
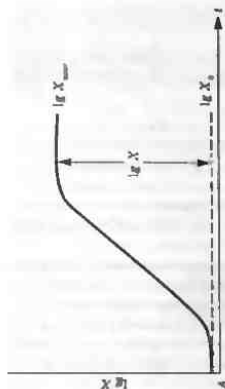
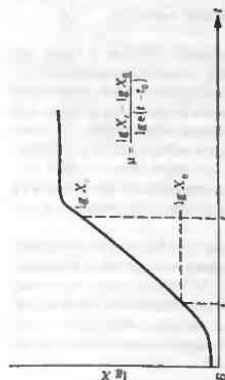


Рис. 6.9. Параметри росту:  
А — урожай клітин (біомаса); В — швидкість росту;  
В — тривалість лаг-фаз



## 6.4.7. Ріст у безперервній культурі

Метод безперервного культивування полягає в тому, що в посудину (ферментатор, культиватор), в якій вирощуються бактерії, весь час надходить свіже поживне середовище і одночасно з такою самою швидкістю відводиться культуральна рідина, яка вміщує бактеріальні клітини та продукти метаболізму. За такого культивування можна якоюсь мірою наблизитись до ідеальної ситуації, коли клітини тривалий час перебувають у фазі експоненційного росту за постійної концентрації субстрату та інших незмінних умов. Розглянемо безперервне культивування в режимі хемостату та турбідостату.

**Ріст у хемостаті.** У цьому режимі ріст бактерій контролюється концентрацією субстрату. Підтримуючи постійну концентрацію одного з необхідних субстратів (джерело азоту чи вуглецю) регулюванням швидкості потоку середовища (швидкості надходження поживного середовища), можна стабілізувати ріст культури. Основним показником безперервного культивування є швидкість розбавлення середовища  $D$ :

$$D = f/V,$$

де  $f$  — швидкість надходження поживного середовища, л за 1 год;  $V$  — об'єм культиватора, л.

Отже, величина  $D$  відображає об'єм рідини, який змінюється за 1 годину. Швидкість зміни біомаси в культиваторі  $dX/dt$  визначається за рівнянням

$$dX/dt = \mu X - DX = X(\mu - D).$$

де  $\mu X$  — приріст біомаси,  $DX$  — втрати в результаті вимивання клітин.

Якщо швидкість росту  $\mu$  і швидкість розбавлення середовища  $D$  є однаковими, то втрати в результаті вимивання клітин і приріст біомаси зрівноважують одне одного, тобто зміна дієвості нулю і біомаса  $X$  залишається постійною. Культура при цьому перебуває в стані динамічної рівноваги.

Ріст культури в хемостаті контролюється концентрацією субстрату. На такому обмеженні швидкості росту концентрацією одного з необхідних субстратів (*лімітуючий фактор*) ґрунтується стабільність системи. Залежність швидкості росту від концентрації субстрату  $c_s$  описується кривою насичення (рис. 6.10). Концентрацію субстрату, за якої швидкість росту досягає половини максимального значення, позначають  $K_s$ . Цей показник

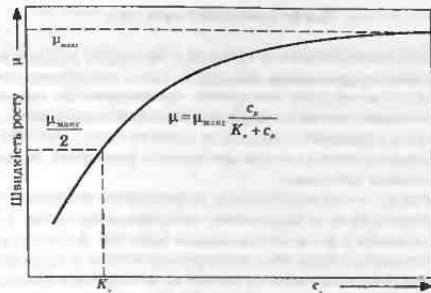


Рис. 6.10. Залежність швидкості росту від концентрації субстрату

є одним з найважливіших параметрів, які характеризують ріст бактерій у хемостаті.

**Ріст у турбідостаті.** Принцип роботи турбідостату ґрунтується на регулюванні швидкості потоку середовища густиною (мутністю) популяції. Датчик мутності регулює через керуючу систему надходження поживного середовища. Турбідостатичний контроль може ґрунтуватися на інших методах вимірювання біомаси або продуктів, які утворюються в процесі їхнього росту. Наприклад, *pH-статний* спосіб керування швидкістю потоку, використання *оксисмату* — керування швидкістю потоку за швидкістю споживання кисню.

Принципові відмінності між періодичною та безперервною культурами:

*періодичну культуру* можна розглядати як замкнуту систему (якоюсь мірою подібну до багатоклітинного організму), яка в своєму розвитку проходить кілька фаз (лаг-фаза, експоненційна та ін.). Умови існування у всіх цих фазах різні. Автоматичне регулювання в періодичній культурі навряд чи можливе;

*безперервна культура* — це відкрита система, яка намагається досягти динамічної рівноваги. Фактор часу певною мірою виключається. Для організмів створюються незмінні умови середовища. Легко піддається автоматичному регулюванню.

### 6.4.8. Синхронні культури

Для вивчення синтезу окремих компонентів клітини в процесі її поділу, проведення цитогенетичних і генетичних досліджень використовують *синхронні культури*. Це культури, в яких певний час всі клітини діляться одночасно (синхронно) за рахунок однакової готовності до росту та поділу окремих особин. Синхронізація культури досягається фізичними та хіміко-біологічними методами:

*фізичні* — температурна дія, диференційне центрифугування, диференційне фільтрування, чергування світлових і темнових режимів у фотосинтезувальних бактерій. За диференційного центрифугування або фільтрування можна відділити клітини легкої фракції (менших розмірів), які діляться синхронно впродовж кількох перших генерацій. Ці два методи є найбільш м'якими методами синхронізації культур;

*хіміко-біологічні* — вирощування бактерій на неповноцінних поживних середовищах з наступним перенесенням їх у повноцінні середовища, вимушене голодування бактерій.

#### Контрольні запитання до розділу 6

1. Як поділяються мікроорганізми по відношенню до температур, кисню та pH?
2. Які методи використовують для вирощування аеробних та анаеробних культур?
3. Як діє на мікроорганізми промениста енергія?
4. Як впливають на мікроорганізми хімічні сполуки? Які пошкодження клітин спричиняють антимікробні речовини?
5. Які методи використовуються для стерилізації та консервування?
6. Які спільні антистресові адаптаційні механізми функціонують у клітинах еу- та прокаріот?
7. Чому дослідження адаптаційних механізмів є важливим для біотехнологій?
8. Які біоелементи є головними та міноними і чому? Які з них виносам повинні відповідати поживні середовища для вирощування мікроорганізмів?
9. Які є основні механізми синтезу АТФ?
10. Як поділяються мікроорганізми за типом живлення?
11. Назвіть типи трансформації суміші ростових і неростових субстратів у мікроорганізмів.
12. Як поділяються поживні середовища за складом, призначенням і фізичним станом?
13. У чому полягає суть методу накопичувальних культур?
14. Дайте визначення поняття "ріст". Які типи бінарного поділу характерні для грампозитивних і грамотрибутих бактерій?

15. Які існують методи визначення концентрації бактерій і біомаси? Чим відрізняються між собою ці два показники?

16. Охарактеризуйте фазу росту бактерій у періодичній культурі.

17. Назвіть параметри кривої росту.

18. У чому полягає суть безперервного культивування? Які є режими безперервного культивування?

19. Назвіть принципові відмінності між періодичною та безперервною культурами.

## 7. СИСТЕМАТИКА ПРОКАРІОТ

### 7.1. ПІДХОДИ (ПРИНЦИПИ) КЛАСИФІКАЦІЇ БАКТЕРІЙ

У різні часи в основу класифікації бактерій були закладені практичні дані, принципи, закономірності, зумовлені рівнем знань і розвитком науки для певного моменту часу. Систематика бактерій розвивалась стихійно, оскільки кожен дослідник вносив елементи суб'єктивізму у класифікацію певної групи мікроорганізмів. Це залежало від його наукової ерудиції, методів, використовуваних у дослідженнях, специфічності досліджуваної групи мікроорганізмів. Тому класифікації різних груп мікроорганізмів нерівноцінні за закладеною в них інформацією.

Для класифікації бактерій використовували різні методи досліджень, але основним з них є *морфолого-фізіологічний підхід*, тобто сукупність *морфолого-культуральних* та *фізіолого-біохімічних ознак*.

**Морфолого-культуральні ознаки** — це морфологія клітини (коки, палички, спірили, розміщення клітин — поодинокі чи в агрегатах), наявність ендоспору, капсули, джгутиків, їх розміщення, забарвлення за Грамом, а також характер росту на агаризованих (характеристика колоній) та в рідких поживних середовищах.

**Фізіолого-біохімічні (або фізіологічні) ознаки** — відношення до кисню, яким чином одержують енергію, залежність росту від температури, pH, асиміляція різних поживних речовин (джерела вуглецю, азоту та ін.), потреба в додаткових факторах росту, відношення до антибіотиків тощо.

Сукупність морфолого-культуральних і фізіолого-біохімічних ознак була покладена в основу розподілу бактерій на групи різного рангу, тобто була критерієм класифікації бактерій. У результаті такого підходу виникла *фенотипова класифіка-*

*ція бактерій*, яка широко прийнята і у наш час. **Фенотип** — це сукупність усіх ознак і властивостей організму, що сформувались у процесі його індивідуального розвитку. Фенотип визначається взаємодією генотипу з умовами навколишнього середовища, в яких розвивається організм. **Генотип** — сукупність спадкових ознак організму.

Слід зазначити, що було зроблено спроби побудувати систематику бактерій на інших принципах і підходах. Для цього використовувались *серологічні методи*, основані на тому, що антигенні сполуки найкраще зв'язуються з антитілами спорідненого організму, ніж з антитілами організмів, більш далеких за ступенем спорідненості. Проте серологія не знайшла широкого застосування у класифікації бактерій із-за значної складності серологічних реакцій, хоча слід визнати, що ці реакції досить специфічні. Систематики намагались використовувати хімічний склад, а також особливості метаболізму бактерій для визначення їх систематичного положення. З цією метою аналізували такі ознаки, як концентрація білків, склад ліпідів і жирних кислот, склад клітинних стінок, особливості складу зовнішньої мембрани (у грам-негативних бактерій), цитохромний склад клітини. Проте за допомогою цих *хемотаксономічних підходів* були вирішені тільки деякі окремі питання систематики бактерій.

Фактично між систематикою класичною, основою на морфолого-фізіологічному підході, і систематикою хімічною існує принципова різниця. І в першому, і в другому випадках класифікація бактерій базується на фенотипових ознаках.

Ще одним підходом класифікації бактерій є *математичний підхід*, зокрема *нумеричний аналіз*, або *нумерична таксономія*. Принцип нумеричної таксономії був розроблений у XVIII ст. французьким ботаніком М. Адансоном і використовується в мікробіології з XX ст. після створення електронно-обчислювальної техніки (ЕОМ). Згідно з принципами М. Адансона різні ознаки, які піддаються обліку, мають однакове значення для характеристики організму. Для кількісної оцінки враховують якомога більшу кількість ознак, які підбирають так, щоб вони були альтернативними, тобто, щоб їх варіанти можна було позначити знаками "плюс" і "мінус". Оцінку різних комбінацій ознак проводять на ЕОМ. При цьому кожну з ознак одного штаму порівнюють з кожною ознакою всіх інших штамів. Вважається, що подібність між двома досліджуваними штамами тим вища, чим біль-

ше відношення кількості збіжних ознак до кількості врахованих ознак.

Для парного порівняння користуються коефіцієнтом подібності (величина  $S$ ):

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

де  $a$  і  $d$  — суми ознак, за якими штамми А і В збігаються ( $a$  — обидва штамми позитивні,  $d$  — обидва негативні);  $b$  — сума ознак, за якими штам А позитивний, а штам В — негативний;  $c$  — сума ознак, за якими штам А негативний, а штам В — позитивний.

У результаті розрахунків одержують величини від 0 до 1.  $S=1$  означає 100%-ну подібність, тобто ідентичність, а  $S < 0,02$  — абсолютну неподібність. Одержані величини можуть бути подані у вигляді дендрограми. Слід зазначити, що і нумеричний підхід базується на аналізі фенотипових ознак і його (як і хемотаксономічний підхід) можна вважати різновидом фенотипової систематики.

Принципово новим підходом, який відрізняється від фенотипової систематики, є *геносистематика* бактерій. Ступінь генетичних відмінностей у організмів можна оцінити за такими показниками: вміст ГЦ в ДНК; гібридизація ДНК—ДНК і ДНК—РНК; амінокислотна послідовність білків; нуклеотидна послідовність генів. Саме завдяки використанню молекулярно-біологічних і генетичних методів досліджень у систематиці бактерій став можливим бурхливий розвиток *філогенетичної класифікації* бактерій, яка відображає еволюційні зв'язки між організмами.

## 7.2. ТЕРМІНОЛОГІЯ, ЩО ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ В СИСТЕМАТИЦІ

У наш час часто виникає ситуація, коли намагання розглянути будь-які питання систематики як окремих груп мікроорганізмів, так і всієї системи в цілому часто супроводжуються протиріччями, зумовленими неточностями деяких термінів. Формалізація термінології є необхідним етапом систематики бактерій.

Найчіткіше основні поняття і терміни, що використовуються в систематиці бактерій, були сформульовані академіком РАН Г.О. Заварзіним у монографії "Фенотипова систематика бактерій" (1974 р.).

*Систематика* — теорія різноманітності організмів, що вивчає відношення між їх групами (класами, таксонами).

*Класифікація* — поділ численності (безлічі) організмів на групи (класи, таксоми).

*Таксономія* — найменування груп організмів (таксонів), встановлення їх меж і підпорядкування.

*Номенклатура* — збірник правил найменування таксонів, доповнений списком цих найменувань.

*Діагностика (ідентифікація)* — спосіб віднайдення заданого таксону та визначення належності об'єкта таксону.

Отже, систематика охоплює класифікацію, таксономію, номенклатуру та ідентифікацію. Розглянемо ці поняття детальніше.

*Класифікація*. Існують різні варіанти класифікації (філогенетична, фенотипова, генотипова, природна, штучна та ін.), що зумовлено метою та завданням, покладеними в основу системи. Досить тривалий час вважалося, що сучасні класифікації є філогенетичними і про спільність походження організмів можуть свідчити однакові метаболічні шляхи (це базується на тому, що кожен фермент виник лише один раз під час еволюції), а також однаковий хімічний склад структурних компонентів клітини, оскільки кожен такий компонент відображає певний біосинтетичний шлях. Але у дійсності всі ці класифікації були фенотиповими, оскільки базувались на подібності морфолого-фізіологічних властивостей організмів.

Згідно з Г. Шлегелем (1987 р.), існує два види класифікацій: *природні (філогенетичні)* та *штучні*. *Філогенетична* класифікація відображає еволюційні зв'язки між організмами. Побудова філогенетичної класифікації — кінцева мета систематики бактерій. На відміну від філогенетичної штучна класифікація служить лише для ідентифікації мікроорганізмів і може бути обмеженою, наприклад, базуватись на ознаках, зручних і вигідних для практики.

Основною одиницею класифікації є *штам* — чиста культура ізольованої з природного субстрату бактерії. Штами об'єднуються у *види* (species), види — в *роди* (genus, у множині — genera). Подібні роди об'єднуються в *триби* (латинські назви закінчуються на -aeae), триби — в *родини* (латинські назви родин закінчуються на -aceae). Родина може об'єднувати роди і без трибів, що останнім часом у класифікації бактерій спостерігається найчастіше. Родини об'єднуються в *порядки* (латинські

назви порядків закінчуються на -ales), порядки — в класи. Класи можуть об'єднуватися у відділи.

Номенклатура. На відміну від різноманітності класифікацій номенклатура бактерій менше зазнає змін, оскільки вона підпорядковується міжнародним правилам. У другій половині XVIII ст. Карл Лінней запропонував номенклатурні принципи, які були прийняті біологами. Пізніше було прийнято два кодекси номенклатури: ботанічний і зоологічний. Мікробіологи тривалий час використовували в основному ботанічну номенклатуру. І нарешті, у 1930 р. на Першому міжнародному мікробіологічному конгресі було організовано комісію з номенклатури й таксономії бактерій. Бактеріологічний кодекс номенклатури бактерій був опублікований у 1948 р. Шостий конгрес у Римі (1953 р.) схвалив видання Міжнародного кодексу номенклатури бактерій і вірусів. Дев'ятий міжнародний мікробіологічний конгрес (Москва, 1966 р.) запропонував для вірусів ввести нову відмінну систему номенклатури. Переглянутий кодекс бактерій було прийнято Міжнародним конгресом з бактеріології у 1973 р. в Єрусалимі та опубліковано у 1975 р. (російською мовою — у 1978 р.). Проте у мікробіології на той час накопичилося багато застарілих назв мікроорганізмів, у результаті чого юридична комісія Міжнародного комітету з систематики бактерій запропонувала переглянути існуючі назви бактерій з метою впорядкування номенклатури. Підсумкові матеріали (Схвалений список найменування бактерій) були опубліковані у 1980 р. у журналі "International Journal of Systematic Bacteriology". Отже, 1980 р. став новим рубіжем у розвитку систематики бактерій. Майже два з половиною століття відділяють його від 1 травня 1753 р. — вихідної дати створення номенклатури бактерій.

Для бактерій, так само як для рослин і тварин, використовується **бінарна номенклатура**: родова та видова назви, які записуються в латинській транскрипції. Найменування роду пишеться з великої літери, виду — з малої. Видова назва, як правило, відображає якусь характерну ознаку чи властивість даного виду. Наприклад, *Sarcina flava* — сарцина жовта, *Bacillus typhoides* — грибоподібна паличка.

Ідентифікація. У мікробіологічних дослідженнях, на жаль, використовується дуже мало стандартних методів і дуже часто для ідентифікації пропонуються ознаки, виявлені специфічними методами. Але ідентифікація повинна базуватись на про-

тих, доступних для дослідника, методах. Для цього використовують **дихотомічні ключі**, в яких пропонуються альтернативні твердження, які логічно ведуть до діагностики невідомого організму.

Техніка ідентифікації добре та доступно викладена у розд. I–V дев'ятого видання Визначника бактерій Бергі (далі — Визначник Бергі). Перше видання цього Визначника було опубліковано у 1923 р. групою американських бактеріологів під керівництвом Д.Х. Бергі. При цьому слід мати на увазі, що починаючи з дев'ятого видання відбувся поділ цієї єдиної раніше праці на чотири томни — *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Керівництво Бергі з систематики бактерій) та коротку — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Керівництво Бергі з ідентифікації бактерій). Саме останню працю було перекладено російською мовою у 1997 р. Вона називається "Визначник бактерій Бергі", використовується для ідентифікації бактерій за фенотиповими ознаками і містить концентровану інформацію про всі види бактерій. Створене з практичною метою, це видання не претендує на еволюційну побудову.

Припустимо, що нам потрібно ідентифікувати виділений мікроорганізм. Загальний підхід до вирішення цього завдання складається з кількох основних етапів:

1) Визначник Бергі служить для ідентифікації бактерій. Тому необхідно бути переконаним, що виділений ізолят є прокаріотом. У розд. III наведено таблицю ознак, за якими прокаріоти відрізняються від еукаріот;

2) у Визначнику всі бактерії поділяються на чотири основні категорії (грамнегативні еубактерії, які мають клітинну стінку; грампозитивні бактерії, які мають клітинну стінку; еубактерії, які не мають клітинної стінки; архебактерії). Ознаки, які дають можливість визначити ці категорії, наведені у розд. IV;

3) наступний крок після визначення основної категорії бактерій полягає в тому, щоб встановити розділ Визначника, в якому вона розглядається. У розд. V наведено перелік груп всередині кожної основної категорії і короткий опис особливостей бактерій, які належать до кожної групи. Кожна з основних чотирьох категорій бактерій поділяється на групи: перша категорія складається з 16 груп бактерій (№ 1...16), друга — з 13 (№ 17...29), третя — з однієї групи (№ 30), четверта — з п'яти груп (№ 31...35). Отже, у Визначнику бактерій описано 35 груп бактерій;

4) визначення роду бактерій. Для більшості груп наведено таблиці або ключі, де вказано ознаки, за якими можна диференціювати роди всередині групи;

5) визначення виду бактерій. У описі більшості родів містяться таблиці, за допомогою яких можна диференціювати види всередині даного роду.

**Таксон.** Таксон є основною категорією у бактеріальній систематиці. Розрізняють такі ранги таксонів: відділ, клас, порядок, родина, рід, вид. Є багато визначень поняття "таксон": будь-яка таксономічна група, одержана в результаті застосування певного методу класифікації;

група організмів, якій притаманна задана ступінь однорідності; таксономічна група будь-якого рангу, яка є достатньо відособленою для того, щоб їй можна було присвоїти окрему категорію.

Слід зазначити, що поняття "таксон" завжди стосується конкретних організмів. Більше того, таксон повинен бути формально описаний згідно з правилами Міжнародного кодексу номенклатури бактерій. Згідно з цим кодексом таксон складається з одного чи більше організмів. Для всіх таксономічних категорій повинен бути визначений номенклатурний тип. Він не обов'язково повинен бути найбільш типовим елементом таксона (правило 15 кодексу). Для виду — це типовий штам, для роду — типовий вид і т.д. Так, типовим видом пропонується альтернативно вважати: вид, який є одним-єдиним представником роду; вид, який у першій публікації роду був його єдиним представником; вид, з яким постійно пов'язана назва роду і який, як правило, є представником роду, що розпізнається першим (найлегше розпізнається).

Найчастіше систематик оперує такою таксономічною категорією, як вид. Суть цього поняття, як відомо з біології, важко піддається визначенню, тому розглянемо його детальніше.

### 7.3. КОНЦЕПЦІЯ ВИДУ В БАКТЕРІОЛОГІЇ

Дати чітке визначення виду у бактерій досить складно. Це зумовлено їх біологічними особливостями. Якщо в основі визначення виду у рослин і тварин лежать чітко виражені морфологічні та фізіологічні відмінності, зокрема неможливість схрещування між представниками двох популяцій, то у бактерій ці критерії

відсутні. Бактерії морфологічно нерізноманітні, розмножуються безстатевим шляхом, характеризуються наявністю плазмідної спадковості, здатністю обмінюватися генетичним матеріалом між генетично далекими групами. Щоб підійти до визначення виду у бактеріології, розглянемо історію розвитку цього поняття в біології взагалі.

Стихійне уявлення про види живих істот складалося ще в давні часи. З розвитком біології як науки в додарвінівський період з'являються дві основні концепції — *номіналістична* та *типологічна*. Номіналісти вважають, що види реально не існують. Типологічну концепцію можна назвати морфологічною, оскільки в даному разі критерієм виду є морфологічна подібність.

У 40-х роках ХХ ст. завдяки роботам Ернста Майра сформувалася нова концепція виду — *біологічна*. Вона базується на тому, що види складаються з популяцій, вони реальні, їм притаманна внутрішня генетична інтегрованість внаслідок того, що всі особини (представники) виду мають спільну генетичну програму, яка історично склалася в ході еволюції. Згідно з біологічною концепцією *вид* — це група організмів, здатних до схрещування, які утворюють природні популяції і які репродуктивно ізольовані від інших груп (тобто не можуть схрещуватися з представниками інших груп).

Основними критеріями виду в біології були визнані такі: *фізіологічний* (генетичний критерій) — вільне схрещування всередині виду і неможливість до схрещування (репродуктивна ізоляція) з іншими видами;

*географічний*, суть якого полягає в тому, що кожний вид має певний ареал існування;

*екологічний* — кожний вид у межах свого ареалу займає певну зону, характеризується певним типом взаємовідносин з особинами інших видів і всередині даного виду.

Серед мікробіологів поширена думка, що види бактерій реально не існують. Це пов'язано з браком інформації про реальне існування бактерій у природі, достатньо великою фізіологічною різноманітністю ізолятів, які виділяються з природи. Крім того, стало відомо, що бактерії можуть обмінюватися генетичною інформацією за допомогою плазмід, фагів і шляхом трансформації. При цьому виявилось, що деякі кон'югативні плазмиди можуть передаватися і підтримуватися в бактеріях різних систематичних груп (наприклад, плазмиди Р-1 групи несуміс-



ності). Це дало привід багатьом мікробіологам дійти до висновку, що геноми бактерій не є захищеними і стабільними настільки, наскільки це характерно для еукаріотів. Насправді, у міру того як генетики детально вивчали процеси передачі генетичного матеріалу у бактерій, з'ясувалося, що такі висновки не відповідають дійсності. Так, до факторів, що обмежують проникнення чужорідних генів у клітини прокариот, можна віднести: систему рестрикції-модифікації; рівень активності ферментів, відповідальних за механізми рекомбінації; систему зовнішньої мембрани, через яку чужорідна ДНК може проникнути, використовуючи тільки певні механізми, які кодуються кон'югативними плазмідами; певну послідовність генів у хромосомах.

На основі цього можна зробити висновок, що для визначення виду у бактерій цілком придатними є критерії, що характеризують вид у еукаріот. Тобто *вид у бактерій* — це група організмів, які мають схожий набір і порядок генів на хромосомі та здатні (хоча б потенційно) обмінюватися хромосомними генами і здійснювати їх гомологічну рекомбінацію з невеликою частотою.

Проте таке трактування поняття виду у бактерій довго залишалося неузаконеним. Так, Дж. Стенлі та Н. Криг у вступі до дев'ятого видання Керівництва Бергі з систематики бактерій розглядають *вид у бактерій* як колекцію штамів, які характеризуються сукупністю багатьох спільних властивостей і суттєво відрізняються від інших штамів. Вони, правда, визнають, що для чіткішого визначення виду може бути використаний рівень гомології ДНК — показник генетичної спорідненості організму. Практичні рекомендації з цього питання викладені в рішеннях Комітету з узгодження підходів до таксономії бактерій, опублікованих ще в кінці 1987 р. Зокрема, в них зазначається, що вид є єдиною таксономічною одиницею, яка може бути визначена філогенетично. Вид повинен включати штами з рівнем подібності ДНК — ДНК 70 % і вище, а також з  $\Delta T_m$  5 °C і нижче. Фенотипові характеристики повинні узгоджуватися з цим визначенням і можуть не відповідати філогенетичній концепції виду тільки як виняток.

Використання молекулярно-біологічних методів у мікробіології внесло певні корективи до уявлень мікробіологів щодо суті виду бактерій. У 2002 р. відбулося засідання Спеціального міжнародного комітету з систематики прокариот. Рекомендуються визначення нуклеотидної послідовності (сіквенс) генів, що кодують синтез 16S рРНК і білків, а також ДНК — ДНК-гібриди-

зацію як молекулярні критерії для окреслення виду. Комітетом процитовано визначення виду, наведене Р. Розелло-Морай Р. Аман (2001 р.): "Вид — це категорія, яка обмежує генотипово пов'язану групу штамів, що мають високий ступінь подібності за незалежними ознаками, визначеними за певних стандартних умов".

## 7.4. ІСТОРИЧНІ АСПЕКТИ СИСТЕМАТИКИ БАКТЕРІЙ

Історія розвитку систематики бактерій має кілька етапів. Перша спроба наукової класифікації бактерій належить датському зоологу О.Ф. Мюллеру (1773 р.), який розділив відомі на той час 15 видів бактерій на два роди — *Monas* та *Vibrio*. У 1870 р., застосовувавши морфологічний підхід до систематики, класифікацію бактерій здійснив польський фізіолог Фердинанд Кон. У його класифікації бактерій використані принципи, запропоновані Карлом Ліннеєм для ботанічної класифікації. У подальшому становленні систематики бактерій певну роль відіграла робота Ч. Дарвіна "Про походження видів". Систематика живих організмів у роботах Ч. Дарвіна стала еволюційною, оскільки в її основу покладена спільність походження організмів. Еволюційна теорія систематики, основана Ч. Дарвіном, знайшла своє відображення в створенні філогенетичної класифікації вищих організмів, яка була підтверджена ембріологічними та палеонтологічними дослідженнями. Але ці методи не можна було використовувати для систематики нижчих організмів.

Подальше поглиблене вивчення фізіології та біохімії бактерій дало змогу С.М. Виноградському та М.В. Бейерінку запропонувати новий підхід до систематики бактерій, який базується на комбінації морфологічних і фізіологічних ознак. У цій фізіологічній системі основним критерієм для класифікації була здатність бактерій використовувати ті чи інші субстрати для енергетичного обміну або виділяти характерні продукти метаболізму. Цей принцип був використаний датським вченим С. Орла-Іенсеном, який у 1909 р. повністю ревізував номенклатуру і систематику бактерій. В її основу були покладені фізіологічні ознаки. Разом з тим класифікація С. Орла-Іенсена була першою спробою здійснити філогенетичну класифікацію бактерій. Так, він припустив,

що 4 млрд років тому на Землі не було органічних субстратів, отже, перші бактерії повинні були бути автотрофними. Друга спроба була здійснена голландськими вченими А.Я. Клейвером і К.В. Ван Нілем у 1936 р., які припустили, що коки є найбільш примітивними бактеріями, оскільки мають найпростішу морфологічну форму; палички розвинулись з витягнутих або силующих коків, вібріони — з паличок, спірили — з вібріонів.

Наступний етап пов'язаний з іменем Р. Б'юкенена, який проводив принцип номенклатурних типів у систематиці. Принципи Р. Б'юкенена, А.Я. Клейвера, К.В. Ван Ніла та інших систематиків були використані при виданні *Визначника бактерій Бергі*, перший з яких був опублікований у 1923 р., а останнє, дев'яте, видання — у 1984 р. (перший том) та у 1986 р. (другий том). *Визначник Бергі* — визнання у всьому світі наукова праця, яка об'єднує знання з різноманітності прокаріот. Кожне нове видання *Визначника Бергі* відображає суттєві досягнення в галузі систематики бактерій. Над *Визначником* працює великий міжнародний колектив кращих спеціалістів, які вивчають ту чи іншу групу мікроорганізмів.

У 1977 р. була опублікована робота з таксономії метаноутворювальних бактерій, в якій на основі аналізу нуклеотидних послідовностей рибосомальної РНК було запропоновано виділити нове царство археобактерій (*Archaeobacteria*). У дев'ятому виданні *Керівництва Бергі з систематики бактерій* було визнано, що археобактерії притаманний ряд унікальних особливостей і є всі докази того, що їх еволюція відрізнялась від еволюції інших бактерій. Але царство археобактерій було узаконено тільки у 1988 р.

Слід зазначити, що останнім часом з'являється багато інформації про нові таксономії бактерій. Публікації нових таксономій містяться в журналі "International Journal of Systematic Bacteriology", який з 2000 р. перейменовано на "International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology".

## 7.5. ХАРАКТЕРИСТИКА ТАКСОНІВ ЗА ДЕВ'ЯТИМ ВИДАННЯМ КЕРІВНИЦТВА БЕРГІ З СИСТЕМАТИКИ БАКТЕРІЙ

Згідно з *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* всі бактерії об'єднані в царство *Procarvotae* і поділяються на чотири відділи:

I. *Gracilicutes* (грамнегативні еубактерії, які мають клітинну стінку);

II. *Firmicutes* (грампозитивні еубактерії, які мають клітинну стінку);

III. *Tenericutes* (еубактерії, які не мають клітинної стінки);

IV. *Mendosicutes* (археобактерії).

Назви відділів бактерій утворені від латинських слів: *cutes* — шкіра; *graculus* — тонкий, стрункий; *firmus* — міцний; *tener* — м'який, ніжний; *mendosus* — помилковий.

Відділи поділяються на класи, класи — на частини, частини — на порядки, триби, родини, роди.

### 7.5.1. Відділ *Gracilicutes*

Сюди належать прокаріоти зі складною (грамнегативного типу) будовою клітинної стінки. Стінки складаються із зовнішньої мембрани, тонкого внутрішнього шару пептидоглікану і додаткових інших компонентів зовні чи між цими двома шарами. Грамнегативні. Клітини сферичної чи овальної форми, у вигляді прямих чи вигнутих паличок, спіралей, нитчастих; деякі з цих форм можуть бути оточені чохлам або капсулою. Розмножуються бінарним поділом, але для деяких груп характерне брунькування і для деяких організмів (*Pleurocapsales*) — множинний поділ. Міксобактерії можуть утворювати плодові тіла та мікроспори. Ендоспор не утворюють. Багато представників — рухливі (рух за допомогою джгутиків чи ковзанням). Серед представників є фототрофи та нефототрофи (як літотрофи, так і гетеротрофи), аероби, анаероби, факультативні анаероби та мікроаерофіли.

Відділ поділяється на три класи:

*Scotobacteria* (складається з 14 частин — № 1...14) (табл. 7.1);

*Anoxyphotobacteria* (складається з однієї частини — № 15);

*Oxyphotobacteria* (складається з однієї частини — № 16).

#### Клас *Scotobacteria*

Частина I. Спірохети. Грамнегативні клітини спіралеподібної форми, надзвичайно гнучкі, рухливі за рахунок периплазматичного джгутика, а не джгутика, який виступає з клітини в зовнішнє середовище. Хемоорганогетеротрофи. Спор не утво-

Таблиця 7.1

Клас *Scotobacteria*

Номер частини	Назва частини	Представники
1	Спірохети	Порядок: Spirochaetales містить дві родини: Spirochaetaceae (роди: <i>Spirochaeta</i> , <i>Cristispira</i> , <i>Treponema</i> , <i>Borrelia</i> ) та Leptospiraceae (рід <i>Leptospira</i> )
2	Аеробні мікроаерофіли, рухливі, спірально-вигнуті грамнегативні бактерії	Родина Spirillaceae (роди: <i>Spirillum</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Oceanospirillum</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Vampirovibrio</i> , <i>Bdellovibrio</i> )
3	Нерухливі (або рідко рухливі) грамнегативні вигнуті бактерії	Родина Spirochetaceae (роди: <i>Spirosoma</i> , <i>Microcylus</i> , <i>Brachyarcus</i> , <i>Pelosiigma</i> , <i>Runella</i> , <i>Flectobacillus</i> , <i>Meniscus</i> )
4	Грамнегативні аеробні палички та кокки	Вісім родин: Pseudomonadaceae, Azotobacteriaceae, Rhizobiaceae, Methylococcaceae, Halobacteriaceae, Acetobacteriaceae, Legionellaceae, Neisseriaceae
5	Факультативно анаеробні грамнегативні палички	Три родини: Enterobacteriaceae (роди: <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Morganella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Enterobacter</i> ), Vibrionaceae (роди: <i>Aeromonas</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Photobacterium</i> ) та Pasteurellaceae (роди: <i>Haemophilus</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Actinobacillus</i> )
6	Грамнегативні анаеробні прями, вигнуті та спіральні палички	Одна родина Bacteroidaceae (роди: <i>Butyrivibrio</i> , <i>Succinivibrio</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Leptotrichia</i> , <i>Wolinella</i> , <i>Anaerovibrio</i> , <i>Acetivibrio</i> )
7	Сульфатсенсибілізовані або сульфатотривожливі бактерії	Родина Desulfobacteriaceae (роди: <i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> )
8	Анаеробні грамнегативні кокки	Родина Veillonellaceae (роди: <i>Veillonella</i> , <i>Acidaminococcus</i> , <i>Megasphaera</i> )
9	Рикетсії та хламідії	Порядок Rickettsiales містить три родини: Rickettsiaceae, Bartonellaceae, Anaplasmataceae; порядок Chlamydiales — одну родину Chlamydiaceae (рід <i>Chlamydia</i> )
10	Ковані бактерії	Порядок Myxobacterales (родина Myxobacteriaceae, роди: <i>Myxococcus</i> , <i>Cytophaga</i> , <i>Nannosynthea</i> ); порядок Cytophagales (родина Cytophagaceae, рід <i>Cytophaga</i> ; родина Beggiatoaceae, рід <i>Beggiatoa</i> )
11	Бактерії, які мають чохли	Родина Leptothrix, Crenothrix, Streptothrix, Sphaerothrix

Закінчення табл. 7.1

Номер частини	Назва частини	Представники
12	Бактерії, які брунькуються, і/або стеблинкові	Роди: <i>Caulobacter</i> , <i>Prosthecomicrobium</i> , <i>Neutria</i> , <i>Acanthomicrobium</i> , <i>Pedomicrobium</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Hyphomonas</i>
13	Грамнегативні хемолітотрофні бактерії	Родина Nitrobacteriaceae (роди: <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Nitrososoccus</i> , <i>Nitrospira</i> , <i>Nitrobacter</i> ); Роди: <i>Thiobacillus</i> , <i>Thiobacterium</i> , <i>Thiosulfobacillus</i>
14	Ендосимбіонти	Бактерії — ендосимбіонти найпростіших та комах

рюють, розмножуються поперечним поділом. Анаероби, мікроаерофіли, факультативні анаероби або аероби.

Зустрічаються як вільно існуючі або в асоціаціях з тваринами, молюсками, членистоногими або людиною. Деякі патогенні.

Представниками вільно існуючих видів, мешканців стічних і забруднених вод, прісної та морської води, що містить сірководень, є бактерії роду *Spirochaeta*. Вони зброджують глюкозу з утворенням оцтової, молочної, цитрусової, мурашиної кислот, етанолу, вуглекислого газу та водню.

Асоціантами є представники роду *Cristispira* — мешканці харчових каналів прісноводних і морських молюсків. Серед паразитів (*Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*) є патогенні види: *Treponema pallidum* — збудник сифілісу, *Leptospira interrogans* — збудник лептоспірозу.

Частина 2. Аеробні мікроаерофіли, рухливі, спірально-вигнуті грамнегативні бактерії. Грамнегативні клітини спірально-подібної (з одним чи кількома повними витками спіралі) або віброїдної (які мають менше одного повного оберту спіралі) форми. Рухливі за рахунок полярно розміщених джгутиків, переміщуються по прямій характерним ігнотним рухом. Аероби чи мікроаерофіли. Метаболізм дихального типу з використанням кисню як акцептора електронів. Деякі здатні до анаеробного дихання з використанням нітрату чи фумарату як акцептора електронів. Хеморганотрофи, але деякі можуть рости як автотрофи, використовуючи  $H_2$  як донор електронів. Зустрічаються в ґрунті, прісній і морській воді, коренях рослин, репродуктивних органах, травному тракті і ротовій порожнині людини і тва-

рин. Деякі патогенні для тварин і людини. Деякі є хижакми щодо інших мікроорганізмів.

Представники роду *Azospirillum* є вільно існуючими мікроаерофільними азотфіксувальними організмами, які зустрічаються на коренях трав і бобових рослин, бактерії роду *Vampirovibrio* — у хлорел. Спірили, в основному сапрофіти, живуть у застояних і забруднених водах, морській воді (*Oceanospirillum*), на рослинних і тваринних залишках, що гниють, на рисових полях. Серед паразитів — бактерії роду *Bdellovibrio*, зокрема *Bdellovibrio bacteriovorus* — внутрішньоклітинний паразит бактерій. Це неспорутовувальна маленька (0,25–0,4 × 0,8–1,2 мкм), трохи вигнута паличка з одним полярним джгутиком. Клітини дуже рухливі. Здатні існувати як всередині бактеріальної клітини, так і сапрофітно на складному поживному середовищі з дріжджовим екстрактом. *B. bacteriovorus* прикріплюється до клітин хазяїна, втрачає джгутик, проникає через клітинну стінку (за допомогою ферментів, що розчиняють оболонку) в периплазматичний простір і там розмножується. Цикл внутрішньоклітинного розвитку триває 3–5 год, після чого клітини-паразити виходять з мертвої клітини і повторюють паразитичну фазу або переходять у стан спокою, утворюючи цисти. У середовищі з великою кількістю клітин хазяїна цисти проростають і знову повторюють паразитичну фазу розвитку. Бактерії цього роду є мешканцями ґрунту, морських і прісних вод. Їх використовують для боротьби із збудниками епідеміологічних захворювань (наприклад, холери).

**Частина 3. Нерухливі (або рідко рухливі) грамнегативні вигнуті бактерії.** Хемоорганогетеротрофи. Сапрофіти. Група об'єднує чотири типи мікроорганізмів:

1) вигнуті чи С-подібні бактерії, здатні утворювати кільця за рахунок перекриття кінців клітини. Можуть зустрічатися клітини у формі завитків і спіралей. Можлива присутність газових вакуолей. Аероби, зустрічаються в ґрунті та воді;

2) вібріони чи прями (або вигнуті) палички. Утворюють газові вакуолі. Аеротолерантні анаероби, мають строго бродильний тип метаболізму;

3) дугоподібні клітини з газовими вакуолями розміщені у вигляді листка конюшини. Зустрічаються клітини кренделеподібної форми. Існують в озерах, ставках, де присутній сульфід і відсутній кисень.

4) тонкі S-подібні клітини, які утворюють за рахунок розміщення впритул одна до одної (кількість клітин 4 чи кратна 4) сплю-

снені агрегати сигмоїдної форми, іноді рухливі. Існують у прісних і солонуватих водах, де присутній сульфід і відсутній кисень.

До першого типу організмів належать бактерії роду *Spirillum*, до третього — *Brachyarcus*, до четвертого — *Pelosiigma*. Бродильний тип метаболізму характерний для бактерій роду *Mentiscus*, дихальний — *Runnela*. Утворюють пігменти біло-бежевого (*Micrococcus aquaticus*), жовтого (*Spirosoma linguale*), рожевого кольору (*Flectobacillus major*).

**Частина 4. Грамнегативні аеробні палички та коки.** Хемоорганогетеротрофи, але деякі можуть рости автотрофно, використовуючи  $H_2$  як донор електронів. Не утворюють простеків, стеблинок, чохлів чи газових вакуолей. Нездатні до руху ковзанням. Не розмножуються брунькуванням. Ростуть в атмосфері повітря. Метаболізм дихального типу з використанням кисню як акцептора електронів. Деякі здатні до анаеробного дихання з іншими, ніж кисень, акцепторами електронів. Зустрічаються в ґрунті, прісній і морській воді, коренях рослин або в репродуктивних органах, кишковому тракті і ротовій порожнині людини і тварин. Деякі патогенні для тварин або людини.

Бактерії об'єднані у вісім родин (див. табл. 7.1). Слід зазначити, що у Керлінцтві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) ця група бактерій об'єднана у 80 родів, 40 з яких не увійшли до Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, оскільки були вперше описані після виходу його у світ (в основному у 1987–1992 pp.).

Псеадомонади (родина *Pseudomonaceae*) — облігатні аероби, деякі види факультативно анаеробні, не фіксують молекулярний азот, рухливі (полярні джгутики) поодинці прями чи вигнуті палички. Представники роду *Pseudomonas* здатні використовувати як джерело вуглецю широкий спектр органічних сполук, у тому числі гетероциклічні та ароматичні сполуки, які не асимілюються іншими мікроорганізмами (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*). *Pseudomonas aeruginosa* — патогенна бактерія, здатна викликати отит, пневмонію, менінгоцефаліт, нагноювання ран. Штами, патогенні для рослин, об'єднані у вид *Pseudomonas syringae*. Бактерії роду *Xanthomonas* є фітопатогенними (патогенними для рослин). *Xanthomonas campestris* — продуцент найвідомішого у світі мікробного екзополісахариду ксантану.

Представники родини *Azotobacteriaceae* являють собою паличкоподібні клітини, які залежно від віку та умов культи-

вування змінюють свою форму. Здатні утворювати цисти. Головна особливість — здатність фіксувати молекулярний азот. *Azotobacter chroococcum* — перший аеробний вільно існуючий азотфіксатор (на 1 г спожитого вуглецю фіксується 10 мг і більше азоту). Препарат азотобактерин, виготовлений на основі живих культур азотфіксаторів, призначений для збагачення ґрунту азотом і підвищення урожайності сільськогосподарських культур. *Azotobacter vinelandii* — продуцент полісахариду альгінату, що за складом аналогічний рослинним полісахаридом, які виділяють з морських водоростей.

Бактерії роду *Rhizobium* (бульбочкові бактерії) здатні фіксувати азот в умовах симбіозу з бобовими рослинами. Видова назва бульбочкових бактерій визначається в основному рослиною-хазяїном (*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*). Бактерії роду *Agrobacterium* (*Agrobacterium tumefaciens*) є внутрішньоклітинними паразитами, вони проникають у тканину рослини-хазяїна через пошкодження і викликають пухлики на коренях, стеблах чи листях рослин.

Родина *Acetobacteriaceae* об'єднує бактерії, здатні окиснювати етиanol до оцтової кислоти в нейтральному або кислому середовищі (рН 4,5).

Бактерії родів *Neisseria*, *Moraxella*, *Kingella* є паразитами (збудники гонореї, менінгіту, захворювань слизових оболонок людини та теплокровних тварин).

**Частина 5. Факультативно анаеробні грамнегативні палички.** Хемоорганогетеротрофи, але деякі можуть рости автотрофно, використовуючи  $H_2$  як донор електронів. Не утворюють простеків, стеблишок, чохлів чи газових вакуолей. Не здатні до руху ковзанням. Не розмножуються брунькуванням. Здатні рости в атмосфері повітря, метаболізм дихального типу, здатні також рости гетеротрофно за рахунок бродіння. Зустрічаються як вільно існуючі форми, так і в асоціаціях з тваринами, людиною чи рослинами. Деякі патогенні.

Бактерії об'єднані у три родини (див. табл. 7.1). У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) родина *Enterobacteriaceae* складається із 30 родів, половина з яких не увійшла до *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, оскільки ці роди були вперше описані після виходу його у світ.

Типовим родом родини *Enterobacteriaceae* є рід *Escherichia* (типовий вид — *Escherichia coli* — кишкова паличка). Ця бакте-

рія на сьогоднішній день найбільш досліджена з усіх прокариотів, її можна назвати "відкритою книгою", оскільки вона є основним об'єктом усіх молекулярно-біологічних, генетичних і біохімічних досліджень. Кишкова паличка є умовно патогенною. У кишках хребетних тварин вона є комменсалом (комменсалізм — форма симбіозу мікроорганізмів з макроорганізмом, за якої мікроорганізм живиться за рахунок макроорганізму, не завдаючи йому ні користі, ні шкоди). Але у певних умовах (ослаблення макроорганізму) вона спричиняє захворювання кишків. Патогенні види кишкової палички викликають колієнтерії у людини. Разом з виділеннями з травного каналу *Escherichia coli* потрапляє в навколишнє середовище — воду, ґрунт, харчові продукти. Її вважають показником фекального забруднення середовища.

Патогенні види є серед представників роду *Salmonella* (збудник черевного тифу), *Shigella* (збудник дизентерії), *Klebsiella*. Фітопатогенні види зустрічаються серед бактерій родів *Erwinia*, *Enterobacter*.

**Частина 6. Грамнегативні анаеробні прями, вигнуті та спіральні палички.** Хемоорганогетеротрофи. Облігатно анаеробні, неспоруутворювальні, нерухливі чи рухливі палички, схильні до плеоморфізму. Одержують енергію за рахунок анаеробного дихання чи бродіння. В анаеробному диханні не використовують як термінальний акцептор електронів сульфат, інші окиснені сполуки сірки чи елементу сірки.

Бактерії об'єднані в одну родину *Bacteroidaceae* і 13 родів (*Butyrivibrio*, *Succinivibrio*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Leptothrichia*, *Wolinella*, *Anaerovibrio*, *Acetivibrio* та ін.). У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) родина *Bacteroidaceae* складається із 47 родів, понад 30 з яких не увійшли до *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, оскільки ці роди були вперше описані після виходу його у світ.

Бактерії цієї групи живуть у ротовій порожнині, травному каналі людини, тварин і комах. Деякі види патогенні (окремі види *Fusobacterium* зустрічаються при гнійних і гангренозних інфекціях). Бактерії різних родів відрізняються за кінцевими продуктами бродіння: представники роду *Butyrivibrio* з глюкози утворюють бутират, *Succinivibrio* — сукцинат, *Acetivibrio* — ацетат, *Fusobacterium* накопичують як основний продукт бродіння масляну кислоту, *Leptothrichia* — молочну кислоту, *Bacteroides* — суміш кислот (бурштинову, оцтову, мурашину та ін.).

Частина 7. Сульфатасиміювальні або сульфатовідновлювальні бактерії. Серед представників групи бактерій є хемолітотрофи облігатні анаероби, які одержують енергію окисненням в анаеробних умовах молекулярного водню, використовуючи як термінальний акцептор електронів сульфат. Є хемоорганотрофи, які як джерело вуглецю та енергії використовують органічні кислоти (лактат, піруват, форміат, ацетат), спирти (етанол, бутанол), вуглеводи. Не утворюють ендоспор, переважно нерухливі.

Група бактерій представлена родами *Desulfotribrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina*. *Desulfosarcina variabilis* здатна до автотрофного росту, при цьому як єдине джерело вуглецю використовує  $\text{CO}_2$ , енергії —  $\text{H}_2\text{S}$ , термінальний акцептор електронів —  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Частина 8. Анаеробні грамнегативні коки. Хемоорганогетеротрофи. Анаероби. Неспороутворювальні нерухливі клітини, які розміщуються поодинокі, парно, ланцюжками чи скупченнями. Метаболізм виключно бродильного типу.

Група представлена однією родиною *Veillonellaceae*, яка складається з трьох родів: *Veillonella*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*.

Є паразитами теплокровних тварин, зустрічаються у травному тракті людини, жуйних тварин, гризунів, свиней.

Частина 9. Рикетсії та хламідії. Облігатні внутрішньоклітинні паразити еукаріотичних хазяїв (хребетних і членистоногих). Клітини паличкоподібні, кокоподібні та плеоморфні. Багато видів патогенні.

Рикетсії трибу *Rickettsiae* є патогенними для людини (спричиняють сипний тиф, лихоманки), трибу *Ehrlichiae* — непатогенними. Бактерії трибу *Wolbachiae* є симбіонтами членистоногих, непатогенні, за винятком роду *Rickettsiella* — патогенів для личинок комах і деяких інших безхребетних. Рикетсії родини *Bartonellaceae* виявляються в еритроцитах людини і хребетних тварин. Дрібні рикетсіальні форми родини *Anaplasmataceae* є облігатними паразитами плазми та еритроцитів крові багатьох диких і домашніх тварин.

Хламідії — це облігатні внутрішньоклітинні паразити людини та хребетних тварин, які розмножуються тільки у цитоплазмі крові.

Частина 10. Ковзані бактерії. Хемоорганотрофи, облігатно аеробні бактерії, позбавлені джгутиків, але здатні ковзати по твердій поверхні. За браку поживних речовин клітини агре-

гують з утворенням плодових тіл, які складаються із слизу та клітин, часто яскраво забарвлених і видимих неозброєним оком. Плодові тіла варіюють від простих грудочок до складних структур, які мають спорингії характерних форм і розмірів, розміщені поодинокі чи в групах на простих стеблях, або на таких, які галузяться. Клітини всередині плодових тіл являють собою форми спокою (мікроспори або мікродисти).

Плодові тіла здатні утворювати представники порядку *Mucobacteriales*. Міксобактерії характеризуються високою активністю літичних ферментів, які зумовлюють гідроліз білка, нуклеинових кислот, полісахаридів та ін. Завдяки цьому вони активно руйнують мертві рослинні залишки, лізують клітини прокариот та еукаріот. Існують у ґрунті, на рослинному матеріалі, який розкладається, корі живих дерев.

Частина 11. Бактерії, які мають чохла. Хемоорганогетеротрофи. Аероби. Нездатні до руху ковзанням. Характерним є ріст у вигляді ниток, клітини яких оточені чохлами (трубка чи позаклітинна речовина). При спостереженні у вологому препараті за допомогою фазово-контрастної мікроскопії трубка виглядає прозорою, нагадуючи пластикову мікротрубочку чи дудку. Іноді чохол був би настільки тонким і так щільно прилягає до клітини, що його неможливо розрізнити при фазово-контрастній мікроскопії. При додаванні в препарат 95%-го етанолу чохол стає видимим. Чохли можуть мати колір від жовтого до темно-коричневого за рахунок відкладень у них оксидів заліза та марганцю. Поодинокі клітини можуть бути рухливими за рахунок полярних або субполярних джгутиків або нерухливими.

Бактерії є вільноплаваючими чи прикріпленими до занурених у воду рослин, каменів та інших предметів. Існують у стічних водах, активному мулі, у морських і прісних водоймах. Найпоширенішими є бактерії родів *Sphaerotilus* — мешканці стічних вод та *Leptothrix* — розвиваються у місцях, багатих на органічний матеріал і залізо.

Частина 12. Бактерії, які брунькуються, і/або стеблянкові. Нефотосинтезуювальні організми поділяються так:

1) бактерії, які мають простежки (тонкі вирости живої речовини клітини, що складаються з клітинної стінки, цитоплазматичної мембрани і цитоплазми);

а) розмноження асиметричним брунькуванням. Бруньки утворюються на кінці простежки чи на поверхні клітини;



- б) розмноження бінарним поперечним поділом;
- 2) бактерії, які не утворюють простеків:
- а) бактерії, які брунькуються;
- б) бактерії, які не брунькуються. Утворюють *стеблинки* (вирости, що не містять цитоплазми, за допомогою яких клітини прикріплюються до поверхні);

в) інші бактерії, які мають: загострені на кінцях нитки, інкрустовані діоксидом марганцю; стрічкоподібні структури, не інкрустовані оксидами металів; *стеблинки* (порожні вирости кінцевої форми, видимі у світловому мікроскопі).

Простеки утворюють бактерії родів *Caulobacter*, *Prostheco-microbium*. Бактерії роду *Nyphomicrobium* розмножуються брунькуванням. Бактерії роду *Pedomicrobium* накопичують залізо та марганець.

**Частина 13. Грамнегативні хемолітотрофні бактерії.** Залежно від хімічної природи неорганічних сполук, які є для бактерій джерелом енергії, поділяються на такі групи:

- 1) нітрифікатори. Можуть використовувати як джерело енергії для росту відновлені неорганічні сполуки азоту (аміак і нітрит);
- 2) бактерії, які окиснюють сірку. Можуть окиснювати відновлені неорганічні сполуки сірки, причому багато які організми використовують їх як єдине джерело енергії;
- 3) obligatні окисники водню, які використовують молекулярний водень як джерело енергії для росту. Органічні джерела вуглецю не використовують;
- 4) бактерії, які не мають простеків і стеблинок. Утворюють чи накопичують оксиди заліза і/або марганцю на поверхні чи всередині клітини;

5) магнітотаксичні бактерії, які проявляють таксичні реакції на магнітні поля. Клітини містять збагачені залізом електронотранспортні включення (магнітосоми).

До першої групи належать бактерії родини Nitrobacteriaceae (роди *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*), до другої — бактерії родів *Thiobacillus*, *Thiobacterium*, *Thiovulum*, *Thiospira* та ін. Бактеріями, які здатні осаджувати залізо та марганець, є представники родини Siderocapsaceae (роди *Siderocapsa*, *Siderococcus* та ін.).

Нітрифікатори існують у ґрунті, прісній і морській воді. Бактерії, які окиснюють сірку, живуть у ґрунті, воді, сіркових ключах, сіркових родовищах, де утворюється сірководень і від-

кладається сірка. Бактерії родини Siderocapsaceae зустрічаються у водах, які містять залізо.

**Частина 14. Ендосимбіоти.** Група бактерій-симбіонтів вивчена недостатньо. За типом харчівна поділяються на три групи: ендосимбіоти найпростіших (інфузорії, джгутикові, амеби), комах, грибів та інших безхребетних (крім членистоногих). Всі ендосимбіоти адаптовані до внутрішньоклітинного існування, більшість з них нездатна рости *in vitro* (поза клітиною).

Відомо п'ять родів бактерій ендосимбіонтів найпростіших (*Halo-sporea*, *Tectibacter*, *Lyticum*, *Caedibacter*, *Pseudocaedibacter*) і один рід ендосимбіонтів комах (*Blattabacterium*).

### Клас Anoxyphotobacteria

**Частина 15. Фототрофні бактерії.** Бактерії, які містять бактеріохлорофіл, каротиноїди і здатні використовувати світло як джерело енергії. Ростуть на світлі в анаеробних умовах і не виділяють кисень у процесі фотосинтезу. Деякі здатні рости в темноті за рахунок кисевого дихання. Можуть існувати фотоавтотрофно, фотогетеротрофно та хемогетеротрофно. Не можуть використовувати як донор водню воду, вони потребують донорів з більш високим ступенем окиснення (сірководень, водень, органічні сполуки). Тому фотосинтез у них проходить без виділення кисню (аноксигенний фотосинтез). Не містять фікобіліпротеїнів. Морфологічно різноманітна група — кокки, палички, вигнуті форми (спірили, вібріони), рухливі та нерухливі.

**Таксономія.** Бактерії належать до двох порядків. Перший порядок Rhodospirillales (пурпурові бактерії) об'єднує родини Rhodospirillaceae (несіркові пурпурові бактерії) та Chromatiaceae (сіркові пурпурові бактерії), другий порядок Chlorobiales (зелені бактерії) — родини Chlorobiaceae (зелені сіркові бактерії) та Chloroflexaceae.

**Характеристика представників.** За здатністю використовувати елементарну сірку як донор електронів поділяються на сіркові та несіркові бактерії.

Спільним для представників порядку Rhodospirillales є те, що їх фотосинтетичний апарат міститься на внутрішніх мембранах (*тилакоїдах*), які утворюються з інвагінацій плазматичної мембрани. Для представників порядку Chlorobiales характерна наявність *хлоросом* — органел, які вміщують пігмент і прилад-

гнують до плазматичної мембрани. Саме у хлоросомах міститься бактеріохлорофіл.

Пурпурові та зелені бактерії існують у водоймах із вмістом сірководню 20–100 мг/л і вище, що забезпечує їм анаеробні умови існування. Несіркові бактерії розвиваються у водоймах, багатих на органічні речовини. Живуть у солоних і прісних водоймах. Очевидно, є найдавнішими бактеріями на Землі.

### Клас *Oxyphotobacteria*

**Частина 16. Ціанобактерії.** Бактерії, які містять хлорофіл *a*, використовують світло як джерело енергії та виділяють кисень (як зелені рослини). Поділяються на дві групи:

1) організми, які містять хлорофіл *a* та фікобіліпротейни (алофікоціанин, фікоціанін, іноді фікоеритрин). Мають назву *ціанобактерії*;

2) організми, які містять хлорофіли *a* та *b* (який властивий тільки зеленим водоростям і вищим рослинам), але не фікобіліпротейни. Називаються *прохлорофітами*.

**Таксономія.** Поділяються на два порядки — *Cyanobacteriales* і *Prochlorales*. За морфологічними ознаками ціанобактерії поділяються на п'ять груп:

1) **хроококові ціанобактерії** — одноклітинні палички та коки, розміщені поодинокі чи в агрегатах, в яких об'єднані капсулами або слизом. Розмножуються бінарним поділом або брунькуванням. Роди: *Synechococcus*, *Gloeobacter* та ін.;

2) **плеурокапсові ціанобактерії** — теж одноклітинні форми, але тільки такі, які можуть розмножуватись і множинним поділом. При цьому всередині клітини, що ділиться, з'являється багато маленьких клітин — беодитів. Роди: *Pleurocapsa*, *Dermocapsa*, *Myxocarpina* та ін.;

3) **нитчасті ціанобактерії без гетероцист** — трихоми складаються тільки з вегетативних клітин. Роди: *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Plectonema* та ін.;

4) **нитчасті ціанобактерії з гетероцистами** — роди *Anabena*, *Nostoc* та ін. Крім гетероцист, можуть утворювати *акінеми* — клітини, які перебувають у стані спокою і диференціюються з вегетативної клітини утворенням товстої зовнішньої оболонки, збільшенням об'єму і накопиченням ціанофіцину, глікогену, ліпідів і каротиноїдів. Клітини діляться в одній площині;

5) **нитчасті ціанобактерії з гетероцистами** — відрізняються від групи 4 тим, що клітини діляться більш як в одній площині. Рід *Fischerella*.

**Характеристика представників.** Фотосинтетичний апарат представлений тилакоїдами. Відмінною рисою ціанобактерій є наявність *фікобілісом* — дископодібних утворень, які зовні прилягають до тилакоїдів і складаються з фікобіліпротейнів. Фікобілісоми є світлозбиральними пігментами. Тільки у одній ціанобактерії — *Gloeobacter violaceus* — немає тилакоїдів та фікобілісом.

Ціанобактерії поширені у різних водоймах, у ґрунті, на рисових полях. Завдяки здатності фіксувати молекулярний азот існують у місцях, бідних на поживні речовини (морський пісок, скелі в пустелях). Не бояться екстремальних умов. Деякі з ціанобактерій є настільки стійкими до дії кислот і термофільними, що ростуть у кислих гарячих джерелах (70 °C, pH 4,0).

Прохлорофіти є екзосимбіонтами, мешкають на тілах морських тварин.

### 7.5.2. *Biddell Firmicutes*

Сюди належать прокаріоти з грампозитивним типом будови клітини; фарбування за Грамом, як правило (хоча і не завжди), позитивне. Форма клітин може бути сферичною, паличкоподібною, нитчастою. Палички та нитки можуть бути такими, що гілкуються. Розмноження бінарним поділом. Деякі представники утворюють спори як форми спокою (ендоспори чи спори на гіфах або в спорангіях). Більшість представників нерухливі. Рухливі мають джгутики. Нефотосинтезуювальні організми. Як правило, це хемогетеротрофи, серед яких є вероби, анаероби, факультативні анаероби та мікроаерофіли. До цієї групи належать прості аспорогенні та спороутворювальні бактерії, а також актиноміцети та споріднені з ними організми. Поділяються на два класи:

*Firmibacteria* (складаються з трьох частини, № 17–19);

*Thallobacteria* (складаються з однієї частини № 20).

### Клас *Firmibacteria*

**Частина 17. Грампозитивні коки.** Хемоорганотрофні, мезофільні, грампозитивні коки, що не утворюють спор і поділяються так:

1) аеробні коки, розміщені попарно, в скученнях, тетрадах. Каталазопозитивні. Містять цитохроми. У клітинних стінках відсутні тейхоеві кислоти. Утворення кислот з вуглеводів часто відсутнє або слабо виражене (родина *Micrococcaceae*);

2) факультативно анаеробні або мікроаерофільні коки, розміщені попарно, в ланцюжках, кластерах або тетрадах. Присутність каталази, цитохромів і тейхоевих кислот у складі клітинної стінки — варіабельні ознаки (родина *Streptococcaceae*);

3) строго анаеробні коки, розміщені попарно, в ланцюжках, тетрадах або пакетах кубічної форми. Цитохроми не виявлені. Результати тесту на каталазу, як правило, негативні, хоча в деяких випадках спостерігається слабка або псевдокаталазна активність (родина *Peptococcaceae*).

**Таксономія.** Бактерії об'єднані у три родини: родина *Micrococcaceae* (роди: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Planococcus*); родина *Streptococcaceae* (роди: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*); родина *Peptococcaceae* (роди: *Peptococcus*, *Ruminoccus*, *Peptostreptococcus*, *Sarcina*). У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) ця група бактерій складається з 24 родів, більша половина з яких не увійшла до Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, оскільки була вперше описана після виходу його у світ.

**Характеристика представників.** Бактерії родини *Micrococcaceae* є вероками. Це коки, які діляться більш як в одній площині. Хемоорганотетеротрофи. Рухливі або нерухливі. Існують у ґрунтах, прісних водах, на шкірі людини і тварин (рід *Micrococcus*), шкірних залозах, слизових оболонках теплокровних тварин і людини (рід *Staphylococcus*), у морській воді (рід *Planococcus*). В основному сапрофіти, але є патогенні види (*Staphylococcus aureus* — спричиняє фурункули, гнійні процеси і навіть сепсис).

Класифікація родів родини *Streptococcaceae* ґрунтується на морфологічних ознаках і продуктах бродіння: бактерії родів *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* зброджують глюкозу з утворенням молочної кислоти, тобто є гомоферментативними. Бактерії роду *Leuconostoc* є гетероферментативними, оскільки у процесі зброджування глюкози утворюється не тільки молочна кислота, а й етанол, оцтова кислота,  $\text{CO}_2$ . Існують у ґрунтах, повітрі, воді, молоці та молочних продуктах (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*), квашених овочах, харчових продуктах. Можуть бути причиною псування продуктів (цукрового сиропу —

*Leuconostoc mesenteroides*, пива — *Pediococcus*). Є паразитами ссавців (*Gemella*, *Streptococcus*). Особливо патогенними є стрептококи, які викликають у людини ряд захворювань (лімфоаденіти, абсцеси, інфекції легень, нирок та ін.).

До складу родини *Peptococcaceae* входять анаеробні нерухливі коки. У процесі бродіння утворюють  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ , нижчі жирні кислоти, сукцинат, етанол. Молочна кислота не є основним продуктом бродіння. В основному сапрофіти — мешканці ґрунту (*Sarcina*), поверхні зернових культур, ротової порожнини і дихальних шляхів людини і тварин (*Peptococcus*), рубця жуйних тварин (*Ruminoccus*). Є патогенні види (*Peptostreptococcus*).

**Частина 18. Палички та коки, що утворюють ендоспори.** Бактерії, які утворюють стійкі до нагрівання ендоспори. Для перевірки на присутність ендоспор найкращим тестом є нагрівання при 70–80 °C з продовж 10 хв з наступним культивуванням у сприятливих умовах. Найчастіше — рухливі палички або нитки, але один рід представлений рухливими коками (розміщені в тетрадах або кубічних пакетах). Здебільшого грампозитивні, зокрема в молодих культурах, але представники одного роду є грамнегативними. Облігатні вероби, факультативні анаероби, мікроаерофіли або строгі анаероби. Хемоорганотрофи. У одного роду анаеробних бактерій анаеробне дихання відбувається з використанням сульфату як термінального акцептора електронів.

**Таксономія.** Бактерії об'єднані в одну родину *Bacillaceae*, яка складається з п'яти родів (*Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Desulfotomaculum*). У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) ця група бактерій складається з 10 родів, тобто після виходу у світ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology описано п'ять нових родів (*Amphibacillus*, *Oscillospira*, *Sporohalobacter*, *Sulfobacillus*, *Syntrophospora*).

**Характеристика представників.** Ця група бактерій характеризується великою різноманітністю властивостей. Серед них є маслянокислі бактерії (*Clostridium butyricum*), ацетобутилові (*Clostridium acetobutyricum*), уполітичні (*Sporosarcina ureae*), фіксатори атмосферного азоту (*Clostridium pasteurianum*), продуценти антибіотиків, ферментів, амінокислот, токсинів. Продуцентами всіх цих біологічно активних сполук є представники роду *Bacillus*. Кількість антибіотиків, які продукують бактеріями цього роду, наближається до 200. За цим показником бактерії поступаються лише стрептоміцетам. Найбільш продуктив-

ним видом є *Bacillus subtilis*, для якого описано понад 70 різних антибіотиків. Близько 30 антибіотиків утворюють штами *Bacillus brevis*. Найважливішими антибіотиками є поліміксин, бацитрадин, граміцидин С, субтилін та ін. Бацілам притаманна ампліолітична, пектинолітична, ліполітична, целюлозолітична, протеолітична активність. Живі культури баціл є основою *прібіотиків* — біопрепаратів лікувального та профілактичного спрямування, яким притаманні антимікробні та імуномодулювальні властивості. Встановлено, що *Bacillus subtilis* індукуює утворення інтерферону другого типу. Інтерферогенність баціл пов'язують з продукуванням ними позаклітинних лектинів.

Бактерії цієї групи існують у ґрунтах, донних відкладеннях, мулі, прісних і солових водоймах. Сапрофіти, але є і паразити, навіть особливо патогенні: види клостридій викликають газову гангрену, ботулізм.

**Частина 19. Грампозитивні паличкоподібні бактерії, які не утворюють ендоспор.** Прямі чи вигнуті палички, нерухливі (є небагато рухливих), факультативні чи облигатні анаероби.

**Таксономія.** Бактерії цієї групи об'єднані в одну родину *Lactobacillaceae* і представлені одним родом *Lactobacillus*. До цієї родини віднесено рід *Corynebacterium* з неясним систематичним положенням. У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) ця група бактерій значно розширена і представлена вісьмома родами, які поділяються за фізіологічними ознаками на три основні групи.

**Характеристика представників.** Мешканці рослин, молока та молочних продуктів, пива, солінь, маринадів, травного тракту людини та теплокровних тварин. Сапрофіти, за винятком тих, які відіграють певну роль у карієсі зубів. Основним продуктом бродіння є молочна кислота, тому ці бактерії називають "молочнокислими".

### Клас *Thallobacteria*

**Частина 20. Актиноміцети та споріднені організми.** Актиноміцети — це грампозитивні бактерії, які утворюють розгалужені нитки або гіфи у вигляді міцелію, тобто утворюють подібність міцелію (повітряного та субстратного). Міцелій може бути стабільним або розпадатися на паличкоподібні та кокоподібні елементи. Якщо міцелій зберігається, то утворюються спори, за допомогою яких відбувається розмноження. Спори можуть

утворюватися безпосередньо на повітряних гіфах (спорофорах), від яких відшнуровуються конідії, або в спорангіях. Деякі представники утворюють спори зі джгутиками (рухливі). Рухливість у актиноміцетів (якщо вона є) за рахунок джгутиків. Майже всі аероби. Свою назву актиноміцети отримали від першого з описаних видів — *Actinomyces bovis* — "променистого грибка", який викликає актиномікоз — захворювання великої рогатої худоби. Хемоетеротрофи, використовують різноманітні джерела енергії, у тому числі і складні полімери. Роди розрізняються за морфологічними ознаками, а також за наявністю чи відсутністю маркерних хімічних компонентів клітинної стінки. Споріднені організми — це *корінеформні та пропріоніові бактерії*.

**Таксономія.** Об'єднання бактерій цієї групи у роди і родини наведено у табл. 7.2. У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) інформація про цю групу бактерій значно розширена. Мікобактерії внесені в окрему групу (№ 21). Актиноміцети представлені у восьми групах (№ 22–29). Дані про корінебактерії та пропріоніові бактерії наведені окремо (група № 20).

Таблиця 7.2

Частина 20. Актиноміцети та споріднені організми

Представник групи бактерій	Порядок	Родина	Рід
Корінеформні бактерії	—	—	<i>Corynebacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Kurtzia</i>
Пропріоніові бактерії	—	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i> , <i>Eubacterium</i>
Актиноміцети	Actinomycetales	<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i> , <i>Arachnia</i> , <i>Bifidobacterium</i>
		<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>
		<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia</i>
		<i>Actinoplanaceae</i>	<i>Actinoplanes</i> , <i>Streptoporangium</i>
		<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>
		<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i> , <i>Streptoverticillium</i>
		<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Thermomonospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Micropolyspora</i>

Розглянемо характеристику представників груп бактерій згідно з цим виданням.

**Корінеформи (група 20).** Корінеформні бактерії — це грам-позитивні паличкоподібні форми, схильні до морфологічної мінливості з утворенням булавоподібних, слабкорозгалужених клітин, які часто розміщуються під кутом у вигляді літер V, Y. Мають також вигляд неpravильних паличок, які переходять у кокоподібні форми (притаманний цикл кок — паличка — кок). Більшість нерухливі, некислотостійкі, хемоорганогетеротрофи, переважно облигатні вероби, але є факультативні анаероби. Бактерії роду *Corynebacterium* є веробними органотрофами. Існують у ґрунті, воді, повітрі, ряд видів є збудниками хвороб рослин, тварин і людини (наприклад, збудник дифтерії — *Corynebacterium diphtheriae*). Артробактерії живуть у ґрунті, здійснюють процеси амоніфікації, нітрифікації, фіксації молекулярного азоту, розкладають пластмаси, гербіциди, фунгіциди, сполуки із вмістом ртуті. Бактерії роду *Cellulomonas* розкладають целюлозу, їх клітинні стінки не містять ні мезо-діамінопімеїнової кислоти, ні арабінози.

Анаеробні мікроорганізми у цій групі представлені органотрофними неспоривими бактеріями: маслянокислими *Eubacterium*, *Butyrivibrio*, гомоацетатними *Acetobacterium*, молочнокислими *Bifidobacterium*, пропіоновокислими *Propionibacterium*, термофільними *Thermoanaerobacter*, які здійснюють різноманітні види бродіння з виділенням  $H_2$  та утворенням різних жирних кислот.

**Мікобактерії (група 21).** До цієї групи входять кислото-стійкі веробні нерухливі органотрофні палички *Mycobacterium*, які не утворюють спор. Характеризуються повільним ростом (від 2 до 40 діб) і кислотостійкістю (після фарбування не збавляються при обробці підкисленим спиртом або сильними неорганічними кислотами). Кислостійкість зумовлена присутністю у клітинних стінках міколових кислот, які містять 78–95 атомів вуглецю. Тільки довголанцюгові міколові кислоти надають клітинам кислостійкості. Слід зазначити, що міколові кислоти присутні у клітинних стінках корінебактерій (під *Corynebacterium*) та нокардій (під *Nocardia*), але їх ланцюги мають меншу довжину (у міколових кислотах корінебактерій міститься 32–36 атомів вуглецю, у нокардій — 48–58), і тому ці бактерії некислотостійкі. За Грамом, фарбуються слабо. Іноді утворюють нитки, які галузяться. Повітряний міцелій не утворюють. Біль-

шість сапрофіти, але є патогенні для людини (збудник туберкулозу). Живуть у ґрунті, воді, тканинах тварин.

**Нокардієформи (група 22).** До цієї групи входять схильні до утворення розгалужених форм і слабо розвинуті міцелію грам-позитивні бактерії. Типовим родом групи є *Nocardia*. Органотрофні бактерії роду *Rhodococcus* незважаючи на свою назву не мають нічого спільного з пурпуровими несірковими бактеріями. Аероби, які відносно повільно ростуть, здатні ефективно використовувати вуглеводні нафти.

**Геодерматофіли і франкії (група 23).** Розглядаються як актиноміцети, що не утворюють міцелій. Роди: *Dermatophilus*, *Geodermatophilus*, *Frankia*. Аеробні органотрофи. *Frankia* є азотфіксуючим симбіонтом вільки, який утворює на її коренях бульбочки (подібно до ризобій). Характеризуються наявністю типового повітряного міцелію зі спорангієм, розділеним на багато спор.

**Актинопласти (група 24).** Водні актиноміцети. утворюють добре розвинутий як субстратний, так і повітряний міцелій. Спори утворюються у мішкоподібних спорангіях, в яких витримують висушування. Але при зволоженні спори вивільнюються у вигляді рухливих джгутикових клітин. Роди: *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*.

**Стрептоміцети (група 25).** Саме зв ними закріпилася тривіальна назва: актиноміцети. Вони утворюють добре розвинутий міцелій, розмножуються конідіями. Мають будову, аналогічну будові грибів, але з більш тонкими прокаріотичними гіфами, які містять багато нуклеоїдів і не завжди розділені на окремі клітини. Це насамперед ґрунтові організми, які пристосовані до існування у відносно засушливих умовах. Їм притаманна висока гідролітична активність щодо різних полімерів. Багато які стрептоміцети асимілюють целюлозу, хітин та інші природні речовини, що важко розкладаються. Міцелій поділяється на субстратний і повітряний, який служить для розмноження. Конідієспори є одночасно і органами розмноження, і формами спокою. Стрептоміцети є продуцентами антибіотиків (стрептоміцин, хлороміцетин, аурамицин, тетрациклін). Роди: *Streptomyces* (понад 500 видів), *Streptocorticium*, *Intrasporangium*, *Kineospira*, *Sporichthya*.

**Мадуроміцети або олігоспорові актиноміцети (група 26).** Мають таку саму міцеліальну будову, що й інші актиноміцети, але на відміну від них утворюють невелику кількість конідій.



Роди розрізняються перш за все формою конідієносців. Роди: *Actinomadura*, *Microbispora*, *Planomomyspora*, *Microtetraspora*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*.

**Термоактиномицети (групи 27 і 28).** Виділені за їх здатністю до помірної термофілії. Роди: *Thermoactinomyces*, *Thermomomyspora*, *Actinosynnema*, *Nocardopsis*, *Streptoalloteichus*.

**Інші роди (група 29).** Утворюють повітряний міцелій з ланцюжками спор. Роди: *Glycomyces*, *Kitasatosporia*, *Saccharothrix*.

### 7.5.3. Відділ *Tenericutes*

Сюди належать прокаріоти, у яких відсутня клітинна стінка (називаються мікоплазмами) і які не здатні до синтезу попередників пептидоглікану. Клітини оточені елементарною плазматичною мембраною, плеоморфні, розрізняються за розмірами (найменший розмір 0,15–0,20, найбільший — 10 мкм). Характерні нитчасті форми, що гілкуються. Розмноження може відбуватися брунькуванням, фрагментацією та/або бінарним поділом. Нерухомі, для деяких видів характерна рухомість (ковзання). За Гремом, не фарбуються. Для росту потрібні складні поживні середовища (середовища з високим осмотичним тиском). Ці організми інколи нагадують L-форми бактерій, які не мають клітинної стінки (особливо часто виникають у грампозитивних еубактерій), але відрізняються від цих еубактерій тим, що не здатні ревертувати до нормального типу і утворювати клітинну стінку. Багатьом видам додатково потрібні для росту холестерол і довголанцюгові жирні кислоти. Вміст ГЦ в ДНК — 23–46 %.

Відсутність клітинної стінки зумовила своєрідність будови бактерій цієї групи: 1) поліморфізм клітин — сферичні, еліпсоподібні, дископодібні, паличкоподібні, нитчасті, такі, що галузяться; 2) стійкість до антибіотиків, які специфічно діють на клітинну стінку (наприклад, до пеніциліну та його аналогів); 3) наявність добре розвинутої стабільної еластичної плазматичної мембрани.

Об'єднані в клас *Mollicutes* (складається з однієї частини — № 21). У Керівництві Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) мікоплазми розміщені у групі № 30. Представники цього класу є найдрібнішими прокаріотами, здатними самостійно розмножуватися. Вони об'єднані в порядок *Mycoplasmatales* і три роди:

ни: *Mycoplasmataceae*, *Acholeplasmataceae* і *Spiroplasmataceae*. Класифікація мікоплазм на родини проведена за їх відношенням до стеринів: стеринзалежні мікоплазми родини *Mycoplasmataceae* потребують екзогенного холестерину (та інших стеринів), який є основним компонентом мембранних ліпідів паразитичних мікоплазм; мікоплазми родини *Acholeplasmataceae* є стерин-незалежними.

Енергію удержують за рахунок окиснення чи зброджання органічних сполук (моно- і полісахариди), неорганічних сполук (залізо, марганець). Відсутність хінонів і цитохромів свідчить про те, що дихальний ланцюг у них обмежений. Більшість — аероби, є облигатні анаероби. Є ацидофіли, які здатні рости тільки в умовах високої кислотності середовища — *Thermoplasma acidophilum*, рН 1–4. Представники роду *Thermoplasma* є термофілами, деякі мікоплазми здатні гідролізувати сечовину (рід *Ureaplasma*).

Серед мікоплазм виявлені сапрофітні<sup>\*</sup>, паразитичні<sup>\*\*</sup> та патогенні форми. Останні спричиняють хвороби тварин, рослин і культур тканин.

У тварин мікоплазми зустрічаються як відносно безпечні паразити на слизових оболонках дихальних шляхів і статевих органів. Ці організми є мембранними паразитами, тобто досить міцно прикріплюються до епітеліальних клітин слизових оболонок. Вони не виділяють токсинів, але завдяки відсутності клітинних стінок навіть такі слабкотоксичні продукти, як іони амонію та перекиє водню, несприятливо діють на мембрану пошкоджених клітин тварин. Зараження мікоплазмами у одних тварин не викликає ніяких симптомів хвороби, у інших розвивається запалення дихальних шляхів, легенів.

У рослин мікоплазми є збудниками захворювань етіології. Вони переважно локалізуються у флоемі і у зв'язку з їх зовнішньою подібністю із сприлами об'єднані в рід *Spiroplasma*. *Spiroplasma citri* — збудник хвороби етіології цитрусів. Подібні форми були виявлені у інших рослин (кукурудза, бермудська трава, рис). *Spiroplasma* була виявлена також у бджіл і коників. Ймовірно, що комахи не тільки переносять мікоплазми, але і є їх хазяями.

<sup>\*</sup> Сапрофіт — організм, який живе на мертвому органічному матеріалі.

<sup>\*\*</sup> Паразит — організм, який живе на поверхні або всередині живого організму і живиться за його рахунок.



### 7.5.4. *Biddin Mendosicutes*

Архебактерії — це переважно ґрунтові або водні мікроорганізми, які зустрічаються в анаеробних умовах у гіперсолоних, гідро- та геотермальних середовищах, а також як симбіонти у травному тракті тварин. До цієї групи входять аероби, анаероби, факультативні анаероби, здатні рости як хемолітотрофи, гетеротрофи або факультативні гетеротрофи. Архебактерії можуть бути мезо- чи термофілами, причому деякі види здатні рости при температурі вище 100 °C.

Унікальна біохімічна особливість архебактерій полягає в тому, що до складу ліпідів у них входять ізопренильні ефіри гліцерину. Відсутність муреїну (пептидоглікану, який вміщує мурамову кислоту) в клітинних стінках робить архебактерії стійкими до β-лактамних антибіотиків (пеніцилінів). Нуклеотидні послідовності 5S-, 16S- та 23S рРНК сильно відрізняються від відповідних у еубактерій та еукаріот.

Асиміляція вуглецю в автотрофних архебактерій відбувається не в циклі Кальвіна. CO<sub>2</sub> фіксується через ацетил-КоА шлях або через відновлювальний цикл трикарбонових кислот. Деякі архебактерії здатні фіксувати молекулярний азот. Серед коферментів та простетичних груп зустрічаються компоненти, які хоч і подібні до таких у еубактерій та еукаріот, але не ідентичні їм: похідне 5-деазерибофлавіну F<sub>420</sub>, нікельтетрапірольний фактор F<sub>430</sub>, метаноптерин, кофермент M.

Результати фарбування, за Грамом, можуть бути позитивними або негативними всередині одного порядку, оскільки типи клітинних оболонок дуже різняться. У грампозитивних видів клітинні стінки складаються з псевдомуреїну, метанокондрітину та гетерополісахариду. Грамнегативні клітини мають поверхневі шари, які складаються з глікопротеїну.

Форма клітин різноманітна: сферична, спіральна, пластинчаста, паличкоподібна. Зустрічаються одно- та багатоклітинні форми у вигляді ниток або агрегатів. Діаметр окремих клітин варіює від 0,1 до 15 мкм, а довжина ниток може досягати 200 мкм. Розмноження відбувається бінарним поділом, брунькуванням, претяжкою, фрагментацією або невідомими способами. Забарвлення клітинної маси може бути червоним, пурпуровим, рожевим, оранжево-коричневим, жовтим, зеленим, темно-зеленим, сірим та білим.

Згідно з Керівництвом Бергі з ідентифікації бактерій (1997 р.) архебактерії розміщені в групах № 31–35 і поділяються на п'ять основних груп.

**Метаногени (група 31).** До них належать представники 18 родів (*Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacterium*, *Methanogenium*, *Methanotherix* та ін.). Слід зазначити, що у 1984 р. було описано лише 13 родів цих бактерій.

Строгі анаероби, здатні утворювати метан як основний кінцевий продукт метаболізму. Субстратами можуть бути H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>, форміат, ацетат, метанол, метиламіни або H<sub>2</sub> + метанол. Сірку (S<sup>0</sup>) можуть відновлювати до H<sub>2</sub>S без одержання енергії. Мезо- і термофіли, нейтрофіли (оптимальне значення pH 7,0), зустрічаються галофільні види. Могуть давати синьо-зелену флуоресценцію при опроміненні світлом з довжиною хвилі 420 нм. Містять кофермент M, фактор 420, 430 і метаноптерин.

**Сульфатредукуючі археї (група 32).** До них належить рід *Archaeoglobus*, описано два види: *Archaeoglobus fulgidus* та *Archaeoglobus profundus*. Дані про види *Archaeoglobus* відсутні в *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Вони описані у 1988–1990 pp.

Клітини кокоподібні неправильної форми, часто трикутні, розміщені поодинокі чи парами. Фарбуються, за Грамом, негативно. Утворюють зеленувато-чорні колонії діаметром 1–2 мм. Строгі анаероби, здатні утворювати H<sub>2</sub> із сульфату в процесі дисиміляційної сульфатредукції. Крім того, утворюють невеликі кількості метану. Екстремальні термофіли (ріст при температурі до 92 °C), діапазон pH 4,5–7,5 (оптимум близько 6), діапазон солоності — 0,9–3,6 % хлористого натрію. Здатні до хемолітотрофного, хемоорганотрофного або хемоміксотрофного росту. Для автотрофного росту необхідні тіосульфат і H<sub>2</sub>. У гетеротрофних умовах використовують форміат, лактат, глюкозу, крохмаль і білки як донори електронів. В ультрафіолеті (довжина хвилі 420 нм) виявляють синьо-зелену флуоресценцію. Містять фактор 420 і метаноптерин, але не кофермент M та фактор 430.

**Екстремально галофільні аеробні архебактерії (галобактерії) (група 33).** Належать представники шести родів (*Halococcus*, *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*). У 1984 р. було описано тільки три роди галобактерій — *Halococcus*, *Haloarcula* та *Halobacterium*.

Грамнегативні чи грампозитивні, аероби чи факультативні анаероби, хемоорганотрофи. Клітини паличкоподібні, мають форму від правильної до дуже неправильної. Потребують високої концентрації хлориду натрію (1,5 М і вище). Нейтрофіли чи алкалофіли. Мезофіли чи до деякої міри термофіли (до 55 °C). Деякі види містять фотоактивний червоно-пурпуровий пігмент бактеріородопсин і здатні використовувати світло для синтезу АТФ.

**Архебактерії, які не мають клітинної стінки (група 34).** Термоцидофіли, аероби (належить один рід — *Thermoplasma*). Оптимальна температура близько 60 °C, оптимальне значення pH 1–2. Клітини коккоподібні, не мають клітинної стінки. Їх можна назвати термоцидофільними “мікоплазмами”. Цитоплазматична мембрана містить багатий на манозу глікопротеїн і ліпоглікан.

**Екстремальні термофіли і гіпертермофіли, які метаболізують S<sup>0</sup> (група 35).** Належать 14 родів (*Acidianus*, *Desulfurolobus*, *Sulfolobus*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Desulfurococcus* та ін.). У 1984 р. було описано лише сім родів.

Облігатні термофіли, аероби, факультативні анаероби чи строгі анаероби. Грамнегативні палички, нитки чи коки. Оптимальною для росту є температура в інтервалі 70–105 °C. Ацидофіли та нейтрофіли. Автотрофи чи гетеротрофи. Більшість видів метаболізує сірку.

Деякі основні ознаки, які відрізняють еубактерії від архебактерії, наведені у табл. 7.3.

Таблиця 7.3  
Деякі ознаки, що відрізняють еубактерії від архебактерій

Ознака	Еубактерії	Архебактерії
<b>Основні морфологічні та метаболічні ознаки</b>		
Строгі анаероби, які утворюють метан (як основний кінцевий продукт) з H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> , формату, метанолу, метиламону чи H <sub>2</sub> + метанолу. Виявляють синьо-зелену флуоресценцію при опроміненні світлом з довжиною хвилі 420 нм	Ні	Так
Строгі анаероби, які утворюють H <sub>2</sub> S з сульфату в процесі дисимільційної сульфатредукції. Екстремальні термофіли (ріст при температурі до 92 °C). Виявляють синьо-зелену флуоресценцію при опроміненні світлом з довжиною хвилі 420 нм	Ні	Так
Грамнегативні чи грампозитивні, аероби чи факультативні анаероби, хемоорганотрофи. Клітини паличко-	Ні	Так

Продовження табл. 7.3

Ознака	Еубактерії	Архебактерії
подібні, мають форму від правильної до дуже неправильної. Потребують високої концентрації хлориду натрію (1,5 М і вище). Нейтрофіли чи алкалофіли. Мезофіли чи до деякої міри термофіли (до 55 °C). Деякі види містять фотоактивний червоно-пурпуровий пігмент бактеріородопсин і здатні використовувати світло для синтезу АТФ		
Термоцидофіли, аероби, клітини коккоподібні, не мають клітинної стінки	Ні	Так
Облігатні термофіли, аероби, факультативні анаероби чи строгі анаероби. Грамнегативні палички, нитчасті чи коки. Оптимальною для росту є температура в інтервалі 70–105 °C. Ацидофіли та нейтрофіли. Автотрофи чи гетеротрофи. Більшість видів метаболізує сірку	Ні	Так
<b>Клітинна стінка (якщо є)</b> Містить муравову кислоту	Так	Ні
<b>Чутливість до антибіотиків</b> Чутливі до пеніциліну або його аналогів, які пригнічують синтез пептидоглікану, що містить муравову кислоту	Так	Ні
<b>Ліпіди</b> У складі фосфоліпідів мембрани виявлено: довголаногові спирти (фітаноли), зв'язані ефірами з гліцерином з утворенням фітанильних (C <sub>20</sub> ) диферів гліцерину або дифітанильних (C <sub>40</sub> ) дигліцеринів тетраефірів Шлях біосинтезу ліпідів: мевалонатний малонатний	Ні	Так
<b>Молекулярно-біологічні ознаки</b> До складу нуклеотидів ТУС-петлі молекул тРНК входять: риботимідин псевдоурідин та 1-метилпсевдоурідин	Так	Ні
Амінокислота, з якої починається поліпептидний ланцюг під час синтезу білка: метіонін	Ні	Так
N-формілметіонін	Так	Ні
Аміноацильна гілка ініціаторної тРНК закінчується прямою основою “АУ”	Ні	Так

Закінчення табл. 7.3

Ознака	Еубак-терії	Архе-бактерії
Синтез білка на рибосомах пригнічується: анізомицином канаміцином клорамфеніколом	Ні Так Так	Так Ні Ні
Фактор елонгації EF-2 АДФ-рибозилується дифтерій-ним токсином	Ні	Так
Фактор елонгації EF-2 містить амінокислоту дифтамід	Ні	Так
Деякі гени тРНК містять пирроли	Ні	Так
ДНК-залежні РНК-полімерази: являють собою мультиферментний комплекс пригнічуються рифампіцином і стрептолдігіном	Ні Так	Так Ні

Відкриття архебактерій (1977 р.) спричинило дискусію про їх місце в системі живих істот і повернуло до проблеми клітинної еволюції. Нині існують два уявлення про шляхи клітинної еволюції (рис. 7.1).

За одним з них (рис. 7.1, а) з популяції первинних клітин виникла популяція предкових прокаріотичних клітин, з якої утвори-

лися різні групи прокаріот (*монофілетична група*). Еукаріотична клітина виникла в результаті ендосимбіозу прокаріотичної клітини хазяїна та ендосимбіонту. Такими клітинами-хазяїнами могли бути архебактерії, що утворилися з предкових прокаріотичних клітин на ранньому етапі їх існування і поглинули вільно існуючі прокаріоти, які потім стали хлоропластами та мітохондріями еукаріот. За іншим уявленням (рис. 7.1, б) еубактерій, архебактерій і ядерно-цитоплазматичний компонент еукаріотичної клітини (мітохондрії, хлоропласти) дивергували від спільного предка самостійно, незалежно і досягли рівня організації сучасних прокаріотичних клітин (*поліфілетичне походження*).

## 7.6. СУЧАСНІ НАПРЯМИ В СИСТЕМАТИЦІ БАКТЕРІЙ

Існує кілька варіантів систематики, що ґрунтуються на різних типах подібності (чи спорідненості) бактерій: 1) фенотипова — подібність оцінюється за морфолого-фізіологічними ознаками; 2) хемотаксономічна (фактично це часткові фенотипові системи) — за хемотаксономічними ознаками; 3) ієрархічна (генеалогічна) — спорідненість визначається за походженням організмів; 4) філогенетична (еволюційна) — за походженням організмів і накладається на часову шкалу; 5) генотипова — подібність оцінюється за генетичним матеріалом (у цьому разі поняття подібності та спорідненості збігаються).

Ці системи є результатом використання не тільки різних методів, а й перш за все різної методології.

### 7.6.1. Фенотипова систематика

За більш як столітній період існування мікробіології як науки сформувалась фенотипова систематика бактерій. Сукупність морфолого-культуральних і фізіологічних ознак є критерієм для згрупування організмів у таксоки різного рангу. Цей підхід покладено в основу сучасних визначників бактерій (Бергі-8 та Бергі-9). Задовільні чи ні існуючі визначники? На жаль, далеко не завжди і з таких причин:

1. Одне з дискусійних питань у фенотиповій систематиці: що повинно лягти в основу класифікації бактерій — морфологія клі-



Рис. 7.1. Можливі шляхи клітинної еволюції:  
а — монофілетичний; б — поліфілетичний

тини чи її метаболізм? А звідси виникає таке запитання: чи існує кореляція між морфологічними та фізіологічними ознаками? Результати дослідження фенотипових властивостей бактерій, проведеного у 70-х роках ХХ ст. Г.О. Завараїним, дали можливість зробити висновок, що такої кореляції не існує і не можна говорити про морфолого-фізіологічну спільність як про загальний закон.

2. У визначниках підсумована якісно і кількісно нерівноцінна інформація, яка накопичувалась мікробіологами впродовж 100 років, в результаті чого відсутні єдині критерії класифікації різних груп мікроорганізмів.

3. Проблематичними в бактеріології є критерії для визначення рангу таксонів. Одні й ті самі ознаки є діагностичними для виду, а в інших випадках — і для роду. Власне, в теорії систематики відсутня кількісна оцінка рангу таксона.

4. У визначниках бактерій традиційно використовуються варіабельні ознаки (наприклад, ознака позитивна у 10–80 % дослідженого виду). Чим може бути викликана варіабельність ознак? Або досліджувані штами вивчалися в неадекватних умовах, або в експериментах використовувались нестандартні методи, або в аналізі були залучені мутантні форми. Здатність плазмід бути додатковим джерелом генетичного матеріалу, безумовно, робить певний внесок у мінливість мікроорганізмів. У такому разі, чи коректно використовувати таку ознаку, як стійкість до антибіотиків, якщо вона може кодуватися плазмідами, а отже, є нестабільною? Очевидно, що у класифікації потрібно брати до уваги стабільні ознаки, які кодуються хромосомними генами.

5. Застаріло поняття "типового" таксона. Найбільш "вузьке місце" використання типових штамів полягає в тому, що вони не обов'язково насправді є найтиповішими елементами таксонів.

### 7.6.2. Геносистематика бактерій

Принципово новим підходом, який відрізняється від фенотипової систематики, є *геносистематика* бактерій. Ступінь генетичних відмінностей у організмів можна оцінити за такими показниками: вміст ГЦ у ДНК; гібридизація ДНК—ДНК та ДНК—РНК; амінокислотна послідовність білків; нуклеотидна послідовність генів. Розглянемо використання в систематиці бактерій кожного з цих показників.

**Вміст ГЦ у ДНК.** Спочатку тільки загальний склад основ ДНК використовувався для порівняння бактеріальних геномів. Вміст ГЦ у ДНК має таксономічне значення. У бактерій молярний вміст ГЦ коливається в межах від 22 до 75 %. Це значення є постійним в одного організму. Проте показник ГЦ не враховує лінійного розміщення нуклеотидів у ДНК, і тому організми з однаковим ГЦ не обов'язково є ідентичними.

**Гібридизація ДНК—ДНК та ДНК—РНК.** Суть методу полягає в тому, що подвійна спіраль ДНК денатурується нагріванням і її ланцюги, які розійшлися, фіксуються. При зниженні температури стає можливою ренатурація ДНК. Але з'єднатися за одноланцюговою ДНК може лише комплементарний (відповідний) ланцюг. Кількість ренатованої двоспіральної ДНК є мірою подібності порівнюваних організмів. Послідовності, які утворюють дволанцюгові комплекси, не обов'язково є комплементарними за всіма нуклеотидами. Частку некомплементарних пар нуклеотидів можна визначити за швидкістю розділення ланцюгів ДНК у дуплексі при підвищенні температури. Для цього визначається  $T_{\text{пл}}$  (температура плавлення) — значення температури, при якій дисоціює 50 % дволанцюгової ДНК.  $\Delta T_{\text{пл}}$  визначається за формулою

$$\Delta T_{\text{пл}} = T_{\text{пл}} \text{ гібридних молекул ДНК} - T_{\text{пл}} \text{ контрольних молекул ДНК.}$$

$\Delta T_{\text{пл}}$ , що дорівнює 1 °C, відповідає приблизно 1 % некомплементарних пар нуклеотидів. Аналогічна реасоціація може бути здійснена між молекулами ДНК і РНК, оскільки подвійні спіралі утворюються також між одноланцюговою ДНК і комплементарними ланцюгами РНК. Експерименти з гомології ДНК найбільш корисні на рівні класифікації виду.

Практичні рекомендації з використання методу гібридизації ДНК—ДНК у систематиці бактерій викладені в рішеннях Комітету з узгодження підходів до таксономії бактерій, опублікованих ще в кінці 1987 р. Зокрема в них зазначається, що вид повинен містити штами з рівнем подібності ДНК—ДНК 70 % і вище, а також з  $\Delta T_{\text{пл}}$  5 °C і нижче. Фенотипові характеристики повинні узгоджуватися з цим визначенням і можуть не відповідати філогенетичній концепції виду тільки як виняток.

На початку 70-х років ХХ ст. завдяки ДНК—ДНК- і ДНК—РНК-гібридизації було уточнено положення видів у різних гру-

пах, таких як *Pseudomonas*, анаеробні бактерії та ін. Так, було показано, що види, які входять до роду псевдомонад, являють собою п'ять генетично ізолюваних одна від одної гомологічних груп. *Bacteroides fragilis* містить п'ять підвидів, які виявились різними групами за ДНК-гомологією. Рід *Salmonella* містить тільки одну ДНК-гомологічну групу, і пропозиція визнати тільки один вид сальмонел отримала широку підтримку.

**Амінокислотна послідовність білків.** Порівняння амінокислотної послідовності білків базується на відображенні в ній первинної послідовності генів організму, тобто є своєрідним "відбитком пальців" ДНК. У практичних дослідженнях для порівняльного аналізу білків використовують метод електрофорезу. Електрофоретичне визначення профілів білків базується на передбаченні, що близькоспоріднені організми характеризуються ідентичними клітинними білками. Проте слід мати на увазі, що профіль клітинних білків може змінюватися залежно від умов вирощування бактерій.

**Аналіз 5S та 16S рРНК.** Понад три десятиліття тому був встановлений консервативний характер генів рибосомальної РНК. Гени, які кодуєть рРНК, є висококонсервативними, і тому рРНК дуже мало змінюються в процесі еволюції. Ці інформаційні молекули розглядають як молекулярні хронометри, що відображають походження та розвиток мікроорганізмів. Аналіз нуклеотидної послідовності рРНК у бактерій виявив як несподівані відмінності, так і дивну подібність. Слід зазначити, що були спроби досліджувати взаємозв'язок таксонів бактерій на основі аналізу нуклеотидних послідовностей 5S рРНК. Але ця молекула виявилася занадто малою, щоб відповідати цьому завданню. У наш час ідентифікація філогенетичного положення прокаріот розвивається на основі аналізу 16S рРНК. Як зазначається у передмові академіка РАН Г.О. Заварзіна до російськомовного дев'ятого видання Визначника бактерій Бергі, на сьогоднішній день цей підхід є безальтернативним у визначенні родової належності мікроорганізмів.

Останнім часом для аналізу 16S рРНК широко застосовуються методи, що ґрунтуються на **полімеразній ланцюговій реакції**. В основі ПЛР лежить ампліфікація (тобто збільшення числа копій) окремих фрагментів ДНК за допомогою так званих **праймерів** — синтетичних олігонуклеотидів завдовжки 20–30 нуклеотидів, комплементарних до ділянки ініціації реплікації зада-

ного фрагмента ДНК. Отже, нуклеотидна послідовність праймерів фактично повторює послідовність нуклеотидів на молекулі ДНК, яку потрібно ампліфікувати.

Досліджувану ДНК денатурують в умовах, що перешкоджають ренатурації, за надлишку праймерів. У цих умовах два типи праймерів гібридизуються з комплементарними послідовностями кожного з двох протилежних ланцюгів ДНК і виконують роль затравок ферментативного синтезу. У присутності ДНК-полімерази і набору дезоксирибонуклеозидтрифосфатів починається синтез нових ланцюгів ДНК у тому ж напрямку, що і при звичайній реплікації. Кінцевий продукт реакції у вигляді двох нових дволанцюгових ДНК знову денатурують і повторюють цикл ампліфікації. У такий спосіб відбувається вибіркове (лімітоване нуклеотидними послідовностями праймерів) множення специфічних ділянок ДНК до концентрації, за якої вони можуть бути легко виявлені. Різноманітні ДНК-полімерази ампліфікують матеріал протягом 20–50 циклів.

Ампліфікацію генів 16S рРНК здійснюють за допомогою універсальних еубактеріальних праймерів 27f та 1492g. Послідовність нуклеотидів праймера 27f (складається з 20 нуклеотидів) є в молекулах ДНК більшості еубактерій, а послідовність праймера 1492g (складається з 22 нуклеотидів) — в ДНК більшості еубактерій та архебактерій. Тому ці праймери називаються універсальними еубактеріальними праймерами. Після ампліфікації генів 16S рРНК визначають нуклеотидну послідовність отриманого амплікону (прилад називається секвенатор), яку порівнюють з комп'ютерною базою даних. Для аналізу послідовностей генів 16S рРНК досліджуваних бактерій використовують базу даних EMBL, Genbank, Ribosomal Database Project. Секвеновані послідовності порівнюють з послідовностями референтних штамів споріднених мікроорганізмів з використанням програми BLAST.

### 7.6.3. Філогенетична класифікація

До 1977 р. серед мікробіологів загально визнаним вважалося існування двох царств живих організмів — прокаріот та еукаріот. У 1977 р. К.Р. Везе та Г.Е. Фокс порівняли нуклеотидні послідовності 16S рРНК (і аналогічні еукаріотичні 18S рРНК) у широкого спектра живих організмів. Отримані ними результати показали,

що існує три царства живих організмів: архебактерії, еубактерії та еукаріоти. Архебактерії та еубактерії розрізняються між собою настільки, як кожні з них відрізняються від еукаріот.

Результати досліджень, проведених К.Р. Везе та Е. Стекбрандом у першій половині 80-х років XX ст., показали, що при аналізі нуклеотидних послідовностей 16S рРНК еубактерії поділяються на 11 основних груп (рис. 7.2).

1. Грампозитивні бактерії утворюють одну групу (виняток — *Deinococcus*), яка складається з двох підгруп: клаостридії

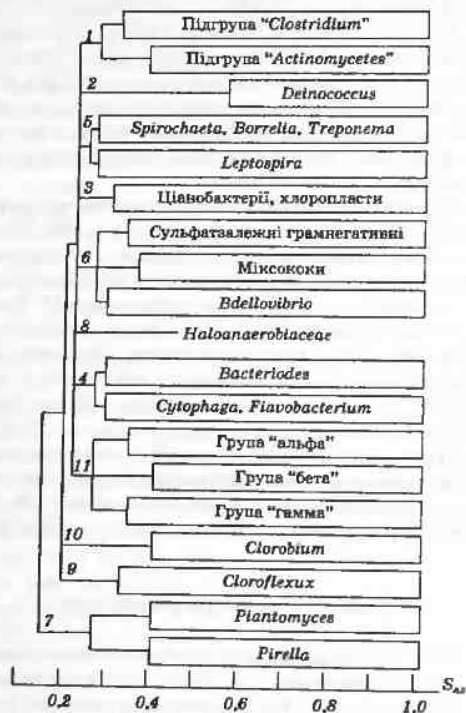


Рис. 7.2. Дендрограма формування основних ліній еволюції в царстві еубактерій

(з низьким вмістом ГЦ у ДНК) та актиноміцети (з високим вмістом ГЦ у ДНК). У цю групу увійшли також і деякі мікоплазми.

Підгрупа "Clostridium" об'єднує такі роди: *Acetobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Acetogenium*, *Acholeplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Listeria*, *Gamella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Kurthia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedococcus*, *Peptococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus*, *Ruminococcus*, *Sarcina*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*, *Thermoactinomyces*, *Erysipelothrix*, *Aerococcus*.

У підгрупу "Actinomycetes" увійшли: *Actinomadura*, *Nocardiosis*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinoplanes*, *Ampullariella*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Aureobacterium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioidea*, *Kitasatosporia*, *Microellobosporia*, *Promicromonospora*, *Streptosporangium*, *Streptovericillium*, *Thermomonospora*, *Corynebacterium*, *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Dermatophilus*, *Geodermatophilus*, *Stomatococcus*, *Frankia*.

2. *Deinococcus* і близькоспоріднені коки характеризуються атиповою клітинною стінкою.

3. Ціанобактерії та хлоропласти вищих рослин і водоростей, гетеротрофний представник цієї групи не був виявлений.

4. Одна з основних груп еубактерій, яка складається з підгруп *Bacterioides*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*. Остання підгрупа поділяється на дві лінії, в кожній з яких є флавобактерії.

5. Спірохети утворюють групу з трьох підгруп, в яких комбінуються *Spirochaeta*, *Borrelia*, *Treponema*; периферійний член цієї гілки — *Leptospira*.

6. Група об'єднує *Bdellovibrio*, міксококи, дисимільаторні сірко- і сульфатовідновлювальні бактерії, які майже не мають спільних таксономічних ознак. Наявність сульфатовідновлювальних бактерій також серед архебактерій, грамнегативних і грампозитивних бактерій свідчить про те, що їх еволюція могла йти різними шляхами.

7. Група *Plantomyces* та *Pirella* — організми, які брунькуються, мають білкову клітинну стінку (відсутня мурамова та діамінопімелінова кислоти). Дуже низьке значення  $S_{Ad}$  (0,15) з іншими бактеріями вказує на те, що члени цієї групи є нащадками найдавнішої групи еубактерій.

8. *Haloanaerobiaceae* — анаеробні, помірно галофільні бактерії з низьким вмістом ГЦ у ДНК.



9 і 10. Зелені сіркові бактерії — окрема лінія еволюції *Chlorobium vibrioforme*.

11. Найскладніша для розуміння та інтерпретації група, яка представлена пурпуровими та спорідненими з ними грамнегативними бактеріями. До неї увійшли фенотипово різні організми. Склад групи 11 практично ніяк не узгоджується з існуючою класифікацією бактерій, наведеною у визначнику Бергі-9. Група об'єднує три основні підгрупи (альфа, бета, гамма), кожна з яких містить фототрофні бактерії. Причому таке згрупування було отримано на основі як результатів ДНК—ДНК-гібридизації, так і визначення нуклеотидних послідовностей 16S рРНК. Перед-

бачають, що спільним предком цієї групи бактерій був фототроф (рис. 7.3).

У 1988 р. ця група бактерій була об'єднана в клас *Proteobacteria*, який нині містить поки що умовні підкласи (subdivisions) “альфа”, “бета”, “гамма” та “дельта”. Розподіл найважливіших родів класу *Proteobacteria* за підкласами і типами живлення наведений у табл. 7.4.

Таблиця 7.4

Розподіл *Proteobacteria* за типами живлення

Органотрофи	Літотрофи	Фототрофи
<b>Альфа-підклас</b>		
<i>Acetobacter</i> , <i>Acidiphilium</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Ancalomicrobium</i> , <i>Ancylobacter</i> , <i>Aquaspirillum</i> , <i>Azospirillum</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Blastobacter</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Brucella</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Glucanobacter</i> , <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Hyphomonas</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Pedomicrobium</i> , <i>Prosthecomicrobium</i> , <i>Stella</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Xanthobacter</i> , <i>Zymomonas</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Rhodobacter</i> , <i>Rhodomicrobium</i> , <i>Rhodospila</i> , <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodospirillum</i>
<b>Бета-підклас</b>		
<i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Chromobacterium</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Derrxia</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylococcus</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Simonsiella</i> , <i>Vitreoscilla</i>	<i>Nitrosococcus</i> , <i>Nitrosolobus</i> , <i>Nitrosospira</i> , <i>Thiobacillus</i>	<i>Rhodocyclus</i>
<b>Гамма-підклас</b>		
<i>Acinetobacter</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Deleya</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Halomonas</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Legionella</i> , <i>Leuconitrix</i> , <i>Lysobacter</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Oceanospirillum</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Xanthomonas</i>	<i>Beggiatoa</i> , <i>Thionicrospira</i> , <i>Thiostrix</i>	<i>Amorobacter</i> , <i>Chromatium</i> , <i>Ectothiorhodospira</i> , <i>Lamprocyathus</i> , <i>Thiocapsa</i> , <i>Thiodictyon</i> , <i>Thiospirillum</i>
<b>Дельта-підклас</b>		
<i>Bdellovibrio</i> , <i>Chondromyces</i> , <i>Cystobacter</i> , <i>Myxococcus</i> , <i>Prolobacter</i> , <i>Sorangium</i> , <i>Stigmatella</i>	<i>Desulfobacter</i> , <i>Desulfobulbus</i> , <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfonema</i> , <i>Desulfosporospora</i> , <i>Desulfurococcus</i>	

Різні види цього роду потрапляють у різні підкласи

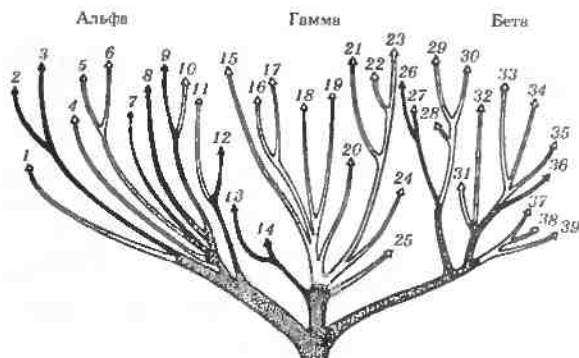


Рис. 7.3. Схематичне зображення специфічних філогенетичних відносин між родами у головній групі грамнегативних суббактерій. Показані підгрупи альфа, бета, гамма. Чорними лініями позначені фотосинтетичні гілки:

1 — *Aq. Itersonii*; 2 — *R. rubrum*; 3 — *Rps. photometricum*; 4 — *Ps. diminuta*; 5 — *Rhizobium*; 6 — *Agrobacterium*; 7 — *Rps. viridis*; 8 — *Rps. acidiphila*; 9 — *Rps. palustris*; 10 — *Nitrobacter*; 11 — *Paracoccus*; 12 — *Rps. sphaeroides*; 13 — *Chromatiales*; 14 — *Ectothiorhodospira*; 15 — *P. multocida*; 16 — *Vibrio*; 17 — *Photobacterium*; 18 — *E. coli*; 19 — *Aeromonas*; 20 — *Oceanospirillum*; 21 — *Ps. fluorescens*; 22 — *Serpens*; 23 — *Ps. aeruginosa*; 24 — *Ps. maltophilia*; 25 — *Legionella*; 26 — *Rps. gelatinosa*; 27 — *S. natans*; 28 — *Aq. gracilis*; 29 — *P. acidovorans*; 30 — *Ps. testosteroni*; 31 — *Aq. dipart*; 32 — *A. faecalis*; 33 — *A. eutrophus*; 34 — *Ps. cepacia*; 35 — *Ch. luidum*; 36 — *R. tenue*; 37 — *Nitrosomonas europaea*; 38 — *Nitrosolobus multiformis*; 39 — *Spirillum volutans*

Порівняння філогенетичної структури бактерій з традиційною фенотиповою систематикою (особливо група 11) відразу показує значні відмінності. Інша картина спостерігається для археобактерій, класифікація яких з самого початку базувалась на аналізі 16S рРНК. Філогенетична структура археобактерій цілком узгоджується з фенотиповою класифікацією (рис. 7.4).

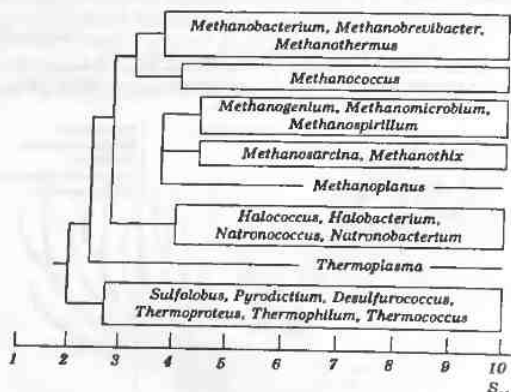


Рис. 7.4. Дендрограма формування основних ліній еволюції в царстві археобактерій

Востанньому, третьому, виданні книги "Prokaryotes" (1999 р.) на відміну від попередніх (1986 і 1992 рр.) наведено класифікацію бактерій з урахуванням філогенетичного аналізу. Нині існує електронна версія цієї книги, яка постійно оновлюється, а кожні чотири роки піддається перегляду та ревізії. Далі для кожної групи бактерій вказано кількість таксонів різного рангу за третім виданням книги "Prokaryotes".

### Archaea

Об'єднує три порядки (Thermoproteales, Sulfolobales, Thermococcales), одну родину (Halobacteriaceae), два роди (*Archaeoglobus* і *Thermoplasma*), метаногенні бактерії (таксон невизначеного рангу).

### Bacteria

1. Відділ A. Firmicutes містить в собі дев'ять родин (Streptomyces, Pseudonocardiaceae, Frankiaceae, Thermomonosporaceae, Streptosporangiaceae, Nocardiaceae, Cellulomonadaceae, Dermatophilaceae, Heliobacteriaceae), 67 родів, а також таксон невизначеного рангу (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*, анаеробні грам-позитивні коки).

2. Відділ B. Cyanobacteria — один порядок (Prochlorales).

3. Відділ C. Proteobacteria — сім родин (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, Pseudomonaceae, Azotobacteriaceae, Halomonadaceae, Chromatiaceae, Ectothiorhodospiraceae), 78 родів, а також таксон невизначеного рангу (*Rhizobia*; *Moraxella*; *Mycobacteria*; бактерії, що окиснюють марганець; літотрофні бактерії, що окиснюють амоній; незвично вигнуті бактерії; грам-негативні мезофіли; сульфатвідновлювальні бактерії).

4. Spirochetes — чотири роди (*Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*).

5. Chlorobiaceae — порядок Cytophagales, родину Chlorobiaceae, сім родів.

6. Хламідії — рід *Chlamydia*.

7. Плантоміцети і споріднені бактерії — порядок Planctomycetales і чотири роди.

8. Родина Deinococcaceae, рід *Thermus*, а також споріднені мікроорганізми.

9. Chloroflexaceae і споріднені бактерії — родина Chloroflexaceae і чотири роди.

10. Рід *Verrucomicrobium*.

11. Порядок Thermotogales.

Частина таксонів філогенетично не окреслена. До них належать більшість форм, що ростуть у симбіозі з іншими організмами; термофільні аеробні водневі бактерії; морфологічно різні бактерії, які окиснюють сірку; великі спірохети-симбіонти; організми, подібні до мікоплазм (патогенні для рослин); 12 родів бактерій (у тому числі *Zoogaea*, *Leptotrichia*, *Gallionella*, *Caulococcus*, *Kuznezovia*, *Siderocapsa*, *Fusobacterium*) і деякі інші.

Порівняльна оцінка класифікації бактерій з урахуванням філогенетичного підходу, наведеної у книзі "Prokaryotes" (1999 р.), і фенотипової класифікації у Визначнику бактерій Бергі-9 демонструє суттєві відмінності між ними.

Слід зазначити, що нині готується десяте видання *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, в якому будуть відображені

останні вдосконалення у бактеріології й таксономії. Нове видання одного з найавторитетніших керівництв з бактеріальної таксономії повністю реорганізовано з урахуванням філогенетичної класифікації бактерій. У порівнянні з попереднім виданням *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, опублікованим у 1984 р., це видання розширене за рахунок опису понад 2200 нових видів і 390 нових родів. Десяте видання *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* матиме п'ять томів. Перший том присвячено архе- та фототрофним бактеріям, другий — грамнегативним бактеріям (*The Proteobacteria*), третій — грампозитивним бактеріям із низьким вмістом ГЦ у ДНК, четвертий — грампозитивним бактеріям із високим вмістом ГЦ у ДНК, п'ятий — плантоміцетам, спірохетам, фузобактеріям та ін.

#### Контрольні запитання до розділу 7

1. Які підходи використовуються для класифікації бактерій?
2. Суккупність яких ознак покладена в основу фенотипової систематики?
3. Назвіть недоліки фенотипової систематики бактерій.
4. За якими ознаками можна оцінити ступінь генетичної спорідненості бактерій?
5. У чому полягає суть методу полімеразної ланцюгової реакції?
6. Дайте визначення виду у бактерій.
7. Чим відрізняється дев'яте видання *Визначника бактерій Бергі* від попередніх видань?
8. Дайте характеристику таксонам вищого рангу згідно з дев'ятим виданням *Керівництва Бергі з систематики бактерій*.
9. Назвіть відмінності археобактерій від еубактерій. На які групи поділяються археобактерії?
10. Які особливості притаманні мікоплазмам? Чим відрізняються мікоплазми від L-форм бактерій?
11. На які групи поділяються актиноміцети? Чому актиноміцети належать до бактерій?
12. Яке положення у *Керівництві Бергі з систематики бактерій* займають бактерії, що використовуються в біотехнології як продуценти біологічно активних сполук?
13. На які групи були поділені бактерії на основі аналізу 16S рРНК?
14. Наскільки узгоджуються дані аналізу 16S рРНК бактерій з їх фенотиповою систематикою?
15. Чому саме аналіз 16S рРНК використовується для філогенетичної систематики бактерій?
16. Дайте характеристику видання "*Prokaryotes*".

## 8. ГРИБИ

### 8.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГРИБІВ

Гриби — це численна, дуже поширена своєрідна група гетеротрофних організмів, позбавлених хлорофілу. Нині описано понад 100 тис. різних видів грибів. Грибам притаманні деякі риси тваринного та рослинного організмів.

Ознаки, спільні з рослинами: наявність клітинної стінки та вакуолів, заповнених клітинним соком; рухомість протоплазми, яку добре видно під мікроскопом; нездатність до активного переміщення, апікальний (верхівковий) ріст, характер живлення — адсорбційний, або осмотрофний (всмоктування), а не зоотрофний (проковтування), як у тварин. На відміну від рослин у грибів немає фотосинтетичних пігментів, тобто вони є С-гетеротрофами.

Ознаки, спільні з тваринами: гетеротрофний тип обміну за вуглецем, наявність глікогену (резервного субстрату клітин), наявність хітину в клітинних стінках, утворення та накопичення сечовини. Ознаки, характерні для рослин, тварин і грибів, наведені у табл. 8.1.

### 8.2. РОЗВИТОК МІКОЛОГІЇ, ПОЛОЖЕННЯ ГРИБІВ СЕРЕД ЖИВИХ ОРГАНІЗМІВ

*Мікологія* — наука про гриби, один із розділів ботаніки, вивчає морфологію, фізіологію, біохімію, екологію, географію, філогенію грибів, їх роль у природі та життєдіяльності людини.

Мікологія, як і інші науки, пройшла складний, тривалий шлях становлення та розвитку. Виділяють чотири періоди розвитку мікології.

*Перший період* — до середини XIX ст. Це так званий морфологічний описовий етап, для якого характерними є перші спроби наукової класифікації грибів. У 1578 р. було опубліковано

Таблиця 8.1

Ознаки, характерні для рослин, тварин і грибів

Ознаки	Рослини	Тварини	Гриби
Геном			
Розмір ( $\times 10^6$ Дп)	1000–2000	100–2000	10–30
Процент повторів	– 30	– 40	– 10
Цитологія та ультраструктура			
Кількість ядер у клітині	Одне		Одне або багато
Цитокінез	Спрямований з мітозом		Не спрямований з мітозом
Клітинна стінка	Є	Немає	Є
Центральна вакуоль	У фазі метаболічної активності		У процесі старіння
Метаболізм			
Синтез ліанну	Через діамінопімінову кислоту	Через $\alpha$ -аміноадипінову кислоту	Обидва шляхи
Кінцевий продукт метаболізму азоту	Аспарагін, глутамін	Сечовина	
Запасні вуглеводи	Крохмаль	Глікоген	Глікоген, трегалоза, цукроспирти
Структурні вуглеводи	Целюлоза, геміцелюлоза, пектини	Хітин	Хітин, хітозан, целюлоза, глюкан (манан)
Синтез меланіну	У мертвих клітинах	У живих клітинах	
Фізіологія та тип життя			
Тип життя	Прикріплений	Вільний	Прикріплений
Характер живлення	Осмотрофний	Зоотрофний	Осмотрофний
Тип вуглецевого живлення	Автотрофний	Гетеротрофний	
Спосіб одержання енергії	Фототрофний	Хемотротрофний	

перший атлас грибів (200 видів). У 1801 р. вийшов у світ двотомний "Огляд грибів" (автор — голландський міколог Х.Г. Персоон), у 1821–1832 рр. — наукова праця шведського ботаніка Е.М. Фріса "Система грибів".

**Другий період** — до кінця XIX ст. Головним напрямом цього періоду є вивчення розвитку грибних організмів, зокрема циклів їх розвитку, дослідження фітопатогенних грибів.

**Третій період** — кінець XIX–40-і рр. XX ст. Розвиток цитологічних методів у вивченні грибів і широке впровадження експериментальних методів у генетиці, фізіології, біохімії та екології грибів. Основні напрями: цитологічне вивчення онтогенезу, дослідження фаз розвитку ядра, статевого процесу та ін.

**Четвертий період** — з 40-х рр. XX ст. Основний напрям цього періоду — фізіолого-біохімічне вивчення грибів на різних рівнях їх дослідження — молекулярному, клітинному та субклітинному, організменному, асоціативному, біоценологічному та розвитку біотехнології грибів.

Положення грибів серед живих організмів. Нині серед мікологів загальноприйнятою є концепція про існування п'яти царств живих організмів, запропонована у 1969 р. Р. Віттейкером. За уявленнями Р. Віттейкера, два примітивних царства — прокаріотичних організмів (Procargota), які характеризуються відсутністю ядерної мембрани як основної відмінної ознаки, та найпростіших (Protista) одноклітинних організмів, які мають ядро з ядерною мембраною та характеризуються авто- та гетеротрофним типом живлення, є вихідними формами еволюції і виникнення відосблених трьох класів багатоклітинних організмів — рослин (Plantae), тварин (Animalia) і грибів (Fungi). Отже, згідно з цією концепцією, *гриби мають статус окремого царства органічного світу*. У систематиках, опублікованих у 80-х рр. XX ст. (Д.Л. Хоуксворт, 1995 р.; Л. Margalec та К.В. Шварц, 1997 р.; Т. Кавалірі-Сміт, 1998 р.), гриби також виділені в окреме царство. Мікологи вважають, що визнання факту незалежності грибів від царства рослин і тварин є одним з найважливіших досягнень загальної біології середини та кінця XX ст.

### 8.3. БУДОВА ГРИБІВ

**Клітина гриба** (рис. 8.1) складається з оболонки (клітинної стінки), цитоплазми з цитоплазматичною мембраною, ендоплазматичною сіткою (ендоплазматичним ретикулулом), мітохондріями, рибосомами, вклученнями, вакуолями та ядра (чи ядер). Ядро грибів чітко відосблене і оточене мембраною.

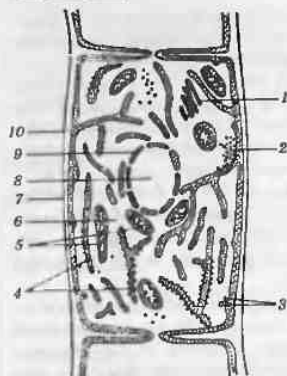


Рис. 8.1. Схема будови грибної клітини:

1 — апарат Гольджі (діктіосоми); 2 — лізосоми; 3 — лізосоми; 4 — цитоплазма; 5 — мітохондрії; 6 — цитоплазма; 7 — клітинна стінка; 8 — ядро; 9 — ядерна оболонка; 10 — цитоплазматична мембрана

Клітинна стінка грибів містить близько 80–90 % полісахаридів, зв'язаних з білками, ліпідами, поліфосфатами, пігментами. Вона складається з кількох шарів (зовнішнього та внутрішніх, або первинної та вторинної клітинної стінки).

Матричні (скелетні) структури (або первинна стінка) складаються з хітину та целюлози. зовнішній шар (вторинна стінка), — як правило, з глюканів з різними типами зв'язку у різних таксонів грибів. Наприклад, целюлозо-хітиновий комплекс переважає у клітинних стінках багатьох видів зигоміцетів, целюлозо-глюкановий — у ооміцетів, хітозан-хітиновий — у деяких видів ооміцетів, хітино-глюкановий — у хитридіоміцетів, аскоміцетів, базидіо- та дейтеромицетів. У складі клітинних стінок грибів виявлені також полісахариди, які містять глюкуронову кислоту, а також гетерополісахариди, які містять манозу, галактозу, глюкозу, глюкуронову кислоту.

**Лізосоми** — везикулярні тілця (бульбашки), які розміщуються між клітинною стінкою та цитоплазматичною мембраною. Виявлені майже у всіх грибів, беруть участь у синтезі клітинної стінки.

**Протопласти грибів** — сферичні утворення клітини, позбавлені клітинної оболонки, чутливі до осмотичного шоку. Їм властиві метаболічні процеси та здатність до регенерації. Протопласти одержують шляхом лізису клітинних стінок. Для цього використовують ферменти або мікроорганізми, які спричиняють лізис, а також сполуки, які порушують синтез клітинної стінки. Наприклад, антибіотик гризеофульвін пригнічує синтез клітинної стін-

ки у хітин-вмісних грибів. Антибіотик ністатин зв'язує стероли цитоплазматичної мембрани та клітинної стінки. Утворення протопластів у грибів як при культивуванні, так і в природі вивчено недостатньо. Ймовірно, що воно має значення у патогенезі захворювань, які спричиняються грибами.

**Цитоплазматична мембрана** — аналогічна за будовою мембрані рослинної, тваринної та прокаріотичної (так звана універсальна "елементарна мембрана"), складається з подвійного шару ліпідів, який міститься між тонкими шарами білка. Білкові молекули розміщуються не тільки на поверхні мембрани, а й проникають її наскрізь.

**Цитоплазма клітини** — являє собою різної в'язкості колоїдне рідке середовище, яке містить клітинні органели, включення резервних речовин різної природи та систему цитоплазматичних мембран. Система цитоплазматичних мембран являє собою нитки, тяжі, трубочки, системи бульбашок, які оточують окремі клітинні органели. До мембранних систем грибної клітини належить апарат Гольджі — агреговані бульбашки або пластинки (діктіосоми) різних розмірів, які розміщуються біля ядерної мембрани, перегородок гнів, конідій.

**Ендоплазматичний ретикулум** — рухома система метаболітів клітини, яка міститься біля цитоплазматичної мембрани та мітохондрій. Утворюється шляхом інвагінації цитоплазматичної мембрани або в результаті поділу.

**Вакуолі** — добре видимі структури округлої або неправильної форми. В них концентруються резервні речовини або токсичні проміжні метаболіти клітини. Вважають, що вакуолі у клітині можуть походити від ендоплазматичного ретикулуму або апарата Гольджі.

**Лізосоми** — клітинні органели, різноманітні за формою тілця, оточені одинарною мембраною. Відшнуровуються від апарата Гольджі і у вигляді бульбашок розміщуються в цитоплазмі. Містять ферменти, які розкладають полімери, а також здатні акумулювати токсичні для клітини проміжні продукти метаболізму.

**Ядро** — оточене двошаровою з порами оболонкою, яка утворюється зовнішньою та внутрішньою ядерними мембранами, містить ядречко, хромосоми. Ядро містить ДНК (у вигляді хромосом), яка є носієм генетичної інформації клітини.

**Мітохондрії** — еліпсоїдні структури, оточені двошаровою мембраною, постійно переміщуються по цитоплазмі, міс-

тять внутрішні увігнання — *кристи*. Є генераторами енергії (АТФ) у клітині, містять ряд окисно-відновних ферментів. У мітохондріях містяться і мітохондріальна ДНК.

**Рибосоми** — численні дрібні тільця, беруть участь у синтезі білка.

**Включення.** Основною запасною речовиною у грибів є *глікоген*, який розміщений у вигляді дрібних гранул по всій цитоплазмі. **Поліфосфати** — містяться у колоїдному стані у вакуолях. Їх вміст у клітині становить до 22 % вмісту всіх мінеральних компонентів. **Ліпіди та жири** — містяться у клітині у вигляді крапельок, які називаються *ліпосомами*.

**Вегетативне тіло гриба (талом)** складається з ниток завтовшки близько 5 мкм — гіфів (див. розд. 3, рис. 3.3). Гіфи не мають поперечних перегородок (перетинки) у вищих грибів і розділені такими перегородками (септами) на клітини у вищих грибів. Скупиність гіфів грибового талому називається *міцелієм*.

Для міцеліальних грибів характерним є *диморфізм* — здатність грибів залежно від умов культивування розвиватися у вигляді дріжджоподібних клітин або утворювати міцелій.

**Видозмінення міцеліального росту** — це хламідоспори, тяжі, ризоморфи, склероції, апресорії, гаусторії, кінця.

**Хламідоспори** — клітини гіфів з потовщеною оболонкою, які містять включення жиру та глікогену, з більшим діаметром клітини, ніж діаметр гіфи. Утворюються як фрагменти гіфів (інтеркалярні), на кінцях гіфів (термінальні), у конідіях. Можуть формуватися у процесі старіння культури після типового спороутворення.

**Склероції** — своєрідна агрегація септованих гіфів у вигляді особливих тіл. Клітини гіфів та їх оболонки потовщуються, часто меланізуються, набувають темного забарвлення. Потовщені клітини гіфів розміщуються на зовнішньому шарі склероції навкруги більш тонкостінних незабарвлених клітин внутрішніх шарів. Розміри склероцій коливаються від кількох міліметрів до кількох десятків сантиметрів у деяких грибів. Бувають сферичної або неправильної форми. Склероції стійкі до дії несприятливих факторів. Описано два типи утворення склероцій — термінальні (на кінцях гіфів) та інтеркалярні (в окремих фрагментах головних гіфів).

**Міцеліальні тяжі** — лінійно агреговані гіфи від кількох гіфів до тяжів діаметром кілька сантиметрів. Вони виникають із вегетативного міцелію частіше в природних умовах, ніж при

культивуванні. Властиві базидіальним грибам. Більш складно агреговані гіфи (множинно агреговані) називаються *ризоморфами*. Міцеліальні тяжі та ризоморфи забезпечують поширення гриба у субстраті, переміщення по гіфках поживних речовин до місця утворення плодівих тіл, виживання в несприятливих умовах.

**Апресорії і гаусторії** — розгалуження міцелію на його кінці, що росте.

## 8.4. РОЗМНОЖЕННЯ ГРИБІВ

Репродуктивними органами грибів є *спори*. Спори бувають рухомими (планоспори, зооспори) та нерухомими (апланоспори).

Для грибів характерні такі способи розмноження: вегетативне, безстатеве та статеве.

**Вегетативне розмноження.** Це — фрагментація гіфів, їх брунькування, а також утворення хламідоспор (вони можуть проростати).

**Безстатеве розмноження.** Органи безстатевого розмноження (спори) бувають ендогенними та екзогенними. Ендогенні утворюються всередині особливих вмістилищ (спорангіїв) і називаються *спорами (спорангіоспорами)*. Екзогенні утворюються на кінцях диференційованих відростків гіфи (*конідіоспоріїв*) і називаються *конідіями (конідіоспорами)* (див. розд. 3, рис. 3.4).

**Конідіальне спороношення** (розмноження за допомогою конідій) властиве переважно дейтероміцетам.

**Статеве розмноження.** Статеве розмноження грибів здійснюється, як і інших еукаріот, злиттям двох ядер. У процесі статевого розмноження можна виділити три фази. Перш за все відбувається *плазмогамія* — з'єднання двох протопластів. Клітина, яка виникла в результаті цього процесу, містить два ядра. Ця пара ядер (*дикаріот*) не обов'язково зливається відразу ж. Під час наступних поділів клітини можуть залишатися в дикаріотичній фазі. Два ядра при цьому поділяються одночасно (спряжений поділ). Тільки пізніше, часто тільки після утворення плодового тіла, відбувається злиття обох гаплоїдних ядер (друга фаза статевого розмноження — *каріогамія*) з утворенням диплоїдного ядра зиготи. Третя фаза — *мейоз*, або редукційний поділ, за якого кількість хромосом зменшується до вихідного (гаплоїдного). Три названі фази (плазмогамія, каріогамія та



мейоз) у деяких грибів відбуваються безпосередньо одна за одною, в інших же — на різних стадіях розвитку гриба.

Органами статевого розмноження у грибів є спори (ооспори у ооміцетів, зигоспори у зигоміцетів, аскоспори у аскоміцетів і базидіоспори у базидіоміцетів).

Фаза статевого розмноження починається з утворення статевих клітин — *гамет*, які утворюються в особливих морфологічно диференційованих клітинах — *гаметангіях*. Якщо гамети, які походять від чоловічої та жіночої батьківських клітин, морфологічно не розрізняються, вони називаються *ізогаметами*. Ізогаміти характерні для зигоміцетів. У ооміцетів гамети морфологічно різні: чоловічі гаметангії (і відповідно гамети) називаються *антеридіями*, а жіночі — *оогоніями*. Якщо чоловічі та жіночі гаметангії утворюються на одному і тому самому вегетативному тілі, яке розвивалося з однієї спори, то мова йде про *гомоталічні* (*гермафродитні*) гриби. У *гетероталічних* грибів таломи розрізняються статеві: несуть або тільки чоловічі, або тільки жіночі статеві органи.

*Ооспори* утворюються внаслідок злиття морфологічно різних жіночої гамети оогонія та чоловічої антеридія (процес називається гетерогамією), *зигоспори* — морфологічно однакових жіночої та чоловічої гамет (процес називається ізогамією).

Відмінною рисою статевого процесу у нижчих грибів є те, що в результаті запліднення утворюється *зигота*, яка являє собою спору у стані спокою. Тільки під час проростання такої спори відбувається редукційний поділ (мейоз), за якого відновлюється гаплоїдний набір хромосом у ядрі.

На *рис. 8.2* показано процес безстатевий (за допомогою конідій) та статевий розмноження у вищих грибів — аскоміцетів. За статевий розмноження на міцелії утворюються гаметангії 2, які складаються з *антеридія* (містить "+"-ядра, чоловіча статева клітина) та *аскогонія* (містить "-"-ядра, жіноча статева клітина). В аскогонії ядра з'єднуються попарно, але не зливаються. Із заплідненого аскогонія утворюються *аскогенні двоядерні гіфи* 3, а пари ядер піддаються мітозу, за якого реплікуються нові парні хромосоми. Далі в кінчиках аскогенних гіфів 4 відбувається каріогамія, після чого диплоїдні ядра піддаються мейозу. В результаті утворюються вісім гаплоїдних ядер, які розвиваються в аскоспори і розміщуються в аску 4. Одночасно аски, вміщені в міцеліальні гіфи, перетворюються в аскокарп 5. Аско-



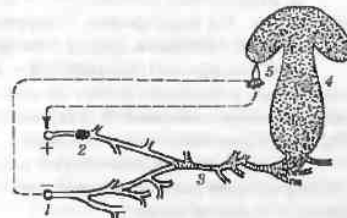
Рис. 8.2. Розмноження грибів *Ascomycetes*

карп розпадається на окремі аски, які містять вісім аскоспор. Аскоспори проростають, утворюючи новий міцелій.

Статевий процес у базидіоміцетів (*рис. 8.3*) характерний тим, що спочатку утворюється дикаріон (можливі варіанти утворення: злиттям двох гаплоїдних вегетативних клітин; поділом ядра в одній клітині). Далі клітини, які містять дикаріон, розростаються у складний дикаріотичний міцелій, з якого утворюється плодові тіла. *Базидії* утворюються на плодових тілах або з міцелію. З їх утворенням відбувається каріогамія дикаріона (злиття ядер і редукційний поділ, найчастіше на чотири ядра), даючи початок для утворення чотирьох базидій, з яких утворюються базидіоспори. Проростаючі базидіоспори утворюють гаплоїдний міцелій з одноядерних клітин, які знову утворюють дикаріон і фазу дикаріотичного міцелію (див. *рис. 8.3*). Отже,

Рис. 8.3. Цикл розвитку базидіального гриба:

1 — базидіоспори; 2 — гаплоїдний міцелій; 3 — дикаріотичний міцелій; 4 — плодові тіла з дикаріотичного міцелію; 5 — базидії з базидіоспорами



відмінною рисою статевого процесу у базидіоміцетів є наявність фази дикаріотичного міцелію, яка є своєрідним відхиленням від типового диплоїдного міцелію. При цьому базидіоспори утворюються екзогенно, на відростках базидії.

## 8.5. СИСТЕМАТИКА ГРИБІВ

Гриби об'єднано в такі таксони: відділ, клас (підклас), порядок (підпорядок), родина, рід, вид, у межах виду — різновид, форма (раса) або тип (якщо він відомий). Для класу характерне закінчення *-etes* (*Zygomycetes*), порядку — *-ales* (*Mucorales*), родини — *-aceae* (*Mucoraceae*). Назву виду приводять за бінарною номенклатурою — *Fusarium moniliforme*, різновиду — за триніomialною — *Fusarium moniliforme var. lactis*.

Згідно з класифікацією грибів, розробленою у 70-х — на початку 80-х рр. ХХ ст., гриби (*Fungi*) поділяють на два відділи:

I. Слизисті, або міксоміцети (*Mycetozoa*), вегетативне тіло яких являє собою плазматичну масу з чисельними ядрами або щільним зкупченням аміб.

II. Справжні (*Eumycota*), вегетативне тіло більшості яких має вигляд переплетення гіфів, що утворюють міцелій. Вони поділяються на сім класів:

1. *Chytridiomycetes* (хитридієві гриби) — міцелій відсутній або слабо розвинутий, зооспори та гамети одноклітинні, рухомі. Є статевий процес.

2. *Oomycetes* (ооміцети) — міцелій добре розвинутий, як правило, несептований, зооспори з двома джгутиками. Є статевий процес.

3. *Zygomycetes* (зигоміцети) — міцелій добре розвинутий, як правило, без перегородок. Безстатеве розмноження нерухомими спорангійспорами, рідко — конідіями. Є статевий процес.

4. *Trichomycetes* (трихоміцети) — міцелій у більшості нерозгалужений, в оболонках міститься целюлоза. Безстатеве розмноження спорангійспорами. Є статевий процес. Мешканці кишківників водних чи наземних членистоногих.

5. *Ascomycetes* (аскоміцети) — у переважній більшості міцелій добре розвинутий, септований. Безстатеве розмноження конідіями. Є статевий процес.

6. *Basidiomycetes* (базидіоміцети) — міцелій добре розвинутий, септований. Є статевий процес. За статевого розмноження утворюються базидії, на яких виникають базидіоспори.

7. *Deuteromycetes* (*Fungi imperfecti*) — дейтероміцети (недосконалі гриби) — міцелій добре розвинутий, безстатеве розмноження конідіями. Статевий процес немає.

За даними, наведеними у підручнику Ю.Т.Дякова [11], гриби належать до трьох відділів: *Mycetozoa*, *Heterocontae*, *Eumycota*. Клас *Oomycetes* входить до відділу *Heterocontae*, а відділ *Eumycota* складається з шести класів (*Chytridiomycetes*, *Trichomycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*).

Залежно від типу міцелію гриби поділяються на нижчі — *фікоміцети* (характеризуються наявністю несептованого міцелію, належать хитридіоміцети, ооміцети, зигоміцети) та вищі — *еуміцети* (мають септований міцелій, належать аскоміцети, базидіоміцети, дейтероміцети).

Мікроскопічні міцеліальні гриби (мікроміцети, плісняві гриби) і дріжджі, які викликають інтерес для біотехнології і використовуються в промисловості, належать в основному до класів аскоміцетів і дейтероміцетів. Причому багато представників дейтероміцетів одночасно належать і до інших класів грибів. Так, гриби аспергілі (рід *Aspergillus*) та пеніцили (рід *Penicillium*) класифіковані як представники класу аскоміцетів, так і класу дейтероміцетів. До дейтероміцетів належать також гриби родів *Botrytis*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Dendrodochium*, *Cladosporium*, *Alternaria*.

У класі *Zygomycetes* (порядок *Mucorales*) розміщені гриби родів *Mucor* і *Rhizopus*, які є продуцентами органічних кислот. До зигоміцетів належить також *Blakeslea trispora* — продуцент β-каротину.

## 8.6. ПРОБЛЕМИ СУЧАСНОЇ СИСТЕМАТИКИ ГРИБІВ

Сучасній систематиці грибів притаманні дві особливості. По-перше, використання молекулярних методів дослідження, в результаті чого відбувається злиття систематики грибів з молекулярною біологією. Подібне вже практично здійснене в систематиці вірусів і прокариот. По-друге, помітне певне поживлен-

ня того, що можна назвати "системотворчістю". За останні кілька років опубліковано ряд нових систем або їх оновлених варіантів як грибів та еукаріот, так і органічного світу в цілому.

Використання методів молекулярної біології та генетичних методів (результати секвенування ДНК і РНК, зокрема консервативної 18S рРНК, метода рестрикційного аналізу, електрофорезу клітинних білків та ін.) поставили під сумнів існуючу концепцію про єдність царства грибів. У результаті таксони вищого рангу, які входили до царства грибів, у нових системах були переведені в інші царства. Так, царство грибів покинули міксоміцети і деякі представники еуміцетів (ооміцетів, гіфохитридієві гриби). Близько 20 тис. видів організмів, які раніше називалися грибами, виявились нби двоцарственими, тобто такими, які різні спеціалісти відносили одночасно до царства грибів, хромістів, протистів (протоктистів) або тварин. Більше того, існує міркування, що гриби більш близькі тваринам, ніж рослинам.

У системі органічного світу, запропонованій Л. Маргеліс і К.В. Шварц (1997 р.), яка є найпопулярнішою серед американських вчених, з царства грибів вилучені міксоміцети, ооміцети та хитридієві гриби, які переведені в царство *Protoctista* (табл. 8.2).

Розташування грибів за системами Хоуксворта (1995 р.) та Маргеліс—Шварц (1997 р.)

Царство	Відділ	Представники
<b>Система Хоуксворта</b>		
Protozoa	Mycomycota	Слизисті
Chromista	Oomycota	Ооміцети
Fungi	Ascomycota	Аскоміцети
	Basidiomycota	Базидіоміцети
	Chitridiomycota	Хитридіоміцети
	Zygomycota	Зигоміцети, трихоміцети
	"Mitotic fungi"	Дейтероміцети
<b>Система Маргеліс—Шварц</b>		
Protoctista	Mycomycota	Слизисті
	Oomycota	Ооміцети
	Chitridiomycota	Хитридіоміцети
Fungi	Ascomycota	Аскоміцети
	Deuteromycota	Дейтероміцети
	Mycophycophyta	Лишайники
	Basidiomycota	Базидіоміцети
	Zygomycota	Зигоміцети, трихоміцети

На правах самостійного таксона в царство грибів введено відділ *Mycophycophyta* (лишайники). У той же час очевидно помилкою є визнання як таксона вищого рангу відділу *Deuteromycota*, який, за сучасними даними, не є єдиним.

У системі Т. Кавалір-Сміта (1998 р.) пропонується поділ органічного світу на шість царств, з яких п'ять становлять еукаріоти (*Animalia*, *Protozoa*, *Fungi*, *Chromista*, *Plantae*) і одне — прокаріоти (*Bacteria*). Найрадикальніших перетворень у цій системі зазнало царство грибів, яке поділено на два підцарства (*Eomycota* та *Neomycota*), чотири відділи (*Archemycota*, *Microsporidia*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*) та 20 класів (табл. 8.3). З царства грибів виведено міксоміцети, ооміцети та гіфохитридієві гриби, вони віднесені до царства *Protozoa* та *Chromista*. Вузьким місцем класифікації Т. Кавалір-Сміта є систематика базидіоміцетів та аскоміцетів, яка не враховує дані аналізу 18S рРНК.

Система грибів Кавалір-Сміта (1998 р.)

Таблиця 8.3

Царство	Підцарство	Відділ	Представники
Fungi	Eomycota	Archemycota	Хитридіоміцети Зигоміцети Трихоміцети
		Microsporidia	Мікроспоровики
	Neomycota	Ascomycota	Аскоміцети Клас <i>Plectomycetes</i> — дейтероміцети
		Basidiomycota	Базидіоміцети

Найиргументованішою нині є система грибів Д.Л. Хоуксворта, опублікована в Мікологічному словнику (восьме видання) у 1995 р. За цією класифікацією міксоміцети віднесені до царства *Protozoa*, ооміцети та гіфохитридієві гриби — до царства *Chromista*. Царство грибів (*Fungi*) представлене п'ятьма відділами: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chitridiomycota*, *Zygomycota*, "Mitotic fungi" (див. табл. 8.2). До відділу "Mitotic fungi", який не має самостійного таксономічного значення і найменування, віднесені дейтероміцети.

За даними молекулярно-біологічних і генетичних досліджень, недосконалі гриби (*Deuteromycetes*) не є самостійною таксономічною групою. Ними або втрачена статеві стадії, або вони є анаморфами інших груп грибів (найімовірніше класів *Ascomy-*

cetes та Basidiomycetes). У зв'язку з цим дейтероміцети повинні бути розміщені у відповідних класах грибів.

## 8.7. БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ РЕЧОВИНИ ГРИБІВ

Біологічно активні речовини грибного походження — це ферменти, антибіотики, полісахариди, токсини, стимулятори росту рослин і вітаміни (табл. 8.4). Одні з цих речовин більшою чи меншою мірою пов'язані з клітинними структурами, інші — у значних кількостях виділяються у культуральну рідину. Багато які біологічно активні речовини грибного походження використовуються в промисловості, медицині, сільському господарстві.

Таблиця 8.4

Біологічно активні речовини грибів

№	Біологічно активна речовина	Продукенти
<b>Ферменти</b>		
1	$\alpha$ -Амілаза	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. amylolyticus</i> , <i>Rhizopus delemar</i>
2	Глюкоамілаза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. awamori</i> , <i>A. oryzae</i>
3	$\alpha$ -Глюкозидаза	Види родів: <i>Aspergillus</i> та <i>Rhizopus</i>
4	Декстринази	Види родів: <i>Aspergillus</i> та <i>Rhizopus</i>
5	Целолази	<i>Trichoderma koningii</i> , <i>Trichoderma viride</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Trichotecium roseum</i>
6	Ксиланази	Види родів: <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium avenaceum</i>
7	Пектинази	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i>
8	Протеази	Види родів: <i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i>
9	Глюкозооксидаза та каталаза	<i>Penicillium vitale</i>
<b>Антибіотики</b>		
10	Пеніцилін (нотатін)	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>
11	Цитринін	<i>Penicillium citrinum</i>
12	Гризеофульвін	<i>Penicillium griseofulvum</i>
13	Фумігетин	<i>Aspergillus fumigatus</i>
14	Глітоксин, віридин	<i>Trichoderma viride</i>

Закінчення табл. 8.4

№	Біологічно активна речовина	Продукенти
<b>Токсини</b>		
15	Стахіботриотоксини	<i>Stachybotrys alternans</i>
16	Дендродохіні	<i>Dendrodochium toxicum</i>
17	Спорофузариотоксини	<i>Fusarium sporotrichiella</i>
18	Афлетоксини	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
<b>Екзополісахариди</b>		
19	Склероглюкан	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Sclerotium</i> sp., <i>Sclerotium glaucanum</i>
20	Пулулаві	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<b>Стимулятори росту та вітаміни</b>		
21	Гібереліни	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>
22	Вітаміни групи В	Вид роду <i>Aspergillus</i>
23	Каротини	<i>Blakeslea trispora</i>
<b>Органічні кислоти</b>		
24	Лімонна кислота	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus wentii</i>
25	Глюконова кислота	<i>Aspergillus niger</i>

Серед біологічно активних сполук, що синтезуються грибами, є первинні та вторинні метаболіти. **Первинними метаболітами** називаються продукти обміну, необхідні для росту і життєдіяльності продуцентів. До **вторинних** належать метаболіти, які не є необхідними для росту і розмноження продуцентів. Прикладом первинних метаболітів можуть бути органічні кислоти, амінокислоти, деякі ферменти. Вторинні метаболіти — антибіотики, екзополісахариди, деякі ферменти.

### 8.7.1. Ферменти

Ферменти — речовини білкової природи, здатні каталізувати різноманітні реакції перетворення речовини та енергії. Вони відіграють винятково важливу роль у процесах життєдіяльності організмів, здійснюючи обмін речовин, процеси їх асиміляції та дисиміляції. Але не тільки в організмі, а й виділені у чистому вигляді ферменти у певних умовах каталізують різноманітні перетворення, які мають велике значення у різних галузях практичної діяльності.

**Амілази.** Це ферменти, які гідролізують крохмаль. Крохмаль складається з амілози (20–30 %) та амілопектину (70–80 %). Амілоза являє собою  $\alpha$ -1,4-глюкан (лінійна структура). Амілопектин складається з коротких (20 залишків) ланцюгів  $\alpha$ -1,4-глюкану, один з одним ці ланцюги зв'язані  $\alpha$ -1,6-зв'язками (розгалуження).

Відомий комплекс ферментів, які розщеплюють крохмаль.  $\alpha$ -Амілаза гідролізує  $\alpha$ -1,4-зв'язки з утворенням мальтози та декстринів. Продукентами є *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus amylolyticus*, *Rhizopus delemar* та ін. У цих видів отримані очищені ферментні препарати.

**Глюкоамілаза** відщеплює окремі глюкозні одиниці від нередукованого кінця  $\alpha$ -1,4-глюкозидних зв'язків. Утворюється глюкоза, іноді олігосахариди. Очищені препарати отримані у *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*.

$\alpha$ -Глюкозидаза (мальтаза) гідролізує дисахарид мальтозу. Декстриназа (розщеплює декстрини) найбільш досліджена у грибів родів *Aspergillus* і *Rhizopus*.

Слід зазначити, що вся група амілаз найбільш вивчена саме у цих грибів. Це зумовлено тим, що ці гриби здавна використовуються у практиці, наприклад в Японії — для виготовлення спиртних напоїв, продуктів з рису, сої. Амілаза використовується у хлібопекарстві, отриманні глюкози ферментативним гідролізом крохмалю, в медицині, текстильній промисловості.

**Целюлази.** Це ферменти, які гідролізують целюлозу (клітковину). Целюлоза як органічна речовина найбільш поширена у природі. Являє собою полімер  $\beta$ -1,4-глюкози. Розкладання целюлози здійснюється комплексом целюлозолітичних ферментів:

1) **екзоцелюлаз**, що гідролізують нерозчинні целюлозні субстрати з непорядкованим розривом  $\beta$ -1,4-зв'язків у молекулі целюлози;

2) **ендоцелюлаз**, що гідролізують розчинні целюлозні субстрати з розривом  $\beta$ -1,4-зв'язків у будь-якому місці полімерного ланцюга;

3)  $\beta$ -глюкозидаз, целобіаз, що гідролізують целобіозу та інші  $\beta$ -глюкозиди;

4)  $\beta$ -глюкозилтрансфераз.

Целюлаза *Trichoderma koningii* утворюється за поверхневого культивування гриба на зволожений і підкислених пшеничних висівках. Целюлаза *Trichoderma viride* утворюється за глибинного вирощування гриба на середовищі з целюлозою, глю-

козою, лактозою. Для підвищення синтезу ферменту у середовище додають індуктори — похідні целюлози.

Активними продуцентами целюлаз є *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Trichotecium roseum* та ін.

Целюлази використовуються в промисловості для гідролізу рослинної сировини з метою її переробки для отримання крохмалю, жирів, масел та ін. Можуть застосовуватися у медицині та ветеринарії для лікування певних форм дистрофії, у харчовій промисловості — для обробки рису, зерна, квасолі з метою їх швидшого розварювання.

**Ксиланази та глюканази.** Ксиланази гідролізують ксилани ( $\beta$ -1,3- та  $\beta$ -1,4-полімери ксилози). Продукентами є види роду *Aspergillus*, а також *Fusarium avenaceum*. Глюканази гідролізують глюкани і полісахариди зі змішаним типом зв'язку. Досліджена  $\beta$ -глюканаза *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* та інших грибів.

**Пектинази.** Гідролізують пектинові речовини (кислі гетерополісахариди, в яких метокисльовані залишки галактуронової кислоти зв'язані між собою  $\alpha$ -1,4-глікозидними зв'язками). Пектинові речовини містяться у вищих рослинах (ягоди, фрукти, коренеплоди). У гідролізі пектинових речовин беруть участь такі ферменти: **протопектиназа** (перетворює нерозчинний протопектин у розчинний пектин), **пектинестераза** (гідролізує метокислі групи розчинного пектину), **полігалактураназа** (гідролізує  $\alpha$ -1,4-глікозидні зв'язки пектинової кислоти до вільних галактуронових кислот). Вивчені пектинази у *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* та ін.

Пектинази найширше використовуються у виготовленні соків і фруктових напоїв.

**Протеази.** Гідролізують білки та поліпептиди. Є дві основні групи протеолітичних ферментів: **протеїнази** (гідролізують розщеплення білків до пептидів), **пептидази** (гідролізують пептиди до амінокислот). Продукентами протеаз є представники родів *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*. Грибні протеази є кислими (оптимум pH 2,5–3,0), нейтральними та лужними (оптимум pH 8–11).

Грибні протеази використовуються для отримання гідролізатів казеїну, для пом'якшення шкіри, у хлібопекарстві для виготовлення спеціальних борошняних виробів з метою частко-

вого гідролізу глютену — білка борошна, у харчовій промисловості для пом'якшення м'ясних виробів, переробки відходів м'ясної та рибної промисловості.

**Глюкозооксидаза та каталаза.** Глюкозооксидаза каталізує окиснення глюкози молекулярним киснем з утворенням глюконової кислоти і перекису водню. Отримано фермент з *Penicillium vitale*. Він проявляє антибактеріальну активність щодо грампозитивних і грамнегативних бактерій. Механізм антибактеріальної активності глюкозооксидази зумовлений дією перекису водню, який утворюється при окисненні глюкози. У нативному вигляді стерильний ферментний препарат за назвою "Мікроцид" широко використовується у медицині для лікування гнійних захворювань. Глюкозооксидаза також використовується як реагент для визначення вмісту глюкози глюкозооксидазним методом (у тому числі, і для визначення вмісту глюкози в крові).

### 8.7.2. Антибіотики

Антибіотики — специфічні продукти біологічного походження, здатні затримувати чи повністю пригнічувати ріст різних видів мікроорганізмів. Шість родів мікроміцетів продукують майже 1000 антибіотиків. До них належать *Cephalosporium* — продуценти цефалоспоринів і *Penicillium* — продуценти пеніцилінів.

**Пеніциліни.** Продуценти — *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum*. Пеніциліни — це перші антибіотики, які були використані з лікувальною метою (1941 р.). До пеніциліну чутливі переважно грампозитивні бактерії родів *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Bacillus subtilis*.

**Цитринін.** Продукт метаболізму *Penicillium citrinum* уперше виявлений у 1931 р., а властивості встановлені у 1941 р. Продуцентами є також інші види *Penicillium*, а також аспергіли. Цитринін затримує розвиток грампозитивних і кислотостійких бактерій.

**Нотатин.** У культуральній рідині *Penicillium notatum* і *Penicillium chrysogenum*, крім пеніциліну, виявлений ще один антибіотик — нотатин, відомий за назвами пеніцилін А, пеніцилін В, пеніцидин. Нотатин являє собою флавопротеїновий фермент, який у присутності кисню окиснює глюкозу з утворенням перекису водню, чим і пояснюються його антимікробні властивості.

**Гризеофульвін.** Продуцент — *Penicillium griseofulvum*. Цей антибіотик специфічно діє на гриби, клітинні стінки яких містять хітин, тобто йому притаманна фунгіцидна дія.

**Фумігатин.** Утворюється грибом *Aspergillus fumigatus*. Активний проти грампозитивних і грамнегативних бактерій, *Фузагліл* малоактивний проти бактерій і грибів, але має значення як антибіотик, активний проти найпростіших і вірусів.

**Глітоксини.** Перша антибіотична речовина грибного походження, ізольована у чистому вигляді. Активний проти бактерій. Продуцент — *Trichoderma viride*, у культуральній рідині цього гриба виявлено ще один антибіотик — *віридин* (притаманна антигрибна активність).

### 8.7.3. Екзополісахариди

Впродовж останніх 20–30 років мікробні екзополісахариди — високомолекулярні екзогенні продукти метаболізму мікроорганізмів — є об'єктом інтенсивних теоретичних і прикладних досліджень. Здатність розчинів мікробних ЕПС до гелеутворення, емульгування, суспендування, зміни реологічних характеристик водних систем зумовили широке використання цих біополімерів у нафто- і гірничовидобувній, текстильній, харчовій, фармацевтичній, хімічній промисловостях, сільському господарстві і медицині. Мікробні ЕПС мають ряд переваг перед полісахаридами рослинного походження. Так, ці біополімери можна отримувати в потрібних об'ємах незалежно від пори року і кліматичних умов. Економічна доцільність використання мікробних ЕПС зумовлена їх позаклітинною природою і високою продуктивністю синтезу на дешевих субстратах. На відміну від хімічних полімерів (поліакриламід) мікробні ЕПС стійкі до температурної, окисної, механічної деструкції, але піддаються біологічній деградації і є нетоксичними, що робить екологічно безпечним їх застосування, наприклад, в нафтодобуванні.

**Склероглюкан.** Продуцентами склероглюкану є представники роду *Sclerotium* — *Sclerotium rofskii*, *Sclerotium* sp., *Sclerotium glucanicum*. Склероглюкан — нейтральний гомополісахарид, в якому залишки глюкостіранози з'єднані β-1,3-зв'язками. Цей полісахарид легко розчиняється у воді, зберігає високу в'язкість у широкому діапазоні температури, рН і одно- та двовалент-



них катіонів. Використовується у нафтовій промисловості для інтенсифікації нафтовидобутку.

**Пулулан.** Пулулан — це α-глюкановий полісахарид. Продуктом є *Aureobasidium pullulans*. Цей полісахарид утворює міцні пружні волокна, які можна формувати. У порівнянні з целофаном і поліпропіленом вони непроники для кисню. Передбачається, що пулулан знайде застосування як пакувальний матеріал у харчовій промисловості. Може використовуватись також як флокулятор у глинистих суспензіях у гірничорудній промисловості. Цей полісахарид стійкий до дії амілаз, розкладається ферментами пулуланазими.

#### 8.7.4. Токсини грибів

До цієї групи належать метаболіти різної хімічної природи — кислоти, похідні стеролів, ароматичних сполук. Токсини, синтезовані грибами, діють на організм людини, тварин, рослин. Найбільш вивчені токсини, що викликають токсикози у людини та сільськогосподарських тварин. З 40-х років XX ст. почала розвиватись наука *мікотоксикологія*, яка вивчає токсичні властивості грибів, їх поширення, захворювання, які спричиняються грибами, хімічну природу та властивості токсинів. На сьогоднішній день відомо кілька сотень мікотоксинів, які продукуються 600 видами грибів.

**Стахіботриотоксини.** Це комплекс токсинів, що утворюються грибом *Stachybotrys alternans*. Захворювання називається *стахіботриотоксикоз* і спричиняється згодовуванням тваринам уражених кормів (солома, рідше сіно). До виявлення токсичних властивостей види роду *Stachybotrys* були описані в літературі як сапрофітні. Людина заражається цією хворобою через контакт з ураженими кормами. Стахіботриотоксин виявляє також токсичну дію щодо рослин, спричиняючи їх некрози та відмирання. За хімічною будовою цей токсин належить до стероїдів. Стахіботриотоксин стабільний у процесі зберігання. Витримує температуру до 120 °C без втрати токсичних властивостей впродовж 2 годин. Стійкий до дії мінеральних кислот, марганцево-кислого калію, УФ-променів, але нестійкий у лужному середовищі — при обробці соломи або токсину 0,5%-м розчином луку відбувається його інактивація.

**Дендродохіні.** Це токсини, що утворюються грибом *Dendrodochium toxicum*. Захворювання називається *дендродохіотоксикоз*. Характерною особливістю захворювання є швидка загибель тварин — через 12–24 год після подання смертельної дози токсичного корму (для коня — 350–450 г ураженої грибом половини). Дендродохінам притаманна також антигрибна дія, вони затримують ріст окремих видів фітопатогенних грибів і дріжджів. З дріжджів найчутливіші *Candida stellatoidea* та *Saccharomyces vini*. Вони запропоновані як тест-культури для кількісного визначення дендродохіну. За хімічною природою дендродохіні є трихотеценами (макроциклічні сполуки).

**Спорофузаріотоксини.** Утворюються грибом *Fusarium sporotrichiella*. За хімічною природою належать до трихотеценів.

**Афлатоксини.** Утворюються грибами групи *Aspergillus flavus-oryzae*. Вивчення токсичних властивостей пов'язане з захворюваннями каченят та індичат. Афлатоксини є похідними дегідрофурану (кумарину). До афлатоксину стійкі деякі види грибів, дріжджі. Найчутливішими є штами *Bacillus brevis*.

#### 8.7.5. Стимулятори росту рослин і вітамін

Стимулятори (регулятори) росту — це речовини, які в малих кількостях стимулюють ріст рослин. До них належать *ауксини* та *гібереліни*.

Ауксини були відкриті в 30-х роках XX ст. За хімічною природою вони належать до групи сполук β-індолілоцтової кислоти. Ауксини утворюються багатьма ґрунтовими сапрофітними бактеріями, активоміцетами, грибами.

Гібереліни синтезуються грибами *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*. Вперше відкриті у 1935 р. в Японії при вивченні захворювання рису. У наш час відомо кілька десятків гіберелінів. За хімічною природою вони є ациклічними сполуками флуоренового ряду. Після оброблення гіберелінами озимі рослини можуть плодоносити без проходження стадії яровизації (дії низьких температур); дворічні рослини зацвітають у перший рік, стимулюється цвітіння, залежно від обробки одержують плоди томатів без насіння, виноград без кісточок. Під впливом гіберелінів прискорюється розпускання бруньок у берези, каштана, липи.

**Вітаміни.** Представники роду аспергілів акумулюють у клітинах і виділяють у навколишнє середовище значні кількості тіаміну, рибофлавіну. Синтез вітамінів групи В (тіамін, біотин, піридоксин, пантотенова та нікотинова кислоти) виявлено у різних видів пеніцилів, фузаріїв. Продукентами каротинів є гриби *Blakeslea trispora*.

### 8.7.6. Органічні кислоти

Розглянемо дві найстаріші технології одержання органічних кислот за допомогою грибів. Здатність грибів до синтезу органічних кислот буде розглянута також у розділі 12 (параграф 12.6 "Неповні окиснення").

**Лимонна кислота.** Виробництво лимонної кислоти за участю грибів — давній біотехнологічний процес. Воно було налагоджено у 1893 р. Розвиток цієї технології відбувався у тісному взаємозв'язку з розробкою багатьох фундаментальних аспектів мікробіології. Спочатку основні проблеми були пов'язані з інфікуванням процесу. Було встановлено, що запобігти цьому можна, якщо вести процес за дуже низьких значень рН, і це майже ніяк не впливає на утворення грибами кислоти. Перші варіанти процесу базувалися на поверхневому культивуванні грибів, проте у 1950 р. було освоєно глибоке культивування. Промисловим продуцентом лимонної кислоти є *Aspergillus niger*, але використовується і *Aspergillus wentii*.

Процес ферментації складний, оскільки лимонна кислота є продуктом первинного метаболізму. Будь-яке виділення первинного метаболіту (у даному разі лимонної кислоти) свідчить про сильне порушення метаболізму. Ріст грибів регулюють зміною складу середовища (фосфор, магній, залізо, цинк). Надпродукція лимонної кислоти буває за браку фосфору. Оптимум рН становить 1,7–2,0. За вищого значення рН у середовищі, крім лимонної, накопичуються значні кількості щавлевої та глюконової кислот. Лимонна кислота використовується в харчовій, фармацевтичній, косметичній промисловостях.

**Глюконова кислота.** Промисловий випуск цієї кислоти з глюкози був налагоджений ще у 20-х роках ХХ ст. Продуцентом є *Aspergillus niger*. Вихід глюконової кислоти досягає 90–95 % за підтримання рН на певному рівні в процесі синтезу кислоти.

Для регуляції рН використовують їдкий натр, тому глюконову кислоту одержують у вигляді глюконату натрію.

Натрієва сіль глюконової кислоти входить до складу лужних засобів, які використовуються для миття пляшок. Глюконова кислота також здатна зв'язувати іони заліза у широкому діапазоні рН і тому є компонентом препаратів, що застосовуються для боротьби з іржею (глюконова кислота є агентом, який перешкоджає відкладенню заліза). Кальцієві та залізні солі глюконової кислоти використовуються як пероральні та внутрішньовенні препарати у медицині, чиста глюконова кислота — як мийний засіб у молочній промисловості.

### 8.8. ВПЛИВ ЗОВНІШНІХ ФАКТОРІВ НА РІСТ І ФІЗІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ГРИБІВ

Гриби відрізняються від інших мікроорганізмів дуже широкою пристосовуваністю до різних умов існування, але і серед них є види, які можуть існувати в обмежених умовах середовища.

**Температура.** Більшість грибів росте в інтервалі температур 18–25 °С. Але серед них також є психрофільні (від -3 до +10 °С), мезофільні (10–38 °С), термофільні (20–50 °С) культури. Відмінною рисою деяких видів грибів є те, що амплітуда оптимальної температури для них може бути значно ширшою, ніж для бактерій. Так, для *Aspergillus fumigatus* вона становить 25–50 °С (хоча для багатьох аспергілів її межі 26–28 °С). Температура, оптимальна для росту, не завжди є оптимальною для утворення первинних чи вторинних метаболітів. Так, для *Fusarium sporotrichiella* за глибокого вирощування оптимальною для росту міцелію є температура 18–24 °С, а для синтезу глюкозооксидази — 25 °С. Періодична зміна температури від 18 до 24 °С у процесі культивування цього гриба супроводжується максимальним утворенням токсину. Температура культивування *Sclerotium glaucum* впливає на вихід полісахариду склероглюкану. Оптимальною для утворення склероглюкану є температура 20 °С. Із зниженням температури спостерігається утворення побічних продуктів: щавлевої, яблучної і фумарової кислот.

**Світло.** Пряме світло пригнічує ріст грибів. Але чергування освітлення і темноти стимулює ріст і спорування багатьох грибів. При цьому відзначаються деякі періоди адаптації при переході від освітлення до темноти, і навпаки.

Реакція грибів на світло буває двох типів: *фототаксис* (рух у напрямку світла); *фототропізм* (ріст у напрямку світла). При цьому фототропізм буває позитивним (ріст, спрямований до світла) і негативним (ріст, спрямований у протилежний від світла бік). Реакції фототропізму найхарактерніші для репродуктивних органів. Гіфальні структури реагують на світло переважно негативним фототропізмом.

Механізм дії іонізуючої радіації на гриби повністю не встановлений. Але результати експериментальних досліджень свідчать про високу радіостійкість грибів. Деякі види грибів здатні існувати й рости на радіоактивному графіті. Це явище отримало назву *позитивного радіотропізму*.

**Кислотність середовища.** Розрізняють мінімальне, оптимальне та максимальне значення рН для росту, спорування та фізіологічної активності грибів. Дуже часто ці значення не збігаються. Здебільшого для грибів оптимальним є рН 4,0–5,0. Але *Aspergillus clavatus* росте і спороносить за рН 13,0. У процесі росту гриби змінюють кислотність середовища завдяки виділенню метаболітів (наприклад, органічних кислот). Так, під час синтезу пулулану (продуцент *Aureobasidium pullulans*) рН середовища знижується від 6,5 до 4,0 за рахунок накопичення органічних кислот.

У багатьох грибів залежно від рН можуть змінюватись культуральні та морфологічні ознаки: забарвлення середовища і колоній, характер росту міцелію, розміри та форма органів розмноження, утворення хламідоспорового типу клітин та ін., що в свою чергу може впливати на фізіологічну активність грибів.

Так, у періодичній культурі *Aureobasidium pullulans* кількість дріжджоподібних клітин збільшується за підвищення початкового значення рН від 3,5 до 6,0. Одночасно збільшується кількість утворюваного пулулану, тоді як рівень біомаси не змінюється. Крім того, за підтримання рН у межах 5,0–6,3 синтез меланіну клітинами мінімальний, що значно полегшує очищення пулулану. Як і в умовах періодичної культури, за хемостатного культивування *Aureobasidium pullulans* морфологія клітин визначається рН середовища: низькі значення рН сприятливі для утворення міцеліальних форм. Оптимальним для біосинтезу пулулану є значення рН 4,5, за якого культура складається з 50 % дріжджоподібних і 50 % міцеліальних клітин. З підвищенням рН рівень біомаси збільшується, але вихід пулулану знижується.

**Відношення грибів до кисню та вуглекислоти.** Серед грибів невідомі облигатні анаероби, але багато видів можуть рости та спороносити за пониженого вмісту кисню в середовищі. Як приклад можна навести ріст грибів на фруктових соках, варених у закритих банках. Багато видів ґрунтових фітопатогенних грибів є стійкими до підвищеного вмісту вуглекислоти. У природних умовах ріст грибів за підвищеної концентрації вуглекислоти спостерігається в асоціаціях з активними аеробними мікроорганізмами, всередині тканин рослин і тварин, у водному середовищі. Підвищення вмісту вуглекислоти стимулює проростання спор багатьох видів фітопатогенних грибів.

**Інші фактори.** Існують осмофільні гриби, здатні рости на середовищах з високим осмотичним тиском, наприклад на концентрованих розчинах цукрів (до 60–80 %). Як правило, такі гриби ростуть на варенні, фруктових соках, сиропях тощо. Галофільні гриби здатні рости на середовищах з високою концентрацією (від 3 до 20 %) хлористого натрію. Вони зустрічаються в засоленних ґрунтах, при консервуванні (солінні) овочів.

## 8.9. ПОШИРЕННЯ ГРИБІВ І ХАРАКТЕРИСТИКА ЕКОЛОГІЧНИХ ГРУП

**Географічне поширення грибів.** Гриби поширені в ґрунті, повітрі, у водоймах, на рослинах, тваринах, людині. У порівнянні з рослинами й тваринами їх географічний ареал ширший. Найчастіше гриби зустрічаються в ґрунті, повітрі, частково у воді. Це пов'язано з наявністю рослинних субстратів, які для грибів є найбільш придатними поживними субстратами у природі. Залежно від характеру субстрату гриби адаптуються до нього, при цьому відбувається відбір спеціалізованих видів грибів чи асоціацій та їх швидке поширення. Так, у деревних рослин переважають певні види базидіоміцетів — паразитів і мікоризних<sup>\*</sup>, у трав'янистих зустрічаються базидіальні, аскоміцети, дейтероміцети. Епіфітна гриба флора рослин відрізняється за складом від мікофлори, яка мешкає на коренях тих самих рослин. Ґрунті устелі у різних географічних районах характеризуються однако-

<sup>\*</sup> *Мікориза* — сплетіння гіфів на поверхні чи всередині тканин коренів деревних, чагарникових і трав'янистих рослин; фізіологічно — симбіоз певних видів грибів і вищих рослин.

вою грибною флорою, в якій переважають темнотілабарвлені гриби. У високогірних ґрунтах містяться більше мікроміцетів, ніж макроміцетів, а на голих схилах ґрабо на схилах, покритих чагарниковою чи трав'янистою рослинністю, переважають базидіоміцети (макроміцети). Отже, можна вважати, що географічний ареал грибів пов'язаний з ареалом вищих рослин.

Біологічні особливості грибів — гіфальна форма росту, яка забезпечує контакт з навколишнім середовищем, активний метаболізм гіфальних клітин, швидке заселення та видозміна субстрату — відіграють важливу роль у поширенні грибів. Крім того, у грибів спостерігається високий рівень адаптації до умов навколишнього середовища.

Наука, яка вивчає процеси життєдіяльності організмів у природі, вплив і взаємовідносини їх з навколишнім середовищем і між собою, називається *екологією*. Екологія грибів, як і інших організмів, вивчає вплив багатьох факторів на їх поширення у природі. Гриби є елементом екологічної системи.

**Зовнішні фактори** (фактори навколишнього середовища) впливають прямо чи опосередковано на поширення грибів у певних екологічних нішах. Наприклад, такий фізико-хімічний фактор, як температура, забезпечує циклічність росту та розмноження грибів. Вода справляє прямий чи опосередкований вплив внаслідок розчинення в ній поживних і отруйних для грибів речовин. Вологість субстрату, особливо повітря, температура визначають ріст певних видів грибів. Так само і вода ґрунтів впливає на склад повітря та обмін речовин у ґрунті, що в свою чергу зумовлює присутність тих чи інших грибів. Крім фізико-хімічних факторів, велике значення для поширення грибів мають *біотичні фактори* — рослини, тварини, мікроорганізми. Біотичні фактори можуть бути різними за своєю природою: метаболічні, симбіотичні, паразитичні, антибіотичні та ін. Як і інші організми, гриби в природі ростуть не ізольовано від інших організмів, а навпаки, у тісному взаємозв'язку з ними. Така взаємопов'язана діяльність мікроорганізмів називається *асоціацією*. Характер асоціації грибів з іншими організмами різноманітний і також залежить від багатьох факторів. Так, різні комахі уражаються багатьма видами грибів, але в той же час для багатьох комах гриби є джерелом живлення. Паразитні гриби, уражаючи тканини рослин, створюють умови для розвитку сапрофітних грибів.

У результаті складних взаємозв'язків — біотичних, фізико-хімічних, географічних (кліматичних) факторів — виникають

певні *екологічні групи грибів*, які складаються з видів, адаптованих до певних умов у природі. Розглянемо найважливіші екологічні групи грибів.

**Ґрунтові гриби.** Ґрунт є місцем знаходження більшості грибів різних систематичних груп. Гриби існують у ґрунті не тільки у вигляді органів спороношення та форм спокою, а й у вигляді фізіологічно активного міцелію.

Мікофлора ґрунту представлена всіма класами грибів: фікоміцетами, аскоміцетами, базидіоміцетами, дейтероміцетами. Найпоширенішими ґрунтовими грибами є представники родів *Trichoderma*, *Mucor*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*. У ґрунті зберігаються спори та інші структури багатьох паразитичних грибів, наприклад хитридіального гриба *Synchytrium endobioticum* — збудника раку картоплі та ін.

На видовий склад грибів впливають тип ґрунту, клімат, рослинність, характер обробки ґрунту та інші фактори. У ґрунтах, вкритих рослинністю, мікофлора представлена мікоризними, *ризосферними*<sup>\*</sup>, паразитними та сапрофітними грибами. Причому серед мікоризних грибів є паразити та сапрофіти, які використовують тканини та органи рослин, рослинні залишки. Ризосферні гриби є сапрофітами, вони використовують органічні та мінеральні речовини ґрунту.

Роль грибів у ґрунті різноманітна та значна. Так, гриби разом з іншими організмами беруть участь у розкладанні рослинних і тваринних залишків, тобто в кругообігу речовин у природі та створенні родючості ґрунтів. Ґрунтові гриби беруть пряму участь у живленні вищих рослин, а також є збудниками їх захворювань. Мікологія ґрунту в наш час є складовою частиною *ґрунтової мікробіології*.

Гриби, завдяки особливостям будови і метаболізму, відіграють велику роль у створенні структури ґрунту. Так, гіфи здатні адсорбувати на поверхні дрібні частинки ґрунту, утворюючи міцні агрегати, що сприяє обміну мінеральної частини ґрунту, перетворенню нерозчинних солей у розчинні, вимиванню деяких елементів. Гриби часто беруть участь у початкових етапах гідролізу рослинних полімерів (целюлози, геміцелюлози, лігніну), створюючи умови для розвитку інших мікроорганізмів.

\* Ризосфера — частина ґрунту, яка безпосередньо стикається з коренями рослин.

З вищих грибів найактивнішими руйнівниками целюлози є базидіоміцети, аскоміцети та дейтероміцети. Серед останніх особливо активні *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma koningii*, *Cladosporium herbarum*, види родів *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Stachybotrys*.

Лігнін у ґрунті розкладається головним чином базидіальними грибами та дейтероміцетами. Але дейтероміцети представлені відносно невеликою кількістю видів. Наприклад, вивчення понад 1500 штамів різних видів родів *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, виділених із ґрунту, показало, що близько 30 % з них не використовували лігнін як єдине джерело вуглецю та енергії.

Ґрунтові гриби беруть участь у процесах синтезу та розкладу гумінових кислот<sup>5</sup>, головного компонента ґрунтового гумусу<sup>6</sup>. Багато грибів синтезують меланіни, феноли, які включаються в синтез гумінових кислот, а деякі гриби здатні розкласти гумінові кислоти.

Отже, ґрунтові гриби є складниками біоценозів і беруть участь у кругообігу речовин у природі при розкладанні органічних речовин ґрунту, в утворенні структури ґрунту та його родючості.

**Гриби у повітрі.** Гриби у повітрі містяться у вигляді спор (конідій, спор, хламідоспор, аскоспор, базидіоспор) та фрагментів міцелію. Кількість спор коливається залежно від висоти атмосферного шару, характеру місцевості, пори року, складу рослинності та ін.

У повітрі біля поверхні землі на висоті до 2 м в 1 м<sup>3</sup> повітря в сільській місцевості міститься до 12,5 тисяч спор: *Cladosporium* — 47 % від загальної кількості; *Sporulomyces* — до 31; базидіоспор істівних і неістівних грибів — близько 3 %. Якщо висота знижується, кількість спор збільшується.

Вважають, що головним джерелом спор у повітрі є гриби, які існують на культурних і диких рослинах, рослинних залишках, у поверхневих шарах ґрунту. Гриби у повітрі поширюються пасивним розсіюванням (вітер, краплі дощу та ін.) і завдяки наявності фізико-хімічного та морфологічного апарата викидання спор із плодівих містощиць.

<sup>5</sup> Гумінові кислоти — це полімери фенолів, індолів з амінокислотами, пептидами та іншими сполуками.

<sup>6</sup> Гумус — комплекс багатьох складних органічних речовин рослинного, тваринного та мікробного походження: до 90 % гумусу становлять гумінові кислоти (на їх частку припадає 50–80 %) та полісахариди різного походження.

Вивчення мікофлори повітря має важливе санітарно-гігієнічне та фітопатологічне значення. Спори фітопатогенних грибів у повітрі можуть переноситися на значні відстані і таким чином сприяти поширенню захворювання рослин.

Підвищений вміст грибів у повітрі виробничих приміщень під час оброблення рослинної сировини шкодить здоров'ю працівників (спричиняє алергічні захворювання). Підвищений вміст спор домового гриба *Serpula lacrymans*, який руйнує дерев'яні частини будівель у житлових приміщеннях, може спричиняти напади астми. У повітрі житлових приміщень переважають спори аспергілів і мукових грибів.

Отже, склад і концентрація спор у повітрі безпосередньо стосуються медичної мікології.

**Водні гриби.** Водойми займають значну частину поверхні планети. Тільки поверхня морів та океанів становить 3/4 цієї частини. Наука гідробіологія вивчає склад, чисельність, біологію та закономірності розвитку водних організмів.

Гриби, що мешкають у прісних і морських водоймах, належать переважно до нижчих грибів, які за сучасними уявленнями вилучені із царства грибів, але багатьма мікологами вони ще розглядаються як представники грибів.

Водні гриби беруть участь у кругообігу речовин у водоймах, у процесах розкладання і мінералізації органічних речовин. Багато грибів паразитує на рибах, тваринах, водоростях, спричиняючи різні захворювання і навіть епідемії, які призводять до порушення трофічних ланцюгів водойм. Водні гриби є також агресивними агентами біологічних пошкоджень водних споруд, приладів, матеріалів. Вони є об'єктом вивчення водної мікології.

**Гриби прісних водойм.** Якісний і кількісний склад грибів прісних водойм змінюється залежно від температури, пори року, вмісту органічних речовин та інших факторів. Як правило, грибів більше в прибережних зонах і в стоячій воді, ніж у проточних водах рік і ручайів.

Фікоміцети, які утворюють зооспори (рухомі спори), є типовими представниками мікофлори прісних водойм. Поряд з фікоміцетами зустрічаються види дейтероміцетів, які розкладають рослинні залишки. Зустрічаються також види, які паразитують на водоростях, комах та інших представниках зоо- та фітопланктону.

**Гриби морських вод.** Більшість грибів, поширених у морських водах, є аскоміцетами та дейтероміцетами. Серед них



зустрічаються сапрофітні форми, що розвиваються на деревині, риболовних снастях, і паразитні, що живуть на представниках морського фауни (губки, креветки, краби, моллюски, риби) та флори (мікро- та макроводорості).

На занурених у морську воду деревних залишках виявлені представники родів *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Trichoderma*. У морських водоймах, особливо прибережних зонах, поширені гриби родів *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*. Ці види можуть зустрічатися навіть на глибині до 4000 м. Флора морських водойм характеризується наявністю дріжджів, які також зустрічаються і на глибині до 4000 м.

Здатність водних грибів використовувати певний субстрат є, як і для інших екологічних груп грибів, одним з регулювальних факторів заселення тих чи інших видів. Для морських сапрофітних грибів такими специфічними субстратами є клітковина, пектин і хітин. Водні фікоміцети переважно використовують органічні джерела азоту, а багато видів гіфоміцетів — нітратний та амонійний азот.

**Фітопатогенні гриби.** Фітопатогенні гриби уражують рослини. До цієї групи входить понад 10 000 видів грибів. За ступенем паразитизму фітопатогенні гриби поділяють на obligатні та факультативні. У obligатних паразитів життєвий цикл проходить у живій рослині. Факультативні паразити здатні паразитувати на живій рослині, але також можуть вести і сапрофітний спосіб життя.

Фітопатогенні гриби паразитують на сільськогосподарських рослинах, вони уражують і спричиняють захворювання різних органів наземної частини і кореневої системи рослин під час їх вегетації, а також у процесі зберігання зерна, овочів, фруктів.

Фітопатогенні гриби спричиняють такі захворювання:

**в'янення** — ураження провідної та кореневої систем. Гриб локалізується і розвивається у провідних судинах, спричиняючи їх механічне закупорення, внаслідок чого відбувається в'янення рослини;

**гниття** — під дією ферментів грибів як первинна ознака виникає пом'якшення та руйнування тканин;

**плямистість, або некрози** — відмирання в місцях ураження грибом окремих ділянок тканин;

**виразки (антракнози)** — плямистості, що характеризуються пом'якшенням тканин, утворенням заглиблень, в яких відбувається спороношення гриба;

**грибний наліт** — розвиток міцелію і спороношення на поверхні уражених органів рослин;

**пустули** — утворення на ураженій тканині внаслідок розриву її епідермісу випуклих спороношень гриба;

**муміфікації** — уражений орган рослин, пронизаний міцелієм гриба, часто набуває форми темозабарвленого склеротію.

Вивченням фітопатогенних грибів займається наука *фітопатологія*.

Фітопатогенні гриби зустрічаються серед представників усіх класів грибів як нижчих, так і вищих. Серед мікроміцетів — це представники родів *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*.

**Гриби, які розкладають деревину.** Ці гриби руйнують деревину на всіх етапах: від пошкодження лісових дерев до розкладання деревини під час зберігання, а потім — у спорудах і виробках. Деревні клітинні оболонки складаються головним чином з целюлози (основний компонент), геміцелюлоз, лігніну, пектинів, а також смол, білків та інших сполук, представлених у невеликих кількостях. До грибів, які розкладають деревину, належать в основному базидіальні, а також деякі види аскоміцетів і на більш пізніх стадіях розкладання — дейтероміцети. Серед них є сапрофіти та паразити.

Спеціальним терміном “домові гриби” називають групу грибів, які пошкоджують дерев'яні частини будівель (*Serpula lacrymans*).

**Гриби, патогенні для людини та тварин.** Ці гриби вивчає медицина та ветеринарна мікологія. Вони спричиняють захворювання, які називаються *мікозами*. Більшість збудників захворювань належить до дейтероміцетів (відомо близько 150 видів), фікоміцетів (26 видів) та аскоміцетів (28 видів). За способом локалізації гриби — збудники мікозів можна поділити на такі, що спричиняють загальні мікози (генералізовані) та місцеві мікози.

**Генералізовані мікози.** Кандидози — захворювання, яке спричиняється дріжджоподібними грибами роду *Candida* (найчастіше — *Candida albicans*). Ці сапрофітні організми дуже поширені на багатьох рослинах, фруктах, овочах, ґрунті, молочних виробках. Вони є типовими представниками сапрофітної флори травного тракту людини та тварин, слизової ротової порожнини. Захворювання розвивається при ослабленні організму під дією несприятливих факторів, при антибіотикотерапії, коли спостерігається *дисбактеріоз* (порушення співвідношення видів



мікроорганізмів). У даному разі під дією антибіотиків зникає чутлива до них бактеріальна мікрофлора і переважно розвивається стійкіша дріжджова. Щоб запобігти цьому, під час прийому антибіотиків призначають також протигрибкові препарати — ністатин, антифунгін.

**Пневмомікози** — захворювання, які спричиняються грибами, що паразитують у тканинах бронхів і легенів. Типовим збудником є *Aspergillus fumigatus*. Це захворювання дуже поширене у птахів, особливо водоплавних, великої рогатої худоби, звично рідше у людини. Джерелом інфекції, як правило, є уражені корми, різна рослинна сировина. Крім *Aspergillus fumigatus*, мікози людини та тварин спричиняються окремими видами пеніцилів і мукорових грибів.

**Мікози зовнішніх покривів** спричиняються **дерматофітними та кератифілітними** грибами. Найнебезпечнішим захворюванням є стригучий лишай. Основними збудниками є види родів *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*. Ці гриби здатні розвиватися у дріжджовій і міцеліальній (гіфальній) формі, тобто проявляти диморфізм. Патогенні властивості притаманні обома формам.

**Ентомофільні гриби.** Ця екологічна група грибів різноманітна як за характером взаємовідносин грибів з комахами, так і за ступенем облігатності чи факультативності їх паразитизму на комах. Термін "ентомофільні" означає різний трофічний характер взаємовідносин між грибами та комахами. Їх ще називають "інсектопаразитуючими грибами". До таких грибів належать представники аско-, зиго- та базидіоміцетів. Поділяються на **ектопаразити та ендопаразити**. Ектопаразити розміщуються на поверхні тіла комах (міцелій розвивається на поверхні). Крім аскоміцетів, до ектопаразитів належать деякі дейтероміцети. Міцелій ендопаразитів розвивається всередині тіла комах.

**Гриби-хижаки.** Це надзвичайно цікава екологічна група грибів, представники якої здатні захоплювати, умертвляти і переварювати нематод і найпростіших. Найтипівішим представником хижаків, що уражають нематоди, є *Arthrobotrys oligospora*. Хижак захоплює нематоду за допомогою так званих уловлювачів — спеціальних кілець, що утворюються в їх міцелії і покриті липким слизом.

**Мікофільні гриби.** Це гриби, здатні існувати на інших грибах як на поживному субстраті. Мікофільні гриби паразитують на фітопатогенних грибах, на вищих істивних. Серед облігатних

паразитів є внутрішньоклітинні та позаклітинні. Мікофільні гриби виявлені серед аско-, базидіо- та дейтероміцетів. Так, дуже поширений ґрунтовий дейтероміцет *Trichoderma* може паразитувати на багатьох видах ґрунтових гіфоміцетів. Багато видів аспергилів і пеніцилів можуть проникати у спорангіоносії мукоральних грибів.

**Гриби-симбіоти.** **Симбіоз** — взаємовигідне тісне співжиття (співіснування) двох різних організмів.

**Симбіоз з рослинами.** Лишайники — організми, які утворюються в результаті симбіозу грибів (головним чином аскоміцетів) і водоростей. Ці два організми розрізняються за типом живлення. Гриби є гетеротрофами, водорості — автотрофами. У процесі симбіозу грибний організм отримує необхідні джерела вуглецю від водорості, а водорості отримує від грибів мінеральні речовини, вітаміни, органічний азот, вологу та ін.

**Мікоризні гриби.** Мікоризи деревних порід викликаються базидіальними грибами. Деякі гриби не випадково з'являються під певними деревами. Очевидно, що міцелій цих грибів, проникаючи в коріння, постачає рослини поживними речовинами. Рослина є постачальником кисню для гриба (особливо в ґрунтах, бідних на кисень). Фізіологічною особливістю мікоризних грибів є потреба у вітамінах групи В — тіаміні, пантотенові та нікотиновій кислотах, біотині.

**Симбіоз з тваринами.** Найтипівішим прикладом є симбіоз грибів з різними комахами. При цьому в кишкках і тілі комах утворюються великі клітини — міцетомі. Мурахи та терміти використовують міцелій грибів як джерело живлення.

**Істівні гриби.** До цієї групи належать переважно гриби з соковитими м'ясистими плодовими тілами. Вони представлені базидіальними грибами, які утворюють плодові тіла у вигляді головок (шяпок), та аскоміцетами з соковитими плодовими тілами. Часто істівні гриби є мікоризними, але багато з них — сапрофітні ґрунтові гриби, які утворюють плодові тіла на лісовому опаді, який розкладається, та інших органічних субстратах (компості, гній).

Нараховують кілька сотень видів істівних грибів, але тільки кілька десятків використовуються людиною для харчування.

Останніми роками інтенсивно розвивається культивування істівних грибів у промисловому масштабі (шампінйони та глива). Урожайність таких грибів становить 15–40 кг/м<sup>2</sup> площі.

при цьому врожай знімається багаторазово з однієї площі впродовж року.

Гриби, які пошкоджують промислові вироби, матеріали, споруди. Пошкодження матеріалів, промислової сировини та виробів розглядаються як специфічне екологічне місце існування грибів. Видовий склад грибів і ступінь ураження залежать від характеру субстрату, його доступності для гриба. На ступінь корозії металевих і неметалевих виробів впливають фізико-хімічні фактори: рН, температура, вологість, концентрація кисню та вуглекислоти. Багато видів сапрофітних грибів можуть використовувати важкодоступні субстрати (оптичне скло, парафіни, паливо, масла, мастильні матеріали та ін.).

Так, у прокатних маслах, охолоджувальних системах і промислових водах сталепрокатних підприємств виявлено бактерії, дріжджі та гриби, головним чином, родів *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*. Гриб *Cladosporium resinae* часто виявляється в резервуарах завіаційним паливом. Спори цього гриба не втрачають життєздатності в парах газу впродовж понад три місяці. Розвиток грибів у паливних системах літаків може створювати аварійні ситуації внаслідок корозії паливних насосів чи стінок резервуарів. Щоб запобігти цьому, використовують біоциди (інгібітори росту мікроорганізмів-деструкторів), а також наносять протикорозійні покриття.

Гриби можуть розкладати пластмаси. З таких матеріалів виділяють близько сотні видів грибів, серед них найчастіше зустрічаються аспергіли, пеніцили, фузарії. Багато водних грибів здатні спричиняти корозію пластмас. Відомі гриби, які руйнують оптичне скло (*Aspergillus niger*). Грибами уражуються деталі різних приладів зі склади. Найактивнішими руйнівниками скла є аспергіли.

Синтетичну гуму здатні розкладати види родів *Cephalosporium*, *Penicillium*. Гриби розкладають бітумні та полімерні матеріали, за підвищеної вологості здатні руйнувати картини, твори образотворчого мистецтва. З пошкоджених ділянок картин виділені *Cladosporium elatum*, *Cephalosporium acremonium*, *Aspergillus versicolor*.

#### Контрольні запитання до розділу 8

1. За якими ознаками гриби подібні до рослин і тварин?
2. Яке місце займають гриби серед живих організмів?
3. Які функції виконують структурні компоненти грибної клітини?
4. Що таке диморфізм? Охарактеризуйте видозміни міцеліального росту.

5. За допомогою яких способів відбувається розмноження грибів?
6. Які особливості статевого розмноження притаманні нижчим грибам, аскоміцетам і базидіоміцетам?
7. Дайте характеристику класів грибів, що входять до відділу Eumycota.
8. Яких змін зазнала систематика грибів у результаті аналізу нуклеотидної послідовності рибосомальної РНК? Чим відрізняються між собою систематики Д.Л. Хейкворта, Л. Маргеліс та К.В. Шварц, Т. Кавалір-Сміта?
9. Які біологічно активні речовини синтезуються грибами? Які метаболіти належать до первинних і вторинних?
10. Як впливають зовнішні фактори на фізіологічну активність грибів?
11. Охарактеризуйте екологічні групи грибів.

## 9. ДРІЖДЖІ

У наш час дріжджі розглядають як групу вищих грибів, що переважно вегетують в одноклітинній формі та розмножуються брунькуванням або поділом. До грибів дріжджі зараховують на основі ряду характерних ознак: наявність ядра, відсутність фотосинтезувальних пігментів і рухомості, наявність глікогену як запасної речовини. У більшості дріжджів клітини безбарвні, деякі види синтезують червоний, оранжевий або жовтий пігменти.

Дріжджі відрізняються за формою вегетативних клітин, статевих спор і культуральними ознаками. Ростуть, як правило, у температурному діапазоні від 0 до 37 °C, можуть розвиватись в аеробних та анаеробних умовах за рН від 3 до 8, нижня межа водної активності становить 0,90–0,60.

Як і всім грибам, дріжджам притаманний адсорбційний тип живлення. Більшість з них є сапрофітами: існують у філосфері та ризосфері рослин, ґрунті, морській і прісній воді, інших природних субстратах. Розвиваються дріжджі також у шлунково-кишковому тракті, на поверхні шкіри тварин. Одні з них здатні існувати в різноманітних екологічних нішах, інші — тільки в специфічних, різко обмежених умовах. Описано понад 500 видів дріжджів, які належать більш як до 60 родів.

### 9.1. ОСНОВНІ ЕТАПИ ДОСЛІДЖЕННЯ ДРІЖДЖІВ

Основні етапи дослідження дріжджів такі:

- 6000 р. до н.е. Свідчення про пивоваріння в Єгипті.
- 1000 р. до н.е. Свідчення про споживання напоїв з переганного спирту у Китаї.
- 1192 р. н.е. Виробництво віскі в Ірландії.

- 1200–1300 рр. Поширення пивоваріння в Північній Європі.
- 1680 р. А.Левенгук вперше спостерігав дріжджі.
- 1832 р. Х.Г. Персон і Е.М. Фріс встановили належність дріжджів до грибів.
- 1837 р. Й.Ф. Мейєр дав пивним дріжджам назву *Saccharomyces cerevisiae*.
- 1839 р. Т. Шванн описав спори дріжджів.
- 1863 р. Л. Пастер встановив роль дріжджів у бродінні.
- 1866 р. А. де Варі описав життєвий цикл дріжджів.
- 1881 р. Е.Х. Хансен отримав чисті культури.
- 1896 р. Е.Х. Хансен опублікував наукову класифікацію дріжджів.
- 1897 р. Е. Бюхнер повідомив про здатність безклітинних дріжджових екстрактів здійснювати бродіння.
- 1934 р. Г.У. Вінг виявив чергування гаплоїдної та диплоїдної фаз у життєвому циклі дріжджів.
- 1935 р. К.К. Ліндгрен виявив гетероталізм у *Saccharomyces*.
- XX ст., друга половина Широке використання дріжджів у біотехнології.

### 9.2. БУДОВА ДРІЖДЖОВОЇ КЛІТИНИ

Дріжджова клітина — це типова сукаріотична клітина, яка складається з клітинної стінки, цитоплазми та цитоплазматичною мембраною та органелами (ендоплазматичний ретикулум, діктіосоми, лізосоми, мікротільця, мітохондрії, рибосоми, включення, вакуолі, ядро) (див. розд. 5, рис. 5.8). Ядро чітко відокремлене і оточене мембраною.

**Клітинна стінка.** Дріжджова клітина відділена від зовнішнього середовища клітинною стінкою завтовшки 70–350 нм. Основним компонентом клітинної стінки дріжджів є полісахариди (до 60–70 % сухої маси). Крім полісахаридів, у складі клітинної стінки виявлено білки (6–13 %), ліпіди (2–9 %) та неорганічні поліфосфати. Основними структурними одиницями полісахаридів є переважно глюкоза і маноза. Як приклад, на рис. 9.1 показана клітинна стінка хлібопекарських дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, яка складається з фосфоманану, манану, глюкану та білків.

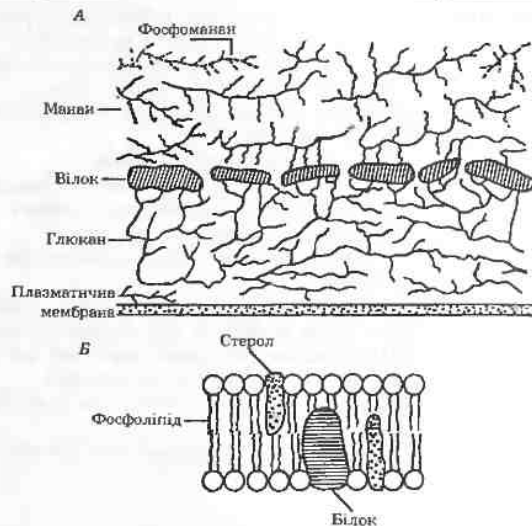


Рис. 9.1. Схематичне зображення структури клітинної стінки дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (А) та плазматичної мембрани (Б)

Крім гомополімерів, клітинні стінки дріжджів можуть містити і гетерополімери. Так, галактоманани є складовими клітинних стінок у дріжджів родів *Trichosporon*, *Torulopsis*. У деяких видів базидіоміцетних дріжджів виявлено ксилومانани. До складу клітинних стінок дріжджів входить також амінополісахарид хітин.

**Капсула.** Багато які дріжджі, що існують у природних субстратах, бідних на доступні поживні речовини, формують на поверхні клітини капсулу полісахаридної природи. Раніше вважали, що капсула забезпечує прикріплення клітин, перешкоджаючи їх змиванню, а також захищає клітини від дії несприятливих факторів. Пізніші дослідження показали, що наявність капсули зумовлює асиміляцію поживних речовин за умови їх низької концентрації в навколишньому середовищі.

Відмінності у хімічному складі капсульних і позаклітинних полісахаридів дріжджів деякі дослідники розглядають як

таксономічну ознаку. Так, фосфоманани є характерними складовими полісахаридів у представників родів *Hansenula* та *Pichia*. У дріжджів роду *Rhodotorula* основним компонентом є манан, у *Cryptococcus* — кислий гетерополісахарид, який складається з ксилози, манози та глюкуронової кислоти.

**Цитоплазматична мембрана** складається з подвійного шару ліпідів, який міститься між тонкими шарами білка. Білкові молекули розміщуються не тільки на поверхні мембрани, а й пронизують її наскрізь (див. рис. 9.1). Плазмалема у дріжджів має товщину близько 7 нм, містить приблизно однакову кількість ліпідів і білків і значно менше вуглеводів. Ліпіди представлені в основному моно-, ди- і тригліцеридами, гліколіпідами та невеликими кількостями стеролів (ерго- та зимостерол). Вміст вуглеводів становить 2–10 % маси мембрани. Вуглеводні компоненти присутні у вигляді гліколіпідів і глікопротеїнів.

Ядро оточене ядерною мембраною (двошарова перфорована мембрана). ДНК (носіє генетичної інформації) розподілена між хромосомами.

**Мітохондрії** — сферичні чи паличкоподібні структури, оточені двошаровою мембраною. Складки внутрішньої мембрани утворюють кристи. Внутрішня мембрана містить електрон-транспортного ланцюга та АТФ-синтазу. У дріжджовій клітині ядро є основним, але не єдиним носієм генетичної інформації. Частина такої інформації міститься в ДНК мітохондрії.

**Ендоплазматичний ретикулум** являє собою систему мембранних пластин, каналів, бульбашок і цистерн, оточених елементарною мембраною. Функції у дріжджовій клітині: забезпечення внутрішньоклітинного транспорту поживних речовин до місць проходження синтетичних реакцій, участь в обміні вуглеводів, синтезі ліпідів та інших важливих метаболічних процесах.

**Лізосоми** — внутрішньоклітинні органели, оточені ліпопротеїдною мембраною. Вони містять набір ферментів, які гідролізують білки, полісахариди та нуклеїнові кислоти.

**Мікротільця** — умовна назва органел — пероксисом, гліоксисом та ін. Мікротільця містять більш як 20 різних ферментів. Так, у пероксисомах містяться каталаза та пероксидаза. Крім того, в мікротільцях містяться ферменти  $\beta$ -окиснення жирних кислот, гліоксилатного циклу, дегідрогенази та ін.

Зрілі дріжджові клітини містять велику **вакуоль**. Функції її точно не встановлені. Показано, що в ній містяться гідролі-

тичні ферменти, поліфосфати, ліпіди, низькомолекулярні клітинні інтермедіати та іони металів. Ймовірно, що вакуоль у дріжджовій клітині діє як резервуар для зберігання поживних речовин і гідролітичних ферментів.

**Включення** — запасні речовини, якими у дріжджів є глюкоген (*Saccharomyces*, *Cryptococcus*), поліфосфати (волютин) (*Saccharomyces*), жири у вигляді окремих крапель (*Trichosporon*) або однієї ліпідної вакуолі (*Lipomyces*).

### 9.3. ХІМІЧНИЙ СКЛАД ДРІЖДЖІВ

Хімічний склад дріжджів залежить від виду та умов культивування. Дріжджі містять у середньому 75 % води та 25 % сухої речовини, яка має приблизно такий склад, %: неорганічні речовини — 5–10; вуглеводи — 25–50; азот — 4,8–12,0; білки ( $\times 6,25$ ) — 30–75; ліпіди — 2–5. Основними компонентами неорганічних речовин є фосфорна кислота (близько 50 %) та калій (близько 25 %).

У дріжджах містяться незамінні амінокислоти, тому склад дріжджового білка близький до повноцінного, а також ряд вітамінів групи В. Дріжджі здатні до синтезу каротиноїдів (представники родів *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Rhodospiridium*, *Sporidiobolus*). Вміст каротиноїдів коливається в межах від 80 до 570 мкг/г.

## 9.4. РОЗМНОЖЕННЯ ДРІЖДЖІВ

### 9.4.1. Безстатеве розмноження

Розрізняють три типи вегетативного розмноження дріжджів: брунькування, поділ і брунькування, що закінчується поділом. Спосіб вегетативного розмноження є важливим таксономічним критерієм для поділу дріжджів родини *Saccharomycetaceae* на підродини.

У дріжджів підродини *Saccharomycetoideae* вегетативне розмноження відбувається багатостороннім брунькуванням (рис. 9.2, а), тобто формування бруньок на різних боках материнської клітини.

Для представників підродини *Schizosaccharomycetoideae* є характерним розмноження поділом — подовження клітини

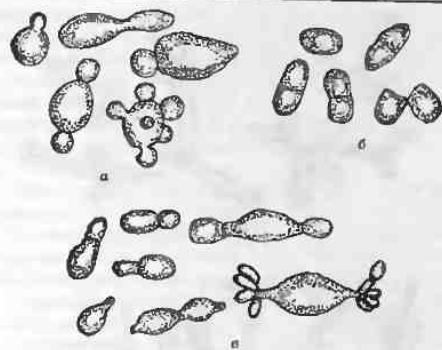


Рис. 9.2. Типи вегетативного розмноження дріжджів: а — багатостороннє брунькування; б — поділ; в — біполярне та монополярне брунькування

з одного кінця з наступним утворенням поперечної перегородки без звузження (рис. 9.2, б).

У процесі брунькування, що закінчується поділом, або біполярного брунькування (підродина *Nadsonioideae*) формування дочірніх клітин починається з утворення бруньки на вужчій основі, ніж у *Schizosaccharomycetoideae*, і закінчується появою по основі бруньки перегородки (рис. 9.2, в).

Спосіб утворення клітинної стінки у процесі брунькування також можна розглядати як таксономічну ознаку. У аскоміцетних дріжджів спостерігається **голобластичне** брунькування — до утворення нової клітинної стінки бруньки залучаються всі шари клітинної стінки материнської клітини. За **гетеробластичного** (**ентеробластичного**) брунькування, яке зустрічається у базидіоміцетних дріжджів, клітинна стінка молодшої бруньки утворюється лише в результаті розтягнення внутрішнього шару клітинної стінки материнської клітини.

Утворення справжнього та псевдоміцелію. У процесі брунькування зрілі бруньки можуть не відділятися від материнської клітини і утворюють грона або ланцюжки клітин. Це приводить до формування псевдоміцелію (рис. 9.3, а, б).

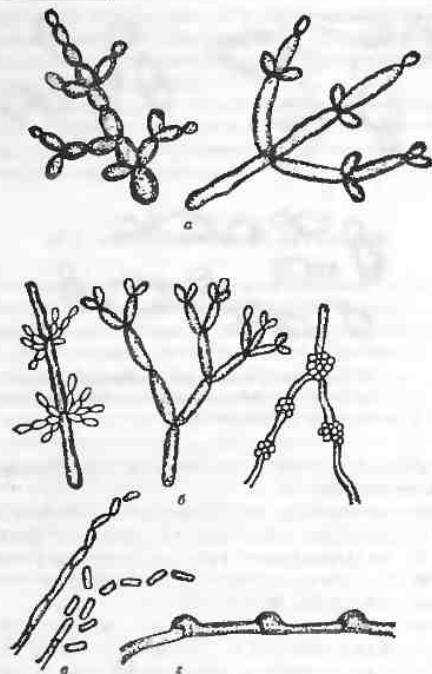


Рис. 9.3. Типи міцелію у дріжджів:  
а — примітивний псевдоміцелій; б — диференційований псевдоміцелій; в — справжній міцелій і артроспори;  
г — міцелій з пражками

Справжній міцелій утворюється лише у дріжджів, здатних до розмноження поділом. При цьому гілки різного розміру розростаються в результаті безперервного росту верхівки гіфи, поперечна перегородка між клітинами утворюється без звуження. Міцелій може розпадатися на частини, в результаті чого формуються одно-

клітинні артроспори — оїдії (рис. 9.3, в). Утворення міцелію з пражками (рис. 9.3, г) характерне для базидіоміцетних дріжджів.

**Утворення безстатевих спор.** Ендоспори — вегетативні клітини, які формуються всередині клітини або гіфи (рис. 9.4, а). Їх можна спостерігати в старих культурах дріжджів, вирощених на сусло-агарі, картопляному агарі, солодово-дріжджовому агарі. Утворюються у дріжджів *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Oosporidium*.

У деяких видів дріжджів (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, представників роду *Metschnikowia*, іноді у *Trichosporon* і *Cryptococcus*) формуються хламідоспори (рис. 9.4, б). Це товстостінні нестатеві спори, що утворюються термінально або інтраклярно в результаті округлення клітин. Містять багато ліпідів.

Утворення **балістоспор** — один із способів безстатевого розмноження, що притаманний дріжджам родів *Sporobolomyces*, *Bullera*, *Sporidiobolus*. Ці спори формуються на спеціальних загост-

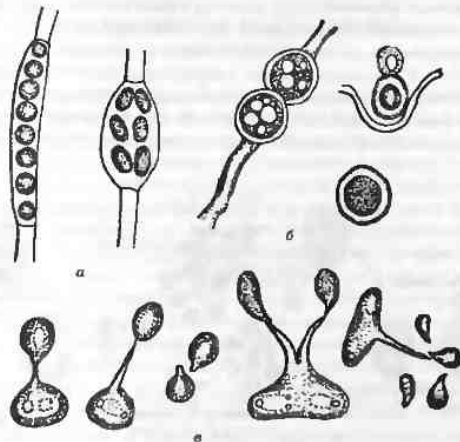


Рис. 9.4. Детні способи безстатевого розмноження дріжджів:  
а — ендоспори; б — хламідоспори; в — балістоспори (симетричні та асиметричні)



рених виростах вегетативних клітин — стеригмах і при дозріванні викидаються у повітря. Мають характерну форму — шаро-, серпо-, лимоно- та яйцеподібну (рис. 9.4, в).

#### 9.4.2. Статеве розмноження дріжджів

За статевого розмноження в результаті мейотичного поділу диплоїдного ядра дріжджів утворюються гаплоїдні спори — **аскоспори** (ендогенні) та **споридії** (екзогенні). Дріжджі — різностатеві організми, тому розрізняють **гомоталічні** (злиття потомків однієї спори чи особин, які утворилися з однієї і тієї самої гаплоїдної клітини) та **гетероталічні** (злиття, або кон'югація, між клітинами — потомками різних гаплоїдних клітин).

Аскоспори утворюються аскосміцетними дріжджами. Найчастіше в аску (сумці) міститься від 1 до 4–8 спор (*Saccharomyces*, *Saccharomycoides*), інколи кілька десятків (*Lipomyces*, *Kluveromyces*). Морфологічна різноманітність аскоспор є таксономічною ознакою.

Безстатевий (брунькування) та статевий шляхи розмноження аскосміцетних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* показані на рис. 9.5. У статевому процесі з нормальної диплоїдної клітини (клітина з двома наборами хромосом і відповідно з двома наборами генів) шляхом мейозу (редукційний поділ) утворюється аск, який містить чотири гаплоїдні аскоспори (клітини з одним набо-

ром хромосом і одним набором генів). Аскоспори бувають двох типів спарювання: *a* і  $\alpha$ . Брунькуванням клітини кожного типу можуть утворювати інші гаплоїдні клітини. Внаслідок спарювання гаплоїдних клітин *a* і  $\alpha$  утворюється нормальна диплоїдна клітина *a/a*. Гаплоїдні клітини одного типу також можуть випадково спарюватися, утворюючи аномальні диплоїдні клітини (*a/a* або  $\alpha/\alpha$ ), які розмножуються тільки звичайним безстатевим шляхом — брунькуванням.

Екзогенні статеві спори споридії утворюються у базидіоміцетних дріжджів. У них після злиття гаплоїдних клітин утворюється двоядерний (**дикаріофітний**) міцелій, на якому формуються товстостінні, круглі (овальні, гавтелеподібні, грушоподібні) клітини, які містять вклучення ліпідів — **теліо-** або **телейто-**спори. Телейтоспори можуть проростати, утворюючи септований (2–4-клітинний) міцелій або несептований (одноклітинний) проміцелій (ростова гіфа), на якому утворюються споридії.

#### 9.5. ТАКСОНОМІЯ ТА СИСТЕМАТИКА ДРІЖДЖІВ

Перша наукова класифікація дріжджів була розроблена датським мікологом Е.Х. Хансеном у 1896 р. Він об'єднав дріжджі, які утворюють спори, у вісім родів родини *Saccharomycetaceae*. Найвідоміші класифікації, опубліковані в першій половині XX ст.: системи представників голландської школи Дж. Лоддер і Н.Дж.В. Крегер-ван Рій (1952 р.), та радянського вченого В.І. Кудряцева (1954 р.). Перша класифікація базувалась в основному на морфолого-фізіологічних властивостях дріжджів, друга, крім цих ознак, враховувала належність видів до певних місць існування та їх адаптацію до цих умов. Значний крок у систематиці дріжджів було зроблено застосуванням геносистематики — вивчення життєвих циклів, концепції статі та скрещування. Донедавна більшість дослідників розміщували дріжджі у три підвідділи — аскосміцетових, базидіоміцетових та недосконалих грибів відділу *Eumycota* царства *Mycota*. Аскосміцети утворюють сумки з ендогенними статевими спорами, базидіоміцети — теліоспори і базидіоподібні спорифори з екзогенними статевими спорами, дейтероміцети — лише безстатеві спори, вони не мають статевого процесу.

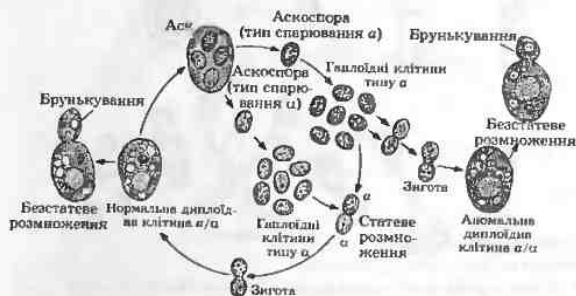


Рис. 9.5. Розмноження дріжджів *Ascomycetes*

У 1984 р. була опублікована класифікація Н.Дж.В. Куртцман Рій, яка впродовж майже 16 років вважалась найповнішою (табл. 9.1).

Таблиця 9.1

Класифікація дріжджів (1984 р.)

Відділ Eumycota				
Підвідділ	Клас	Порядок	Родина	Рід (деякі представники)
Аско- mycotina	Hemiasco- mycetes	Endomycetales	Spermothrales	<i>Metchnikowia</i>
			Saccharo- mycetaceae	<i>Lipomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Hansenula</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i>
Базидіо- mycotina	Basidio- mycetes	Filobasidiales	Filobasidiaceae	<i>Filobasidium</i>
		Ustilaginales	Дріжджі, які утворюють теліоспори	<i>Rhodospiridium</i>
		Tremellales	Sirobasidiaceae Tremellaceae	<i>Sirobasidium</i> <i>Tremella</i>
Deutero- mycotina	Blasto- mycetes	—	Cryptococcaceae	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Trichosporon</i> <i>Trigonopsis</i>
			Sporobolo- mycetaceae	<i>Burella</i> <i>Sporobolomyces</i>

Як і в систематиці прокариот і мікроміцетів, застосування у дослідженні дріжджів методів молекулярної біології та генетичних методів (результати секвенування ДНК та РНК, зокрема консервативної 18S рРНК та окремих доменів 28S рРНК, методів рестрикційного аналізу, електрофорезу клітинних білків та ін.) поставили під сумнів існуючу класифікацію дріжджів.

У 1998 р. було опубліковано четверте видання Визначника дріжджів за редакцією американських вчених К.П. Куртцмана та Дж.В. Фела. Згідно з цим виданням аспорогенні дейтеро-міцетні дріжджі не існують як самостійний окремий таксон, а належать до аско- та базидіоміцетних дріжджів. У 2000 р. було опубліковано філогенетичну класифікацію дріжджів К.П. Куртцмана (табл. 9.2).

Таблиця 9.2

Положення аспорогенних дріжджів у класифікації Куртцмана (2000 р.)

Клас	Порядок	Родина	Рід (вказані не всі роди)	
Hemiascomycetes	Saccharomycetales (синонім Endomycetales)	Candidaceae	<i>Blastobotrya</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Symphodomyces</i> <i>Trigonopsis</i>	
Базидіоміцетні дріжджі (Анаморфний таксон)		Sporobolomycetaceae	<i>Sporobolomyces</i> <i>Rhodotorula</i>	
		Cryptococcaceae	<i>Burelia</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Trichosporon</i>	

Слід зазначити, що в наш час некоректним є і сам термін "аспорогенні" (або недосконалі) дріжджі. У зв'язку з тим що ці дріжджі зараховані до аско- чи базидіоміцетів, вважається, що і вони здатні розмножуватись статевим шляхом, проте до цих пір не підбрано (чи не встановлено) умов, в яких статеве розмноження таких дріжджів можливе.

## 9.6. ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ ДРІЖДЖІВ

Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* з давніх-давен служили людині. У наш час різні штами цього виду дріжджів використовуються у пивоварінні, виноробстві, хлібопекарстві, виробництві спиртів. Дріжджі *Kluyveromyces fragilis*, які зброджують лактозу, використовуються для виробництва спирту з молочної сироватки. Дріжджі *Candida lipolytica* метаболізують вуглеводні та є промисловим джерелом лимонної кислоти.

Дріжджі роду *Candida* здатні рости на багатьох субстратах: вуглеводнях (*Candida tropicalis*), метанолі (*Candida boidinii*), гідролізатах торфу та деревини (*Candida utilis*), етанолі (*Candida utilis*). Їх біомаса використовується як кормова добавка до раціону сільськогосподарських тварин. Детальніша інформація про білкові продукти, які одержують за допомогою дріжджів, наведена у розд. 22 "Мікроорганізми як об'єкти біотехнології".

*Pichia guilliermondii* використовується для одержання рибofлавіну. Дріжджі *Rhodotorula* є джерелом ліпідів, β-каротину. *Trichosporon cutaneum* відіграє важливу роль в аеробних систе-

мах очищення стічних вод завдяки здатності окиснювати органічні сполуки, навіть такі, які є токсичними для грибів (наприклад фенольні сполуки). Дріжджі *Phaffia rhodozyma* синтезують незвичайний каротиноїд **астаксантин**, який може бути джерелом пігменту для лосося та форелі, вирощуваних у ставках. М'ясо риби, вирощеної в неволі, буває білим, але набуває нормального вигляду, якщо в корм додають пігмент. Астаксантин надає м'ясу лосося та форелі характерне оранжево-рожеве забарвлення.

### Дріжджі *Saccharomyces* у промисловості

Основною властивістю сахароміцетів, яка широко використовується в промисловості, є здатність з високою ефективністю перетворювати великі концентрації цукрів на спирт. До складу продуктів спиртового бродіння входять не тільки етанол, а й вуглекислий газ і дріжджова біомаса. До важливих продуктів бродіння можна зарахувати і органолептичні сполуки, які виробляються сахароміцетами і надають спиртовим напоям особливого смаку та аромату (вищі спирти, кислоти, альдегіди разом з кетонами, сірковмісні речовини).

Виробництво алкогольних напоїв. За допомогою дріжджів виробляють такі напої (у дужках вказана основна сировина): пиво, віскі (ячмін), горілка (кукурудза, картопля, пшениця), джин (кукурудза, картопля), sake (рис), ром (меяса), вино (виноград), бренді (виноград), сидр (яблука), кальвадос (яблука).

**Підготовка сировини.** Оскільки дріжджі легко заспокоюють цукри, що містяться у винограді, ця сировина не потребує ніякої попередньої обробки — достатньо роздавити ягоди та вичавити сік. Для виробництва червоного вина шкірку та кісточки винограду залишають у соку впродовж всієї ферментації, тоді як для приготування білих вин їх видаляють після роздавлювання ягід.

На відміну від цукрів винограду, основний вуглевод ячменю (хрехмаль) не засвоюється дріжджами. У зв'язку з цим важливий технологічний етап пивоваріння полягає у пророщуванні ячменю, у процесі якого синтезується комплекс амілазних ферментів. Цей етап називають солодінням. Пророщений ячмінь висушують у печах, при цьому відбувається карамелізація цукрів, і утворювані темнозабарвлені речовини надають пиву відпо-

відного кольору. Далі солод розмелюють і змішують з водою; цей процес лежить в основі приготування сусла. При цьому амільолітичні ферменти розщеплюють крохмаль до мальтози та інших цукрів, які дріжджі здатні засвоювати. Отриманий екстракт (сусло) фільтрують від залишків ячменю і використовують як середовище для вирощування дріжджів.

**Ферментація (вирощування дріжджів).** У виробництві пива в сусло вносять один штам — *Saccharomyces cerevisiae*. У виготовленні вина використовують природну флору шкірки винограду, так що у бродінні беруть участь багато видів дріжджів. Крім *Saccharomyces*, це — *Brettanomyces* sp., *Candida* sp., *Debaryomyces* sp., *Hansenula*. Ферментація продовжується кілька днів (приготування пива) чи кілька тижнів (виробництво вина).

**Дозрівання.** Всі сорти пива та деякі сорти вина дозрівають кілька тижнів, тоді як деякі вина і продукти переробки, які використовуються для одержання віскі та бренді, можна витримувати кілька років. У виробництві пива етап дозрівання необхідний для видалення деяких небажаних летких домішок та осадження поліфенольних сполук, які можуть спричинити помутніння пива. У процесі дозрівання вина відбувається ріст бактерій, які за допомогою так званого яблучно-молочнокислого бродіння видаляють з вина яблучну кислоту, що покращує смакові якості вина.

**Виробництво етанолу як палива.** Етанол — екологічно чисте паливо, внаслідок згоряння якого утворюються вуглекислий газ і вода. Використовується в двигунах внутрішнього згоряння у чистому вигляді або як 10–20% -на добавка до бензину (газохол). У 80-х роках ХХ ст. у Бразилії 75 % автомобілів працювали на 95% -му етанолі, а решта — на газолі.

На значних посівних площах передбачається вирощування сільськогосподарських культур для наступної їх переробки на етанол. Але, на жаль, при цьому існує дилема: продовольство чи енергія. Виробництво етанолу з рослинної сировини небезвідходне: на кожен літр спирту припадає 12–14 л стічних вод з високою концентрацією відходів, небезпечних для природних екосистем. Проблема раціональної їх переробки не вирішена.

Слід зазначити, що сахароміцети, використовувані у виробництві етанолу, мають ряд недоліків:

1. Конкуренція бродіння та дихання. Субстрат (глюкоза) лише частково зброджується до етанолу. Решта субстрату втрачається, перетворюючись у результат дихання на вуглекислий газ

і воду. Процес необхідно вести в анаеробних умовах або використовувати мутанти, не здатні до дихання (не містять мітохондрій).

2. Чутливість до етанолу, яка знижує вихід цільового продукту на одиницю об'єму біореактора. Одержано мутанти, стійкі до етанолу, які характеризуються зміщеною будовою клітинних мембран.

3. Відсутність ферментів, які каталізують розщеплення крохмалю, целюлози, ксилану. Необхідним є попередній гідроліз субстрату або використання змішаних культур сахароміцетів і мікроорганізмів з гідролітичною активністю.

Теоретично етанол можна одержати з будь-якого джерела вуглеводів, що може бути перетворено у доступну для дріжджів форму. На практиці економіка вимагає, щоб субстрат перетворювався в доступну для засвоєння форму простим способом. У Бразилії використовують сахарозу (у вигляді екстракту з цукрової тростини) та крохмаль (з маїюки). Крохмаль гідролізують за допомогою амілаз. В інших країнах використовують крохмаль кукурудзи і сахарозу (у вигляді меласи). Оскільки сахароза та крохмаль є харчовими продуктами, то шукають інші джерела вуглеводів для одержання етанолу. Привабливим є використання для цього целюлози. Проте в наш час всі випробувані варіанти хімічного та ферментативного гідролізу цієї сировини занадто дорогі.

Перспективнішими, ніж дріжджі, для одержання етанолу є бактеріальні культури — *Zymomonas mobilis* і термофільні бактерії роду *Clostridium*, а також *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Вони ефективніше зброджують цукри, стійкі до підвищених концентрацій етанолу (іноді до 15 %). Термофіли здатні до біоконверсії полісахаридних субстратів на етанол.

**Автолізати та гідролізати.** Дріжджові гідролізати здатні надавати харчовим продуктам присмак м'яса, тому широко використовуються у харчовій промисловості для виготовлення супів і приправ. Гідролізат одержують нагріванням дріжджових клітин (100 °C) у присутності соляної кислоти до тих пір, поки більша частина білків не гідролізується до амінокислот. Потім препарат нейтралізують їдким натром, фільтрують, концентрують до густої пасти.

Автоліз відрізняється від гідролізу тим, що руйнування клітинних компонентів відбувається під дією ферментів, синтезованих самою дріжджовою клітиною. Цей процес прискорюється нагріванням до 50 °C і додаванням кухонної солі. Дріжджові автолізати (а також дріжджові екстракти) широко вико-

ристовуються в мікробіологічній практиці як джерело ростових факторів для багатьох мікроорганізмів.

**Ферменти.** Фермент *інвертаза* широко застосовується в кондитерській промисловості у виробництві шоколаду з м'якою начинкою. Щоб надати ароматизований начинці твердості і певної форми, її готують з кристалічної сахарози, невеликої кількості ароматизаторів та інвертази. Потім цю тверду форму покривають шоколадом. У процесі зберігання інвертаза діє на сахарозу, перетворюючи її на суміш глюкози та фруктози; при цьому кристалічна начинка стає сиропоподібною.

Інвертаза присутня у великих кількостях у дріжджових клітинах, вирощених на меласі. Цей фермент вивільнюється у процесі автолізу клітин, потім очищається і надходить на кондитерські фабрики у вигляді стандартного розчину з відомою ферментативною активністю.

**Вітаміни.** Дріжджі є багатим джерелом вітамінів (тіамін, рибофлавін, піридоксин, фолієва кислота, пантотенат кальцію, пара-амінобензойна кислота).

#### Контрольні запитання до розділу 9

1. На основі яких ознак дріжджі належать до грибів?
2. Які мікроорганізми зараховують до дріжджів? Чому дріжджі розглядаються як окрема фізіологічна група мікроорганізмів?
3. Назвіть основні етапи дослідження дріжджів.
4. Які функції виконують структурні компоненти дріжджової клітини?
5. Які типи вегетативного розмноження характерні для дріжджів? Чим відрізняється псевдоміцелій від справжнього?
6. Охарактеризуйте органи безстатевого розмноження дріжджів.
7. Які особливості статевого розмноження притаманні асено- та базидіоміцетним дріжджам?
8. Дайте характеристику відомих класифікацій дріжджів.
9. Яких змін зазнає систематика дріжджів у результаті аналізу нуклеотидної послідовності рибосомальної РНК?
10. Охарактеризуйте дріжджі як об'єкти біотехнології.
11. Наведіть приклади використання дріжджів-сахароміцетів у промисловості.

## 10. ВІРУСИ: ПОШИРЕННЯ ТА СТРУКТУРА

### 10.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Основні етапи розвитку вірусології. Назву "вірус" (лат. *virus* — отрута) застосовували спочатку для позначення різних маловивчених хвороботворних агентів. Пізніше ця назва закріпилася за групою збудників, відкритих у 1892 р. російським професором ботаніки Д. Й. Івановським (1864–1920), які виявились здатними проходити через бактеріальні фільтри. Першим вірусом, відкритим Д. Й. Івановським, був вірус тютюнової мозаїки. У 1935 р. цей вірус у чистому вигляді (кристалічна форма) був одержаний американським біохіміком Уенделом Стенлі — першим лауреатом Нобелівської премії в галузі вірусології. Це йому належить слова: "У науці про віруси ім'я Івановського слід розглядати так, як імена Пастера і Коха в бактеріології". Перший етап розвитку вірусології почався саме з досліджень Д. Й. Івановського.

Переломним у розвитку вірусології став 1940 р., коли американський патолог Е. Гудпасчур запропонував для виділення з матеріалів вірусів використовувати курячі ембріони, і особливо 1949 р., в якому американські вірусологи Дж. Ендерс, Ф. Роббіне, Т. Уеллер завершили дослідження щодо створення одношарових культур клітин, за що через 5 років були удостоєні Нобелівської премії.

Другий, вищий за рівнем період розвитку вірусології став можливим після того, як німецький фізик Е. Руска сконструював електронний мікроскоп, удосконалення якого дало можливість у 50–60 роках ХХ ст. детально вивчити тонку структуру вірусів, процеси їх реплікації і утворення вірусних частинок у клітинах. Завершився цей етап важливим відкриттям, яке здійснили у 1970 р. лауреати Нобелівської премії американські вірусологи Х. М. Темін та Д. Балтімор, виділивши з ретровірусів зворотну транскриптазу. Це відкриття стало початком становлен-

ня генної інженерії, одержання біологічно активних сполук і нових рас рослин, рекомбінантних вакцин майбутнього та ін.

Третій етап розвитку вірусології пов'язаний з відкриттям у 1972 р. віроїдів — "голих" суперспіралізованих кільцевих молекул РНК — збудників захворювань у рослин, а також з дослідженнями американського біохіміка С. Прозинера, який у 1982 р. відкрив пріони (*англ. proteinaceous infectious particle* — збудники інфекцій людини та тварин).

Відмінності вірусів від мікроорганізмів. Віруси відрізняються від мікроорганізмів такими особливостями:

містять нуклеїнову кислоту тільки одного типу — ДНК або РНК; для їх репродукції необхідна тільки нуклеїнова кислота; не здатні розмножуватися поза живою клітиною.

Отже, віруси не є самостійними організмами, їх репродукція відбувається тільки в клітині-хазяїні. Розвиток вірусу призводить до загибелі клітини-хазяїна. Поза клітиною вірус існує у вигляді вірусної частини (*віріону*), яка складається з нуклеїнової кислоти та білкової оболонки — *капсиду*. Тому вірусну частину називають також *нуклеокапсидом*.

Віруси розпізнаються за наслідками свого розвитку у клітинах хазяїна. Зазвичай хазяїни вірусів — рослини, тварини та мікроорганізми.

Віруси рослин. Ці віруси називаються фітопатогенними. Вони потрапляють усередину рослинних клітин через пошкодження (навіть такі, що виникають внаслідок тертя листя одне об одне), а не в результаті активного вторгнення. У природних умовах віруси поширюються за прямого контакту або через переносників. Передачі вірусів можуть сприяти і рослини-паразити. Переносниками багатьох вірусів є комахи. Віруси спричиняють різні захворювання сільськогосподарських рослин. Найбільш вивчений вірус тютюнової мозаїки. Генетичним матеріалом фітопатогенних вірусів найчастіше є РНК.

Віруси, патогенні для людини та тварин. Ці віруси спричиняють такі захворювання, як віспа, вітрянка, кір, поліомієліт, грип, ящур та ін. Так само як і віруси рослин, вони передаються або під час контакту, або через комах і потрапляють у клітини, очевидно, внаслідок фаго- чи піноцитозу. Генетичним матеріалом цих вірусів є або РНК, або ДНК. Причому у цих вірусів ДНК майже завжди дволанцюгова, а РНК складається з одного полінуклеотидного ланцюга.

**Віруси бактерій.** Віруси-паразити бактерій називаються *бактеріофагами*. Бактеріофаги виявляються за утворенням "стерильних плям" (бляшок) на суцільному бактеріальному газоні. Нуклеїновою кислотою бактеріофагів є дволанцюгова ДНК або одноланцюгова РНК. Модельними об'єктами служать бактеріофаги *Escherichia coli*. Дослідження бактеріофагів і різних циклів їх розвитку суттєво допомогло вивченню механізмів передачі генетичного матеріалу від клітини до клітини.

## 10.2. БУДОВА ВІРУСІВ

Вірусна частина (віріон) складається з нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), оточеної білковою оболонкою. Білкова оболонка називається *капсидом*. Така одиниця (капсид + нуклеїнова кислота = нуклеокапсид) може бути "голою" або оточеною оболонкою (рис. 10.1). Голими нуклеокапсидами є вірус тютюнової мозаїки, аденовірус, вірус поліоми. Додаткова оболонка оточує віруси грипу, герпесу. Капсид у свою чергу складається з субодиниць — капсомерів. Він найчастіше має симетричну будову. Розрізняють два види симетрії — *спіральну* та *кубову* (рис. 10.2).

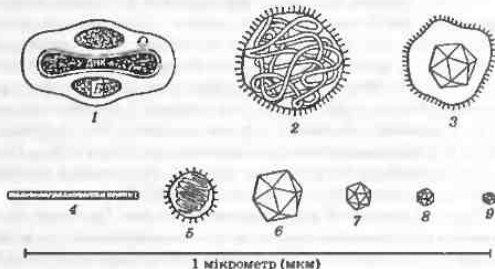


Рис. 10.1. Форма і величина частин (віріонів) деяких вірусів: Б — еліптичне білкове тільце; О — оболонка; 1 — вірус тютюну; 2 — вірус епідемічного паротиту; 3 — вірус герпесу; 4 — вірус тютюнової мозаїки; 5 — вірус грипу; 6 — вірус поліомієліту; 7 — аденовірус; 8 — вірус поліоми; 9 — вірус поліомієліту

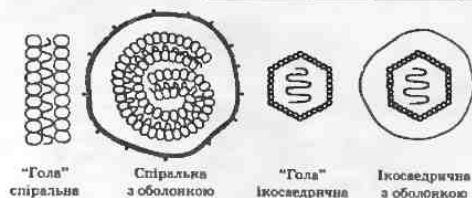


Рис. 10.2. Структурні типи вірусних частин: зображено чотири форми: дві зі спіральною і дві з кубовою симетрією (в обох випадках один віріон "голий" і один з оболонкою)

У табл. 10.1 наведено морфологічні класи вірусів (різні віруси згруповані за їх структурою). Розглянемо детальніше деякі з цих вірусів.

**Вірус тютюнової мозаїки.** Це типовий приклад вірусу зі спіральною симетрією. Він легко виділяється з вичавленого соку уражених рослин. Вірус являє собою палички завдовжки 18 нм (див. рис. 10.1). Цей паличкоподібний нуклеокапсид складається приблизно з 1200 капсомерів, розташованих за гвинтовою лінією, які утворюють порожнистий циліндр. Кожен капсимер складається з одного поліпептидного ланцюга (158 амінокислот). У стіні порожнистого циліндра між капсомерами розміщуються ланцюги РНК (за гвинтовою лінією).

**Вірус грипу.** Частини вірусу грипу мають діаметр 110 нм (див. рис. 10.1). Нуклеокапсид має спіральну будову (як і вірус тютюнової мозаїки), але він не паличкоподібний, а багаторазово закручений. Нуклеокапсид оточений оболонкою — фрагментом мембрани клітини-хазяїна, з якої вийшов вірус. Оболонка має з зовнішнього боку шипи, що служать для адсорбції фага на поверхні нової клітини-хазяїна.

Існує багато різновидів вірусу грипу.

**Поліедричні віруси без зовнішньої оболонки.** Багато які віруси, що здаються сферичними, насправді мають форму багатогранника. Найчастіше це *ікосаедр* (двадцятигранник) — тіло, обмежене 20 рівносторонніми трикутниками, яке має 12 вершин (рис. 10.3). Капсид ікосаедричного вірусу складається з капсомерів двох типів: 1) у вершинах розміщуються *пентони*, які складаються з п'яти білкових мономерів (протомерів); 2) решту



Таблиця 10.1

Морфологічні класи вірусів		
Складові частини вірусів		
Нуклеїнова кислота	"Голий капсид"	Капсид з оболонкою
<b>Спіральна структура</b>		
РНК	Вірус тютюнової мозаїки та інші віруси рослин	Віруси грипу, віруси парогрипу (свинка, кір)
ДНК	Коліфаг t4	
<b>Поліедрична структура (ікосаедр)</b>		
РНК	Пікорнавіруси: віруси ящуру, поліомієліту	Ретровіруси (онкогенні): віруси саркоми, лейкозів, карциноми Тогавіруси: вірус енцефаліту, жовтої лихоманки
Кільцева ДНК	Папонавіруси (онкогенні): Віруси папіломи, поліоми, SV40	
Однотанджова кільцева ДНК	Коліфаги ØX174, M13	
ДНК		Віруси простого герпесу, оперізувального лишая, вітряної віспи, вірус Епштейна-Барр (інфекційного мононуклеозу)
<b>Складні віруси (ікосаедрична голівка + спіральний хвіст)</b>		
ДНК	Великі бактеріофаги (T2, T4, T6)	
<b>Складні віріони</b>		
ДНК	Віруси віспи, коров'ячої віспи	

поверхні граней ікосаедра і ребра утворюють *гексони* (складаються з шести протомерів). Є віруси, які побудовані з 252 і навіть 812 капсомерів.

За принципом ікосаедра побудовано багато вірусів: ящура, поліомієліту, аденовіруси та онкогенний вірус SV40.

**Поліедричні віруси з зовнішньою оболонкою.** Ікосаедр, оточений оболонкою, — таку форму мають віруси-збудники вітряної віспи, простого герпесу та оперізувального лишая.

Ікосаедричний капсид вірусу герпесу складається з 162 капсомерів, зовнішня оболонка утворюється з внутрішньої ядерної мембрани клітини-хазяїна. Віруси герпесу розмножуються в ядрах,

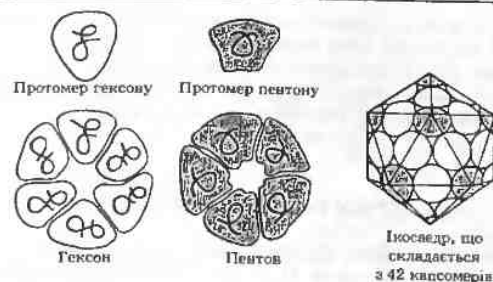


Рис. 10.3. Можливі структурні елементи капсиду ікосаедричних вірусів:

зображено капсомери двох типів: гексагональний (гексон) і пентагональний (пентон). Перший складається з шести, другий — з п'яти протомерів, кожен з яких у свою чергу складається з одного або двох поліпептидних ланцюгів.

Праворуч — ікосаедр, що складається з 12 пентонів та 30 гексонів, тобто з 42 капсомерів.

капсиди нових вірусних частин одягаються в оболонку з ядерної мембрани і виводяться назовні по системі ендоплазматичного ретикулуму.

Вітряна віспа є відносно легкою дитячою хворобою. Вірус інфікує верхні дихальні шляхи, розноситься кров'ю по всьому тілу і, закріплюючись у шкірі, утворює на ній бульбашки. Оперізувальний лишай з'являється в результаті реактивації вірусу вітряної віспи. Отже, ці обидва захворювання спричиняються одним і тим самим вірусом.

**Віруси віспи.** Віруси віспи є найбільшими із зоопазогенних вірусів. Їх частини побудовані інакше, ніж розглянуті (див. рис. 10.1). Вони містять ДНК, білок і кілька ліпідів, тому їх часто називають комплексними віріонами. Віріони натуральної та коров'ячої віспи мають вигляд округлених блоків.

Вони складаються з внутрішнього тільця, яке містить дволанцюгову ДНК; подвійного шару, який містить білок; еліптичних білкових тілець; зовнішньої мембрани.

Віріон обвивають нитки, які щільно до нього прилягають. Ці вірусні частини дуже стійкі до нагрівання і тому надзвичайно інфекційні. Натуральною віспою можуть захворіти тільки

люди та мавпи. Вірусом коров'ячої віспи можуть уражатися також корови, кролики та вівці. Обидва віруси мають спільні антигени. Тому для профілактики людям прививають вірус коров'ячої віспи, який у людини викликає дуже слабкі симптоми хвороби. Така вакцинація приводить до утворення антитіл, які зумовлюють імунітет також і до натуральної віспи.

### 10.3. ВІРУСИ БАКТЕРІЙ (БАКТЕРІОФАГИ)

Історія відкриття. Дію бактеріофага вперше відкрив у 1915 р. англійський мікробіолог Ф. Туорт, який описав лізис колоній білого стафілококу. Вчення про бактеріофаги як про віруси пов'язане з ім'ям канадського вченого Ф. д'Ереля, який у 1917 р. виявив віруси, що спричиняли лізис шигел, ціанобактерій. Їх стали називати просто *фагами*. Поглиблені дослідження взаємодії фагів із бактеріями дали можливість відкрити помірні фаги і встановити механізм лізогенії (А. Львов, Ф. Жакоб, Ж. Моно), а також цикл репродукції вірусів і розвиток їх генетики (М. Дельбрюк, А. Херші, С. Лурія). У 60-ті роки XX ст. всі ці вчені були удостоєні Нобелівської премії в галузі фізіології та медицини.

**Виділення та виявлення.** Необхідно взяти зразок із природних місць існування певного виду бактерій і разом з бактеріями залити рідким поживним середовищем. При вирощуванні бактерій у сприятливих для них умовах разом із бактеріями будуть розмножуватися і віруси. Вірус завжди розмножується тільки в клітинах, які ростуть. Далі центрифугуванням можна осадити бактерії, а в супернатанті ("лізаті") виявити фаги. Другий спосіб виявлення фагів — це вирощування бактерій на агаризованому середовищі. Якщо бактерії засіяти на поверхню чашки Петрі суцільним газомом, то за наявності фагів у газоні з'являться стерильні плями, вільні від бактерій.

**Морфологія бактеріофагів.** Будову бактеріофагів вивчали на прикладі фагів серії T *Escherichia coli* (коліфаги). Розглянемо будову коліфага T2 (рис. 10.4). Він складається з поліедричної головки завдовжки 100 нм і відростка (хвоста) приблизно такої самої довжини. Головка складається з капсомерів і містить всередині ДНК. Кількість білків та ДНК однакова. Відросток фага T2 має складну будову. У його складі можна виділити три частини:

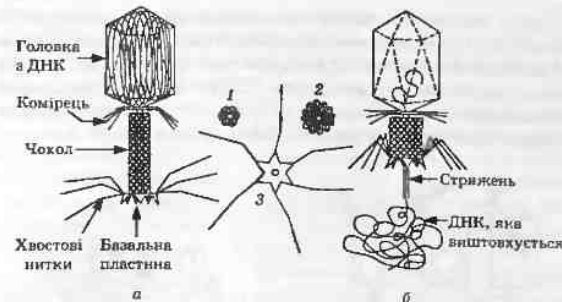


Рис. 10.4. Модель фага T2.

а — фаг з витягнутим чохлом до адсорбції; б — фаг з чохлом, що скоротився, після адсорбції та ін'єкції; 1 — поперечний розріз витягнутого відростка: видно шість білкових субодиниць чохла в одній площині; 2 — поперечний розріз чохла, що скоротився: видно 12 білкових субодиниць чохла в одній площині; 3 — базальна пластина готового до адсорбції фага з вільними нитками

порожнистий стрижень; скоротний чохол, який оточує стрижень; базальна пластина з шипами та нитками, від яких залежить специфічна адсорбція фага на поверхні клітини-хазяїна. На рис. 10.4. а показано активний фаг, у головці якого міститься ДНК, на рис. 10.4. б — фаг після ін'єкції ДНК у бактеріальну клітину.

Інші бактеріофаги мають простішу будову. Більшість фагів містить дволанцюгову ДНК, проте виявлено кілька бактеріофагів з одностанцюговою ДНК і кілька з одностанцюговою РНК.

#### 10.3.1. Розмноження вірулентного фага: літичний цикл

Основні етапи репродукції вірусу у клітині-хазяїні вивчені на прикладі фагів серії T (T2, T4, T6). Сприятливим фактором для таких досліджень виявилось те, що ДНК фага замість цитозину містить 5-гідроксиметил цитозин, і тому синтез фагової ДНК легко простежити за появою цієї основи. Крім того, були одержані мутантні форми фага, в яких та чи інша стадія репродукції була блокована чи проходила тільки в певних умовах.

Як і інші віруси, фаги є нерухомими. При змішуванні суспензії вільних фагів із суспензією бактерій фагові частини в результаті випадкових зіткнень прикріплюються до поверхні бактерій (адсорбція) і вводять у клітину свою ДНК (ін'єкція). Через деякий час, який необхідний для процесів синтезу і дозрівання, клітини лізуються і новоутворені фаги виходять назовні (рис. 10.5).

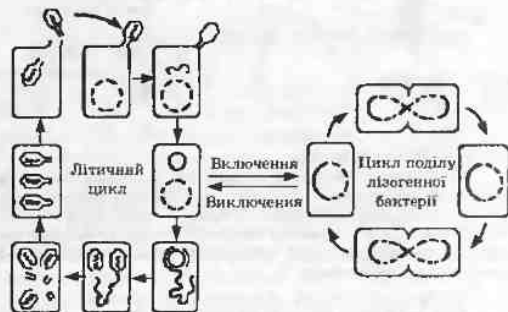


Рис. 10.5. Життєві цикли помірних фага (на прикладі фага лимба)

Адсорбція. Не всякий фаг адсорбується на будь-якій бактерії. Специфічність відносно хазяїна та фага визначається специфічністю адсорбції, що залежить від рецепторів, які є в клітинній стінці бактерій. Рецептори для одних фагів містяться у ліпопротеїновому, для інших — у ліпополісахаридному шарі. Фаго-резистентність деяких бактерій пояснюють відсутністю у них відповідних рецепторів. За надлишку бактеріофага на одній клітині може адсорбуватися близько 200–300 фагових частин.

**Внутрішньоклітинний розвиток фага.** За адсорбцією йде ін'єкція, тобто введення ДНК у клітину. У фага T2 при цьому базальна пластина фіксується на клітині, чохол хвоста скорочується і порожнистий стрижень входить у клітину. У клітину проникає тільки нуклеїнова кислота, білкова оболонка залишається зовні.

Далі йде **латентний (схритий) період** (25 хв), впродовж якого не вдається виявити фаг у штучно зруйнованих клітинах. Під час латентного періоду відбувається перебудова метаболізму ураженої клітини: відразу припиняється синтез бактеріаль-

ної ДНК; через кілька хвилин припиняється і синтез бактеріальної РНК, а також бактеріальних білків, хоча загальна кількість білка продовжує збільшуватися. Потім синтез ДНК відновлюється, навіть з підвищеною швидкістю. Спочатку фагова ДНК утворюється за рахунок бактеріальної. Цю перебудову і наступне новоутворення фагової ДНК можна кількісно простежити за збільшенням 5-гідроксиметилцитозину. Необхідні для синтезу фагової ДНК ферменти утворюються відразу ж після ураження. Це так звані "ранні білки". До "пізніх білків" належать білки оболонки і фагові лізоцими (ендолізими). Вони утворюються лише у другій половині латентного періоду.

Заключний процес — **дозрівання**. Він полягає у з'єднанні фагової ДНК з білком оболонки і утворенні інфекційних фагових частин. Дозрівання Т-фагів є складним процесом. Спочатку утворюються капсиди, наповнені всередині білками. Після розчинення цих внутрішніх білків готові головки наповнюються ДНК і закриваються. Після цього приєднуються компоненти хвоста.

Кінець кінцем, клітинна стінка бактерії пом'якшується під дією фагового лізоциму, і нові фаги **вивільняються**. Тривалість латентного періоду, величина врожаю фагових частин коливаються в широких межах залежно від виду фага, виду бактерії та умов середовища.

Вдається інфікувати такі бактерії, як *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis* нативною ДНК, виділеною з бактеріофага. Такий процес (різновид генетичної трансформації) називають **трансфекцією**.

### 10.3.2. Розвиток помірних фагів: лізогенія

Описані вище бактеріофаги, як правило, лізують уражені ними бактерії, і тому їх називають **вірулентними**. Деякі фаги уражають бактерії, але не розмножуються в них автономно і не викликають лізису. Такі фаги називаються **помірними**, а бактерії — **лізогенними**. Розмноження помірних фагів проходить синхронно з розмноженням бактерії. Лише дуже рідко в одній з  $10^4$ – $10^5$  таких лізогенних бактерій фаг починає спонтанно розмножуватися, і клітина піддається лізису. У цьому випадку, щоб виявити вихід інфекційного фага, як індикатор потрібен інший бактеріальний штам, для якого цей фаг є вірулент-

ним. Якщо змішати лізогенні та надлишок індикаторних бактерій і посіяти цю суміш на агаризоване середовище, то будуть рости і лізогенні, і індикаторні бактерії. Проте час від часу деякі клітини лізогенних бактерій будуть лізуватися, і фагові частини, які з них виходять, будуть уражати чутливі клітини індикаторних бактерій. Це буде супроводжуватися появою пляшок у судільному бактеріальному газоні. Але у середині кожної такої пляшки збережеться колонія лізогенної бактерії.

Лізогенним бактеріям притаманна потенційна здатність продукувати фаги, але цю здатність не можна виявити ні морфологічно, ні серологічно. Фаг у такому інфекційному стані, який передається дочірнім бактеріальним клітинам під час поділу, називається *профагом*. Подібно до інших ознак бактеріальної клітини наявність у ній профага успадковується. Оскільки все потомство лізогенної бактерії також є лізогенним, профаг, очевидно, повинен реплікуватися синхронно і регулярно разом з хромосомою бактерії (див. рис. 10.5).

Лізогенні бактерії є імунними (стійкими) до зараження тими фагами, які в них містяться у вигляді профага. Такий захист забезпечуваний фагами імунітет зумовлений не неможливістю адсорбції (як за стійкості до вірулентних фагів), а утворенням особливого цитоплазматичного білка-репресора, який перешкоджає розмноженню вегетативних фагів. Цей самий репресор перешкоджає зворотньому переходу профага у вегетативний стан і пригнічує синтез фагових білків. Отже, виникнення лізогенного стану пов'язане з утворенням репресорного білка.

Спонтанно, без дії зовнішніх факторів, лізогенні бактерії лізуються рідко. Проте цілий ряд факторів (УФ опромінення, мітоміцин С, алкілувальні агенти) може індукувати в кожній клітині розвиток профага, який веде до утворення і вивільнення інфекційного фага. *Індуція*, очевидно, зумовлена, інактивцією або знищенням молекул репресора.

Яким чином профаг зв'язаний з бактеріальною хромосомою? Відповідь на це запитання дали дослідження, проведені з фагом  $\lambda$  (лямбда), який є лізогенним для *Escherichia coli* K-12. Довжина хромосоми фага  $\lambda$  становить лише 2 % від довжини бактеріальної хромосоми. Встановлено, що в лізогенних клітинах профаг міцно з'єднаний з хромосомою клітини-хазяїна, причому фаг  $\lambda$  приєднаний до хромосоми хазяїна в певному місці. Генетичні дослідження показали, що фаг у процесі лізогенізації

не просто приєднується до бактеріальної ДНК, а *включається* в неї, *тобто ДНК профага інтегрована в бактеріальну ДНК*.

Вінтегрованому стані фагова ДНК реплікується разом з бактеріальною і знає тих самих регуляторних дій, що й подвійна бактеріальна хромосома (див. рис. 10.5). Інформація, що міститься у фаговій ДНК, у цей час не проявляється. Тільки під час переходу профага у вегетативний стан відновлюється автономія фагової ДНК (ДНК фага переходить у автономний стан) і починається розмноження фага. **Виключення** фагової ДНК з бактеріальної хромосоми здійснюється дуже точно і відбувається у тому самому місці, де відбулася інтеграція. Тільки дуже рідко (в одному випадку з 100 000) виключення ДНК фага відбувається аномально.

Як тільки профаг у результаті виключення перейшов у вегетативний стан, він знову стає автономним і може розмножуватися в бактеріальній клітині як вірулентний фаг. Виключення, таким чином, призводить до лізису бактерії і вивільнення фага.

#### 10.4. РОЛЬ ВІРУСІВ І ПЛАЗМІД В УТВОРЕННІ ПУХЛИН (ОНКОГЕНЕЗУ)

Виникнення злоякісних (ракових) пухлин може мати різні причини, але у всіх випадках до цього причетний генетичний матеріал клітини — її ДНК. В основі перетворення нормальної клітини в злоякісну (явище *пухлинної трансформації*) лежить та чи інша зміна ДНК. Зміну ДНК нормальної клітини можуть спричинити віруси та плазмиди (кільцеві позакромосомні ДНК, які можуть передаватися з клітини в клітину). Однією з причин цього може бути те, що як плазмиди, так і віруси (у вигляді профага) можуть інтегруватися у хромосому ДНК. Розглянемо приклади онкогенезу: утворення пухлин у рослин; розвиток пухлин у тварин під дією ДНК-вірусів; розвиток пухлин у тварин під дією РНК-вірусів (ретровірусів).

**Утворення пухлин у рослин.** У багатьох рослин зустрічаються пухлини кореневої шийки. Ці розростання тканин зменшують потік поживних речовин між підземними та наземними частинами рослини. Збудником пухлини є *Agrobacterium tumefaciens* — грамнегативна ґрунтова бактерія. Бувають вірулентні та невірулентні штами *Agrobacterium tumefaciens*. Вірулентні

штами містять велику плазмідну, так звану Ті-плазмідну, яка здатна інтегруватися в хромосому ДНК рослинних клітин і спричинити пухлинний ріст.

**Онкогенез у тварин, спричинений ДНК-вірусами.** Дослідження канцерогенезу у тварин проводять на культурах тканин. Якщо перенести клітини тварин, наприклад, з органів курей чи хом'яків, або фібробласти людини у відповідне поживне середовище, то на внутрішній стіні культуральної посудини вони починають розмножуватись. Як правило, клітини ростуть доти, поки не почнуть дотикатися одна до одної. Із-за контактного гальмування утворюється тільки одношаровий клітинний газон. Якщо ж ці нормальні клітини інфікувати пухлинним вірусом, то контакте гальмування росту знімається, клітини продовжують розмножуватися і насуваються одна на одну. Багатшаровий ріст спостерігається тільки у клітин, які були піддані пухлинній трансформації.

Віруси поліоми та SV40 ("мавіяний вірус 40") належать до групи палюавірусів. Вони містять дволанцюгові кільцеві молекули ДНК. У досліді вірус можна перенести для розмноження в клітини тканинної культури. Розмножуючись у деяких клітинах (ці клітини називаються *пермісивними*), вірус спричиняє їх лізис, і у міру розвитку вірусу ці клітини гинуть. В інших (*непермісивних*) клітинах вірус поводить себе інакше. У цьому разі розмноження вірусу пригнічується, і тільки в одній з  $10^6$  клітин вірусна ДНК інтегрується в клітинну ДНК. Таке включення вірусної ДНК в геном клітини-хазяїна може супроводжуватись пухлинною трансформацією. У трансформованій клітині утворюється білок (Т-антиген), який запускає реплікацію клітинної ДНК, і починається розмноження клітин. Ін'єкція такого роду трансформованих клітин тваринам призводить до швидкого утворення пухлини.

**Онкогенез у тварин, спричинений РНК-вірусами.** До утворення пухлин у тварин можуть бути причетними і РНК-віруси — *ретровіруси*. Вони належать до ікосаедричних вірусів з оболонкою і містять (+)РНК-геном (одноланцюгову РНК). Вони спричиняють саркому Рауса у курей і лейкоз у мишей. Назва "ретровіруси" зумовлена тим, що в їх розмноженні бере участь фермент *зворотна транскриптаза*. РНК цих вірусів не може відтворюватися (репродукуватися) простою реплікацією. Необхідним етапом є попередня транскрипція РНК у ДНК з наступною інтеграцією цієї ДНК в одну з хромосом клітини-хазяїна. Інтеграція є необхідним етапом репродукції цього вірусу; тільки інтегрована

вана вірусна ДНК буде транскрибуватися. Оскільки інтеграція у клітинну ДНК входить у життєвий цикл вірусу, то частота інтеграції є дуже високою. Очевидно, вірусна ДНК може включатися в клітинну в будь-якому місці.

Розмноження вірусу не приводить до лізису клітини. Нуклеокапсид утворюється всередині клітини, потім переміщується до плазматичної мембрани і виходить назовні, уже одягнутий в оболонку з цієї мембрани. Інтегрована ДНК ретровірусу реплікується разом з геномом клітини-хазяїна і тому міститься в кожній пухлинній клітині. Пухлинний ріст клітин зумовлений експресією (синтезом) вірусного гену "*src*". Цей ген кодує білок, який, очевидно, бере участь у перетворенні диференційованої клітини у клітину ембріонального типу.

**Віріони.** Збудниками деяких пухлин рослин є маленькі голі, тобто позбавлені білкової оболонки, вільні молекули РНК. Їх називали *віріодами*. Вони являють собою замкнені в кільце одноланцюгові молекули з довжиною ланцюга приблизно 360 нуклеотидів (молекулярна маса становить  $12 \cdot 10^4$  дальтон).

Отже, вони в 10 разів менші за інфекційні РНК найдрібніших вірусів. Віріоди є найменшими збудниками хвороб. Вони спричиняють хвороби картоплі, цитрусових, огірків, хризантем, хмелю, кокосових пальм та інших рослин.

## 10.5. КЛАСИФІКАЦІЯ ВІРУСІВ

Основним принципом у класифікації вірусів є тип нуклеїнової кислоти, яка входить до їх складу. За цією ознакою віруси поділяють на дві групи: ДНК- та РНК-місні (ДНК- та РНК-геномі). Кожну з цих груп послідовно поділяють на родини, підродини, роди і види вірусів, додаючи до базових назв -*viridae* (родина), -*virinae* (підродина) та -*virus* (репта таксонів).

Основними критеріями поділу вірусів на родини є особливості структури нуклеїнових кислот (одно-дволанцюгові, повні—недобудовані, цілісні—фрагментовані), їх конфігурації (лінійні—кільцеві), геномної функції ("плюс—мінус" нитчасті), а також наявність або відсутність зовнішньої оболонки. Додатковими критеріями, які дають можливість у рамках родини виділити підродини, роди і види, є круг хазяїв, антигенна специфічність, розміри та морфологія віріонів, тип симетрії та кількість капсомерів у кап-

сиді, органо-тканинний тропізм вірусів, способи передачі, поширення, прояв вірусних захворювань та ін.

ДНК-геномні віруси об'єднані в сім, а РНК-геномні — в 13 родин (табл. 10.2). У табл. 10.2 наведено також підродини (якщо вони є), відомі роди і найбільш характерні захворювання, які спричиняються представниками родин.

Таблиця 10.2

## Класифікація вірусів

Родина	Підродина	Рід	Представники
РНК-геномні віруси (13 родин)			
Picornaviridae	—	Enterovirus, Cardiovirus, Rhinovirus, Aphthovirus	Віруси поліомієліту, гепатиту А, гострих респіраторних та кишкових інфекцій, риніту, міокардиту
Caliciviridae	—	—	Віруси гастроентеритів
Togaviridae	—	—	Вірус енцефаліту коней
Flaviviridae	—	—	Віруси ідишного енцефаліту, жовтої лихоманки, краснухи
Orthomyxoviridae	—	Influenzavirus	Віруси грипу А, В, С
Paramyxoviridae	—	Paramyxovirus, Morbillivirus, Pneumovirus	Віруси паратифу, епідемічного паротиту, кору
Arenaviridae	—	—	Віруси Ласса, лімфоцитарного хориомембраніту
Coronaviridae	—	—	Віруси гострих респіраторних захворювань
Bunyaviridae	—	Bunyavirus, Flebovirus, Nairovirus, Uukovirus	Вірус кримської геморагічної лихоманки
Retroviridae	Oncovirinae	—	Онкогенні віруси В, С і D типу (рак молочної залози, лейкози, лімфосаркома)
	Spumavirinae	Spumavirus	вірус імунodefіциту людини
	Lentivirinae	Lentivirus	
Reoviridae	—	Reovirus, Orbivirus, Rotavirus, Phytoreovirus, Fiftivirus, Cytopovirus	Віруси гострих респіраторних та кишкових інфекцій
Rhabdoviridae	—	Lissavirus, Vesiculovirus	Віруси сказу, везикулярного стоматиту
Filoviridae	—	—	Вірус Ебола, вірус Марбург

Закінчення табл. 10.2

Родина	Підродина	Рід	Представники
ДНК-геномні віруси (сім родин)			
Poxviridae	Chordopoxvirinae	Orthopoxvirus, Avipoxvirus, Suipoxvirus, Parapoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus	Віруси віспи, дерматитів
	Entomopoxvirinae	—	
Herpesviridae	Alphaherpesviridae	—	Віруси простого та оперізувального герпесу
	Betaherpesviridae	—	Вірус цитомегалії
	Gammapherpesviridae	—	Онкогенні лімфотропні віруси Епштейна-Барр та хвороби Марка
Adenoviridae	—	Mastadenovirus, Aviadenovirus	Аденовіруси, які спричиняють гострі респіраторні захворювання, кон'юнктивіти, пневмонії
Papovaviridae	—	Papillomavirus, Polyomavirus	Віруси папіломи, поліоми, вакуолізуючий вірус мавпи
Hepadnaviridae	—	—	Вірус гепатиту В
Parvoviridae	—	Densovirus, Parvovirus, Dependovirus	Вірус В19 (спричиняє інфекційну еритему, гемолітичну анемію)
Iridoviridae	—	Iridovirus, Ranavirus, Chloridovirus	Віруси лімфоцитарного риб, африканської чуми свиней, віруси кома

## Контрольні запитання до розділу 10

1. Як були відкриті віруси?
2. За якими ознаками вірус відрізняється від мікроорганізмів?
3. Як можна розпізнати вірус?
4. Що таке вірус? З чого він складається?
5. Як називаються віруси бактерій? Як можна виявити та виділити бактеріофаги?
6. Яку будову має кодіфак Т2?
7. Чим відрізняються вірулентні та помірні фаги?
8. Охарактеризуйте основні етапи літичного циклу.
9. Що таке лізогенія? Як відбувається розвиток помірних фагів?
10. Яке відношення мають віруси до онкогенезу?
11. Які особливості притаманні ретровірусам?
12. Охарактеризуйте віроїди та пріони.
13. За якими ознаками класифікуються віруси?
14. Які родини входять до груп ДНК- та РНК-геномних вірусів?



## 11. ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ОБМІНУ РЕЧОВИН І ПЕРЕТВОРЕННЯ ЕНЕРГІЇ У МІКРООРГАНІЗМІВ

### 11.1. КОНСТРУКТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ

Поживні речовини, які надходять у клітину, піддаються суттєвим перетворенням і змінам. Перетворення речовин у клітині називається *обміном речовин*, або *метаболізмом*. Спочатку складні органічні субстрати (наприклад, полісахариди) деградують до більш простих (моносахаридів), з яких мікроорганізми здійснюють синтез усіх клітинних компонентів. Такі перетворення речовин у клітині можна поділити на три етапи. *На рис. 11.1* показана загальна схема шляхів біосинтезу клітинного матеріалу з глюкози. Замість глюкози як ростовий субстрат можуть бути використані інші сполуки (етанол, ацетат, метанол, метан, жирні кислоти, органічні кислоти, вуглеводні та ін.). Тоді незалежно від використаного субстрату загальна схема біосинтезу клітинного



Рис. 11.1. Загальна схема шляхів біосинтезу клітинного матеріалу з глюкози

матеріалу є однаковою. У разі використання відмінних від глюкози ростових субстратів реалізуються інші шляхи утворення необхідних проміжних продуктів метаболізму.

На *першому* етапі поживні речовини розщеплюються на невеликі фрагменти. Так, з глюкози утворюється фосфоендпіруват, піруват, ацетил-КоА. Цей етап називається *розпадом*, або *катаболізмом*.

На *другому* етапі ці утворені з субстрату невеликі фрагменти перетворюються на ряд органічних кислот (наприклад, як показано на *рис. 11.1*, — оксалоацетат та 2-оксоглутарат) і фосфорних ефірів. Другий етап називається *проміжним обміном*, або *амфіболізмом*. Перший і другий етапи непомітно переходять один у один.

На *третьому* етапі з проміжних сполук утворюються так звані "будівельні блоки" — мономери (амінокислоти, цукрофосфати, жирні кислоти, нуклеотиди), необхідні для синтезу полімерних макромолекул (білків, амінокислот, полісахаридів, ліпідів, нуклеинових кислот), з яких складається мікробна клітина. Цей етап утворення клітинних речовин (синтез мономерів і полімерів) називається *анаболізмом*, *конструктивним метаболізмом*, *біосинтезом*. У науковій літературі найживішим є термін "конструктивний метаболізм".

### 11.2. ЕНЕРГЕТИЧНИЙ МЕТАБОЛІЗМ

Для здійснення реакцій конструктивного метаболізму необхідна енергія. Така енергія може бути одержана з різних джерел: фототрофні мікроорганізми використовують енергію світла, літотрофи — енергію, яка вивільнюється при окисненні неорганічних сполук, органіотрофи — енергію, яка вивільнюється при окисненні органічних сполук, тобто при катаболізмі.

Сукупність метаболічних реакцій, що зумовлюють перетворення енергії світла чи хімічних сполук (неорганічних або органічних) у форму, яка може використовуватися у конструктивному метаболізмі (мікроергічні сполуки та відновлювальні еквіваленти) називається *енергетичним метаболізмом*.

**Макроергічні сполуки.** Макроергічними називаються сполуки, які містять макроергічні зв'язки, тобто зв'язки з високою вільною енергією гідролізу. До таких сполук належать у пер-

шу чергу АТФ — основний носій біологічної енергії, а також ряд проміжних продуктів, що утворюються у процесі розкладання органічних субстратів (1,3-дифосфогліцерат, фосфоенолпіруват, ацилфосфат та ін.).

**АТФ як кофермент для активації метаболітів.** АТФ є своєрідною "енергетичною валютою" клітини — безпосереднім джерелом енергії для синтезу структурних компонентів клітини, транспорту поживних речовин у клітину, механічного руху та осморегуляції. Крім того, багато які проміжні продукти метаболізму для подальших перетворень у клітині потребують активації шляхом перенесення груп. Така активація відбувається за допомогою АТФ. При цьому можливі три варіанти використання АТФ:

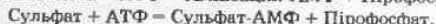
1. Цукри активуються перетворенням у відповідні фосфорильовані похідні:



2. Рибозо-5-фосфат активується в результаті перенесення дифосфатного залишка (пірофосфату):



3. Деякі з неорганічних кислот, всі амінокислоти та неорганічний сульфат активуються приєднанням АМФ-групи з вивільненням пірофосфату:



**Відновлювальні еквіваленти.** Це протони (атомні водню) та електрони, які утворюються при окисненні субстрату (в окисно-відновних реакціях). Так, окиснення органічних сполук відбувається перенесенням електронів від донора до акцептора. За біологічного окиснення найчастіше відбувається одночасне перенесення двох електронів, при цьому від субстрату відщеплюються також два протони. Таке окиснення субстрату, яке відбувається з відщепленням двох протонів, називається *дегідруванням*. Дегідрування субстратів здійснюють ферменти, які називаються *дегідрогеназами*. Причому в назвах багатьох дегідрогеназ вказується донор водню (протоку), наприклад, *малатдегідрогеназа*, *алкогольдегідрогеназа*. Слід зазначити, що терміни *донор водню* та *донор електронів* вживаються як синоніми. Рівнознач-

ними є також терміни *акцептор водню* та *акцептор електронів*, *окиснення* і *дегідрування*, *відновлення* і *гідрування*.

**Піридиннуклеотиди.** Багато які дегідрогенази переносять водень на один з двох коферментів — нікотинамідаденідинуклеотид (НАД, в окисненій формі — НАД<sup>+</sup>) або нікотинамідаденідинуклеотидфосфат (НАДФ, в окисненій формі — НАДФ<sup>+</sup>) (рис. 11.2). **Кофермент** — це низькомолекулярна сполука, яка разом з ферментом бере участь у зв'язуванні та наступному перенесенні окремих фрагментів субстрату. Авалогічну роль при функціонуванні ферментів виконують також *простетичні групи фер-*

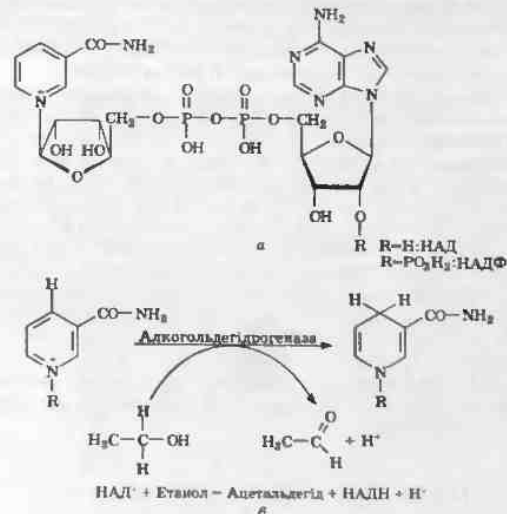


Рис. 11.2. Дегідрування і піридиннуклеотиди:

*a* — структурна формула коферментів — нікотинамідаденідинуклеотиду (НАД) та нікотинамідаденідинуклеотидфосфату (НАДФ). Групою, що визначає функцію обох коферментів, є амід нікотинамідної кислоти; *б* — реакція окиснення етанолу до ацетальдегіду за участю НАД, залишки алкогольдегідрогенази: один водень переноситься від субстрату разом з парою електронів (у вигляді гідриду-іону) на піридинове кільце, другий водень переходить у розчин

**ментів.** Проте на відміну від коферменту, простетична група міцно зв'язана з ферментом і не відділяється від нього під час приєднання і перенесення фрагментів субстрату.

На рис. 11.2 показана реакція окиснення етанолу до ацетальдегіду, яка каталізується ферментом *алкогольдегідрогеназою*. Групою, яка визначає функцію коферментів НАД і НАДФ, є амід нікотинової кислоти. Один водень переноситься з субстрату разом із парою електронів (у вигляді гідрид-іону) на придинове кільце, другий водень переходить у розчин. У результаті реакції НАД і НАДФ перетворюються відповідно у НАДН і НАДФН. Обидва коферменти вільно дисоціюють, тобто відділяються від одної дегідрогенази і переносять водень після зв'язування з іншим ферментом на інший акцептор. Тому їх називають переносниками водню і поняття "відновлювальні еквіваленти" пов'язують саме з НАДН та НАДФН.

Виникає ряд закономірних запитань: яке відношення до енергетичного метаболізму мають відновлювальні еквіваленти? Чому, коли йдеться про енергетику мікробної клітини, мають на увазі АТФ і відновлювальні еквіваленти? Яке відношення до АТФ мають відновлювальні еквіваленти? НАДН переносить водень у дихальний ланцюг, де при його окисненні (при перенесенні електронів від НАДН на кисень або інший акцептор електронів) вивільнюється енергія, яка використовується для синтезу АТФ. Отже, НАДН бере участь у генерації енергії (синтезі АТФ) у мікробній клітині. Такий механізм синтезу АТФ, який спирається на перенесення електронів у дихальному ланцюзі, називається *окиснювальним фосфорилуванням* (фосфорилування при перенесенні електронів).

Щодо НАДФН, то вважають, що він бере участь, головним чином, у відновлювальних етапах процесів біосинтезу (конструктивного метаболізму).

### 11.3. ПРИНЦИП "БІОХІМІЧНОЇ ЄДНОСТІ"

Принцип "біохімічної єдності" — одна з небагатьох догм, яка визнається у наш час. Згідно з цим принципом, усі живі істоти, які існують на Землі, подібні у біохімічному відношенні. Цей принцип виражається, наприклад, в однаковості у всіх живих істот "будівельних блоків" для синтезу клітини, у ролі АТФ як універсального носія біологічної енергії, у універсаль-

ності генетичного коду, в універсальності плазматичної мембрани, у єдності шляхів перетворення цукрів і природи дихального ланцюгу. Майже ідентичними у всіх живих істот є і центральні метаболічні шляхи. Існує лише декілька груп бактерій, у яких основні схеми метаболізму так чи інакше модифіковані — переважають якісь певні шляхи, а інші є скороченими чи якимось змішаними. Всі варіанти обміну речовин у мікроорганізмів можна звести до загальної схеми. Метаболічні шляхи формувались, очевидно, в ході еволюції, і можна вважати, що типовий для аеробних організмів біохімічний апарат виник відносно пізно, коли у повітрі з'явився кисень. У наш час важко з'ясувати, що являють собою скорочені метаболічні шляхи у деяких бактерій — примітивні особливості чи результат деградації.

### 11.4. РОЛЬ ФЕРМЕНТІВ У МЕТАБОЛІЗМІ. ФЕРМЕНТИ МІКРООРГАНІЗМІВ

Хімічні перетворення речовин у клітині (метаболічні реакції) здійснюються за допомогою ферментів. За кожне перетворення одного метаболіту в інший відповідальним є особливий фермент. Ферменти — це білки, яким притаманна каталітична функція.

Ферментативна реакція починається зі зв'язування певного метаболіту (субстрату) з ферментом. Кожний фермент взаємодіє лише з одним субстратом, тобто характеризується певною *субстратною специфічністю*. Пізнавання субстрату ферментом відбувається в процесі зв'язування. Субстрат приєднується тільки в певній ділянці молекули ферменту — *каталітичному центрі*. Стеричні властивості субстрату і розподіл заряду в його молекулі є тими ознаками, за якими субстрат розпізнається ферментом. Субстрат і фермент підходять один до одного, як ключ до замка. Швидкість реакції, яка каталізується ферментом, є приблизно на 10 порядків вищою за швидкість неферментативної реакції.

Дуже важлива властивість ферментів полягає в тому, що їх каталітична активність піддається регуляції. У ферментів, крім каталітичного центру, є *регуляторний центр*, у якому відбувається зв'язування ферменту з *ефекторами* — сполуками, які змінюють каталітичну активність ферменту. Такими ефекторами можуть бути кінцеві продукти даної ферментативної реакції (*негативні ефектори*) або інші сполуки. *Позитивні ефектори* підвищують активність фермента. Ефектори за своєю

структурою не мають нічого спільного з субстратами. Вони стерично відмінні від субстратів. Тому йдеться про *алостеричні ефектори*, а центри, відповідальні за регуляцію, називаються *алостеричними центрами* ферментів.

У зв'язуванні і наступному перенесенні окремих фрагментів субстрату (водню, метильних груп, аміногруп) разом з ферментами беруть участь низькомолекулярні сполуки — *коферментні простетичні групи*. Прикладом коферментів і простетичних груп можуть бути НАД, НАДФ, тіамінопірофосфат, кофермент А та ін.

У клітинах мікроорганізмів виявлено ферменти шести класів (табл. 11.1).

Ферменти мікроорганізмів

Таблиця 11.1

Клас	Назва ферменту	Реакція (приклад)
1. Оксидоредуктази (каталізують окисно-відновні реакції)	Дегідрогенази	Каталізують реакцію відщеплення водню від субстрату (окиснення) і перенесення його на іпшу сполуку (відновлення): $\text{Етанол} + \text{НАД} \rightarrow \text{Ацетальдегід} + \text{НАДН}$ ( <i>алкогольдегідрогеназа</i> )
	Цитохроми	Забезпечують перебіг окисно-відновних реакцій у результаті переходу $\text{Fe}^{2+}$ у $\text{Fe}^{3+}$ (є переносниками електронів): $\text{O}_2 + 4 \text{Fe}^{2+} \rightarrow 2\text{O}^{2-} + 4 \text{Fe}^{3+}$ ( <i>цитохромоксидаза</i> )
	Каталаза, пероксидази	Каталаза каталізує розщеплення перекису водню, пероксидаза — окиснення органічних субстратів перекисом водню і розклад перекису: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ( <i>каталаза</i> ); $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ ( <i>глутатіонпероксидаза</i> )
2. Трансферази (каталізують перенесення груп з однієї молекули на іншу)	Транскетолаза, трансальдолаза	Каталізують взаємоперетворення цукрів з різною кількістю атомів вуглецю за рахунок перенесення від одного цукру до іншого вуглецевих залишків у вигляді кетонних та альдегідних груп: $3 \text{Рибulozo-5-фосфат} \rightarrow 2 \text{Фруктоzo-6-фосфат} + \text{Гліцеральдегід-3-фосфат}$
	Гексокінази	Здійснюють перенесення фосфорних груп, які забезпечують фосфорилування цукрів: $\text{Глюкоzo} + \text{АТФ} \rightarrow \text{Глюкоzo-6-фосфат} + \text{АДФ}$
	Трансамінази	Каталізують перенесення аміногруп з утворенням кетокислот: $\text{Амінокислота} + \text{Піруват} \rightarrow \text{Кетокислота} + \text{Аланін}$

Змінення табл. 11.1

Клас	Назва ферменту	Реакція (приклад)
3. Гідролази (каталізують розщеплення складних сполук з приєднанням води)	Протеази	Розщеплюють білок до пептидів та амінокислот
	Амілази, целюлази	Розщеплюють полісахариди (крохмаль, целюлозу) до моно- та олігосахаридів
	Естерази	Розщеплюють ефірні зв'язки: $\text{Жири} \rightarrow \text{Гліцерин} + \text{Жирні кислоти}$ ( <i>ліпаза</i> )
4. Ліази (каталізують відщеплення груп від субстрату без участі води з утворенням подвійних зв'язків)	Декарбоксилази	Відщеплюють карбоксильну групу: $\text{Піруват} \rightarrow \text{Ацетальдегід} + \text{CO}_2$ ( <i>піруватдекарбоксилаза</i> )
	Альдослаза	Розщеплює гексози на дві тріози: $\text{Фруктоzo-1,6-дифосфат} \rightarrow \text{Гліцеральдегід-3-фосфат} + \text{Діоксидетонфосфат}$ ( <i>фруктозогліцеральдегідальдолаза</i> )
5. Ізомерази (каталізують перетворення органічних сполук в їх ізомери)	Глюкозофосфат-ізомераза	Каталізує перетворення глюкози на фруктозу: $\text{Глюкоzo-6-фосфат} \rightarrow \text{Фруктоzo-6-фосфат}$
	Тріозофосфат-ізомераза	Каталізує взаємоперетворення гліцеральдегіду і діоксидетону: $\text{Гліцеральдегід-3-фосфат} \rightarrow \text{Діоксидетонфосфат}$
6. Ліази (синтезази) (забезпечують реакції синтезу, які супроводжуються відщепленням залишків фосфорної кислоти від АТФ)	Ацетил-КоА-синтетаза	Перетворює ацетат на ацетил-КоА: $\text{Ацетат} + \text{КоА} + \text{АТФ} \rightarrow \text{Ацетил-КоА} + \text{АМФ} + \text{ФФ}$
	Фосфоенолпіруват-синтетаза	Перетворює піруват на фосфоенолпіруват: $\text{Піруват} + \text{АТФ} \rightarrow \text{Фосфоенолпіруват} + \text{АМФ} + \text{ФФ}$

## 11.5. ШЛЯХИ КАТАБОЛІЗМУ ГЛЮКОЗИ ТА ІНШИХ ВУГЛЕВОДІВ

Глюкоза є найбільш поширеною органічною речовиною на Землі, в перетворенні якої беруть участь представники всього живого світу (рослини, тварини, мікроорганізми). Крім того, вуглеводи є найбільш поширеним субстратом для культивування промислово важливих мікроорганізмів, які є об'єктами біотехнології.

У наш час відомо чотири шляхи катаболізму глюкози, які функціонують у мікроорганізми.

### 11.5.1. Фруктозо-1,6-дифосфатний шлях (гліколіз)

Третя назва цього шляху катаболізму глюкози — шлях Ембдена—Мейєргофа—Парнаса (за прізвищами дослідників, які вивчали цей процес). Уперше він був відкритий у м'язових тканинах. Гліколіз функціонує у тварин, рослин і багатьох мікроорганізмів. При функціонуванні гліколізу глюкоза перетворюється на піруват (рис. 11.3).

Процеси перетворення глюкози на гліцеральдегід-3-фосфат пов'язані з витратами енергії. Під час подальшого окиснення гліцеральдегід-3-фосфату до пірувату енергія вивільнюється. Перетворення 1,3-дифосфогліцерату на 3-фосфогліцерат спряжено з фосфорилуванням АДФ і утворенням АТФ (фермент фосфогліцераткіназа). Ця реакція є одним з пунктів гліколізу, в яких АТФ утворюється в результаті фосфорилування на рівні

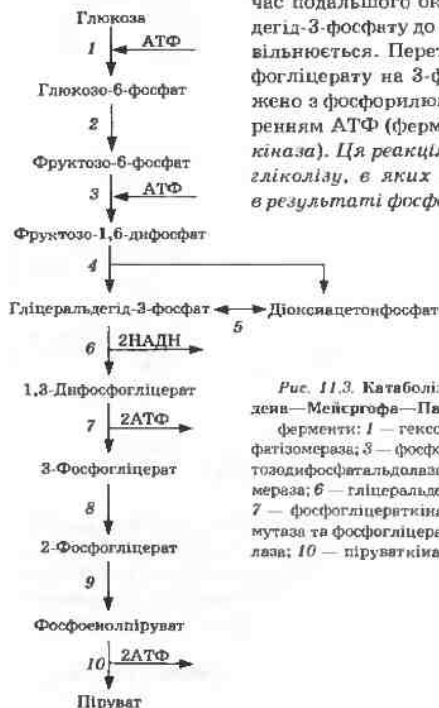


Рис. 11.3. Катаболізм глюкози. Шлях Ембдена—Мейєргофа—Парнаса:

ферменти: 1 — гексокіназа; 2 — глюкозофосфатізомераза; 3 — фосфогліцераткіназа; 4 — фруктозо-1,6-дифосфатальдолаза; 5 — триозофосфатізомераза; 6 — гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 7 — фосфогліцераткіназа; 8 — гліцератфосфомутаза та фосфогліцератфосфомутаза; 9 — енолаза; 10 — піруваткіназа

субстрату. Фосфоенілпіруват (ФЕП) — це друга сполука, яка містить фосфорильний зв'язок з високою енергією гідролізу: при утворенні пірувату з ФЕП фосфат переноситься на АДФ з утворенням АТФ (фермент піруваткіназа). Ця реакція є другим пунктом утворення АТФ на рівні субстрату у шляху Ембдена—Мейєргофа—Парнаса. Обидві реакції, які проходять з виділенням енергії (утворенням АТФ) у процесі перетворення гліцеральдегід-3-фосфату на піруват, є для анаеробних мікроорганізмів основними етапами, які постачають енергію. В анаеробних умовах усі мікроорганізми, які зброджують вуглеводи, використовують енергію, що одержується при окисненні гліцеральдегід-3-фосфату до пірувату.

Усі реакції гліколізу, за винятком трьох (гексокіназної, фосфогліцераткіназної та піруваткіназної), є повністю оборотними.

Сумарну реакцію розщеплення глюкози за шляхом Ембдена—Мейєргофа—Парнаса можна подати у вигляді:



### 11.5.2. Шлях Ентнера—Дудорова

Шлях Ентнера—Дудорова є характерним тільки для мікроорганізмів. Його особливість полягає в тому, що один з інтермедіатів (проміжних продуктів), а саме 2-кето-3-дезоксиглюконовий кислота (КДФГ) унікальний, у зв'язку з чим шлях Ентнера—Дудорова називають також КДФГ-шляхом. Уперше його відкрили Н. Ентнер та М. Дудоров у бактерій *Pseudomonas saccharophila*. При його функціонуванні, як і при гліколізі, глюкоза перетворюється на піруват (рис. 11.4).

Перший етап цього шляху аналогічний гліколізу — глюкоза фосфорилується за участю АТФ і перетворюється на глюкозо-6-фосфат. Цей етап каталізує фермент *гексокіназа*. Далі глюкозо-6-фосфат під дією ферментів *глюкозо-6-фосфатдегідрогенази* та *альдолази* окиснюється до 6-фосфоглюконату. На наступному етапі з однієї молекули 6-фосфоглюконату утворюється одна молекула гліцеральдегід-3-фосфату та одна молекула пірувату (ферменти *фосфоглюконатдегідратаза* та *альдолаза*). Гліцеральдегід-3-фосфат може піддаватися дії ферментів гліколітичного шляху і перетворюватись на другу молекулу пірувату з утворенням двох молекул АТФ і відновленням молекули НАД.

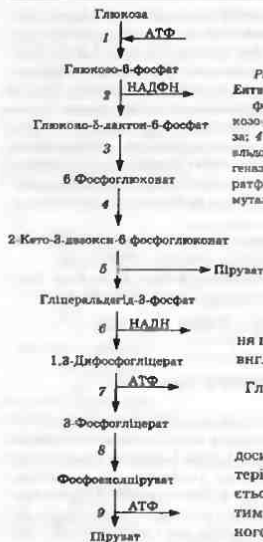
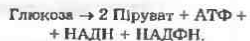


Рис. 11.4. Катаболізм глюкози. Шлях Ембена—Дудорова:

ферменти: 1 — гексокіназа; 2 — глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 3 — лактоназа; 4 — фосфоглюконатдегідратаза; 5 — альдолаза; 6 — гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа; 7 — фосфогліцераткіназа; 8 — гліцератфосфомутаза, фосфогліцератфосфомутаза та енолаза; 9 — піруваткіназа

Сумарна реакція розщеплення глюкози за КДФГ-шляхом має вигляд:



Шлях Ембена—Дудорова досить поширений у аеробних бактерій, а у анаеробів він зустрічається дуже рідко. Це зумовлено тим, що в анаеробів немає дихального ланцюга, і АТФ утворюється при фосфорилуванні на рівні субстрату. У зв'язку з цим гліко-

ліз для них більш економічний: він дає дві молекули АТФ при перетворенні однієї молекули глюкози на дві молекули пірувату, в той час як при використанні КДФГ-шляху на дві молекули пірувату утворюється лише одна молекула АТФ.

Шлях Ембена—Дудорова має важливе значення, коли субстратами служать такі сполуки, як глюконат, маніоїт, гексуронати. У багатьох бактерій метаболізм глюкової, маніоїної, глюкуроїнової кислот і споріднених з ними сполук здійснюється за шляхом Ембена—Дудорова.

### 11.5.3. Розщеплення глюкози через глюконат

Деякі бактерії (наприклад, псевдомонади) здатні розкладати глюкозу через глюконат (рис. 11.5). При цьому глюкоза під дією *глюкозодегідрогенази* окиснюється до глюконату. Глюконат під дією ферменту *глюконокінази* може фосфорилуватись до 6-фосфоглюконату, який катаболізується далі за шляхом Ембена—Дудорова. Іншим варіантом перетворення глюконату є його окиснення до 2-кетоглюконату (фермент *глюконатдегідрогеназа*), який потім фосфорилується і відновлюється (ферменти *2-кетоглюконокіназа* та *2-кетоглюконатредуктаза*), утворюючи знову-таки 6-фосфоглюконат, який катаболізується далі за шляхом Ембена—Дудорова.



Рис. 11.5. Катаболізм глюкози. Розщеплення через глюконат:

ферменти: 1 — НАД(P)-залежна глюкозодегідрогеназа; 2 — глюконокіназа; 3 — НАД(P)-залежна глюконатдегідрогеназа; 4 — 2-кетоглюконокіназа; 5 — 2-кетоглюконатредуктаза

Акцепторами електронів у глюкозодегідрогеназній реакції можуть бути НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>, а також піролюхінолініхініон (ПХХ), тому глюкозодегідрогенази можуть бути НАД<sup>+</sup>-, НАДФ<sup>+</sup>- та ПХХ-залежними. Піролюхінолініхініон-залежна глюкозодегідрогеназа інакше називається ФМС-залежною. ФМС — це феназин-метасульфат, який є штучним акцептором електронів у реакції виявлення ПХХ-залежної глюкозодегідрогенази.



## 11.5.4. Пентозофосфатний цикл

Інші назви цього циклу: фосфоглюконатний шлях, гексозофосфатний шунт.

Пентозофосфатний цикл не є основним шляхом розщеплення глюкози. Він служить постачальником НАДФН для реакцій конструкторного метаболізму і рибози — для синтезу нуклеотидів.

Пентозофосфатний цикл приводить до окиснення одного з атомів глюкози з утворенням  $\text{CO}_2$  та пентози, яка шляхом ряду перетворень перетворюється на ніквідний інтермедіат шляху — глюкозо-6-фосфат (рис. 11.6).

У пентозофосфатному циклі глюкозо-6-фосфат перетворюється на 6-фосфоглюконат (фермент *глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа*). 6-фосфоглюконат під дією ферменту *глюконат 6-фосфатдегідрогенази* окиснюється до рибулозо-5-фосфату, утворенням якого закінчуються окиснювальні етапи пентозофосфатного циклу. Наступні реакції є реакціями перетворення пентозофосфатів на гексозофосфати та навпаки. За участю *транскетолази* та *трансальдолази* рибулозо-5-фосфат перетворюється на дві молекули фруктозо-6-фосфату та одну молекулу гліцеральдегід-3-фос-

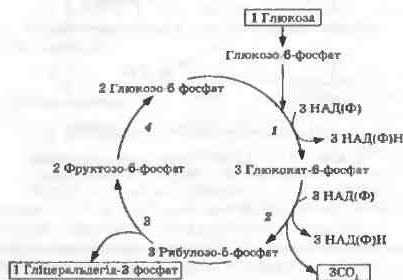
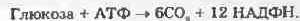


Рис. 11.6. Окиснювальний пентозофосфатний цикл. Глюкоза окиснюється до  $\text{CO}_2$  та гліцеральдегід-3-фосфату: ферменти: 1 — глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 2 — глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа; 3 — трансальдолаза і транскетолаза; 4 — глюкозофосфатізомераза; НАД(Ф) означає, що дегідрогеназа використовує як кофактори НАД або НАДФ.

фату. Гліцеральдегід-3-фосфат може далі залучатися до метаболізму через піруват. Фруктозо-6-фосфат перетворюється на глюкозо-6-фосфат (фермент *глюкозофосфатізомераза*), і цикл замикається. Дегідрогенази, які беруть участь у функціонуванні пентозофосфатного циклу, можуть бути НАД<sup>+</sup>- або НАДФ<sup>+</sup>-залежними.

Слід зазначити, що неокиснювальні реакції пентозофосфатного циклу беруть участь у розщепленні пентоз у багатьох мікроорганізмів. *Схема катаболізму пентоз* така: фосфорильовання пентози у положенні 5, ізомеризація та епімеризація до проміжних продуктів пентозофосфатного циклу, перетворення на фруктозо-6-фосфат і гліцеральдегід-3-фосфат, розщеплення за шляхом Ембдена—Мейергофа—Парнаса.

Сумарна реакція розщеплення глюкози у пентозофосфатному циклі:



## 11.5.5. Поняття “ключові ферменти”

Як можна встановити, який шлях катаболізму глюкози функціонує у того чи іншого мікроорганізму? Звичайно ж, необхідно визначити активності ферментів, що беруть участь у катаболізмі глюкози. Проте багато які ферменти каталізують перетворення глюкози за різних шляхів катаболізму цього субстрату. Так, *гексокіназа* функціонує у гліколізі, КДФГ-шляху та пентозофосфатному циклі, *глюкозофосфатізомераза* — у гліколізі та пентозофосфатному циклі, *глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа* — у пентозофосфатному циклі та КДФГ-шляху і т.д.

Але існують ферменти, які властиві тільки даному конкретному метаболічному шляхові. Це так звані *ключові ферменти* (табл. 11.2).

Таблиця 11.2

Основні шляхи катаболізму глюкози у мікроорганізмах

Шлях катаболізму	Ключові ферменти
Ембдена—Мейергофа—Парнаса (гліколіз, фруктозо-1,6-дифосфатний шлях)	1-Фоскофруктонілаза 6-Фоскофруктонілаза
Ентерва—Дудорва (КДФГ-шлях)	6-Фоскоглюконатдегідратаза 2-Кето-3-дезоксиг-6-фоскоглюконатальдолаза
Розщеплення через глюкокват	НАД <sup>+</sup> -глюкозальдогратеназа НАДФ <sup>+</sup> -глюкозальдогратеназа НХХ-глюкозальдогратеназа

### 11.5.6. Катаболізм вуглеводів, відмінних від глюкози

Полісахариди. Полімери не можуть проникати через клітинну мембрану. Тому мікроорганізми синтезують позаклітинні ферменти (здебільшого гідролази), які розкладають полімери до невеликих молекул, що можуть транспортуватися у клітину.

*Крахмаль* та *глікоген* розщеплюються амілазами, які розкладають полімери спочатку до декстринів, а потім до мальтози, глюкози та олігосахаридів.

*Целюлоза* гідролізується целюлазою, яка розкладає цей полімер до глюкози та целобіози. До ферментів, які здатні розщеплювати полісахариди, належать також пектинази, хітинази, ксиланази, агарози, нейрамінідази та ін.

Утворені в результаті гідролізу полімерів моно- та дисахариди (наприклад, мальтоза, целобіоза) легко поглинаються клітиною.

**Дисахариди.** Внутрішньоклітинне руйнування дисахаридів часто починається з *пірофосфоролітичного розщеплення* за участю ферментів фосфорилаз:

Целобіоза + Фосфат → Глюкозо-1-фосфат + Глюкоза  
(*целобіозофосфорилаза*);

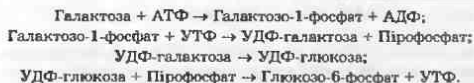
Мальтоза + Фосфат → Глюкозо-1-фосфат + Глюкоза  
(*мальтозофосфорилаза*);

Сахароза + Фосфат → Глюкозо-1-фосфат + Фруктоза  
(*сахарозофосфорилаза*).

Деякі дисахариди (сахароза, лактоза) можуть розщеплюватися гідролазами (*інвертаза* та *β-галактозидаза* відповідно). Звичайно, фосфорилази економічніші, ніж вказані гідролази, оскільки під дією фосфорилаз відразу утворюється фосфорилюваний вуглевод, тобто для утворення вуглевод-1-фосфату не потрібна АТФ.

**Пентози.** Для розщеплення пентоз у багатьох мікроорганізмів використовуються неокиснювальні реакції пентозофосфатного циклу.

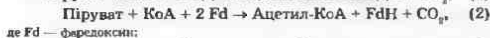
**Взаємоперетворення моносахаридів.** Взаємоперетворення моносахаридів відбуваються за участю УДФ-вуглеводів (уридиндифосфатпохідних вуглеводів). Як приклад наведемо перетворення галактози на глюкозу:



### 11.5.7. Окиснення пірувату

У результаті катаболізму глюкози утворюються одні з найважливіших метаболітів — піруват, який є попередником багатьох продуктів.

Переважає більшість мікроорганізмів окиснює піруват до ацетил-коферменту А (ацетил-КоА). Утворення ацетил-КоА з пірувату може здійснюватися у таких реакціях:



Реакція (1) каталізується мультиферментним *піруватдегідрогеназним* комплексом, що складається з трьох ферментів, одним з яких є *піруватдегідрогеназа*. Цей комплекс функціонує майже у всіх аеробних мікроорганізмів. У строгих анаеробів піруватдегідрогеназний комплекс відсутній.

Реакцію (2) каталізує фермент *піруват:фредоксин-оксидоредуктаза*. Цей фермент у багатьох анаеробних бактерій (наприклад, у клостридій) має особливе значення.

Реакцію (3) каталізує фермент *піруват:форміат-ліаза*. Його виявлено у багатьох анаеробних бактерій, які виділяють мурашину кислоту (здійснюють мурашинокисле бродиння), зокрема у ситробактерій, а також у фототрофних бактерій.

У дріжджів і деяких бактерій, які утворюють етанол, є четвертий фермент, що окиснює піруват:



Фермент *піруватдекарбоксилаза* розщеплює піруват до ацетальдегіду та вуглекислого газу. Ацетальдегід потім відновлюється до етанолу.

## 11.5.8. Цикл трикарбонових кислот

У циклі трикарбонових кислот (ЦТК) відбувається окиснення ацетил-КоА до  $\text{CO}_2$  з перенесенням відновлювальних еквівалентів на НАД, НАДФ, ФАД (рис. 11.7). Цей цикл був відкритий Г.А. Кребсом і Л.В. Егглестоном у тканинах тварин. Його інакше називають циклом Кребса або циклом лимонної кислоти. Назва "цикл лимонної кислоти" зустрічається рідко в науковій літературі.

Ацетил-КоА вводиться у цикл в результаті *цитрат-синтазної* реакції, в якій оксалоацетат (щавлево-оцтова кислота) і ацетил-КоА конденсуються з утворенням цитрату. Цей етап каталізується ферментом *цитратсинтазою*. Далі під дією ферменту *аконітагидрати* відбувається оборотне взаємоперетворення трьох трикарбонових кислот:

Цитрат  $\leftrightarrow$  цис-Аконітат  $\leftrightarrow$  Ізоцитрат.



Рис. 11.7. Цикл трикарбонових кислот: ферменти: 1 — піруватдегідрогеназа; 2 — цитратсинтаза; 3 — аконітаза; 4 — ізоцитратдегідрогеназа; 5 — 2-оксоглутаратдегідрогеназа; 6 — сукциніл-КоА-синтаза; 7 — сукцинатдегідрогеназа; 8 — фумаратаза; 9 — малатдегідрогеназа

Фермент *ізоцитратдегідрогеназа* каталізує реакції перетворення ізоцитрату на 2-оксоглутарат. Ізоцитратдегідрогеназа може бути НАД- або НАДФ-залежною. Під дією *2-оксоглутаратдегідрогенази* з 2-оксоглутарату утворюється сукциніл-КоА, який перетворюється на сукцинат за участю ферменту *сукцинатіоніази*. Перетворення сукциніл-КоА на сукцинат спряжено з утворенням АТФ.

*Сукцинатдегідрогеназа* окиснює сукцинат до фумарату. Сукцинатдегідрогеназа переносить електрони від сукцинату на ФАД — флавінаденидинуклеотид. Електрони від ФАД надходять у дихальний ланцюг. НАД не використовується як акцептор електронів у цій реакції.

На наступному етапі циклу фермент *фумарата (фумаратгидратаза)* приспонує до фумарату воду з утворенням малату. За допомогою *малатдегідрогенази* відбувається дегідратування малату до оксалоацетату.

Всі реакції циклу є оборотними, за винятком утворення сукциніл-КоА.

Окиснення ацетил-КоА у циклі трикарбонових кислот дає дві молекули  $\text{CO}_2$ , вісім протонів, з яких шість — на рівні піридин-нуклеотидів і два — на рівні флавопротеїнів. Крім того, утворюється молекула макроергічної сполуки.

Стехіометрія ЦТК:



Цикл трикарбонових кислот є основним джерелом НАДН, виступає окиснення якого у дихальному ланцюгу генерує АТФ у гетеротрофних вербних мікроорганізмів.

## 11.5.9. Анаплеротичні реакції у процесі вирощування мікроорганізмів на вуглеводах

ЦТК служить джерелом ряду інтермедіатів, необхідних для конструктивного метаболізму (оксалоацетат, сукцинат, 2-оксоглутарат). Відсутність цих кислот призвела б до недостатності оксалоацетату, який є акцептором для ацетил-КоА, і тим самим до порушення циклу. Поповнення втрат проміжних продуктів ЦТК (інтермедіатів ЦТК) відбувається в *анаплеротичних реакціях*.

У процесі вирощування мікроорганізмів на вуглеводах такими реакціями є (рис. 11.8):

карбоксилювання фосфоенолпірувату з утворенням оксалоацетату (фермент *фосфоенолпіруваткарбоксилаза*):

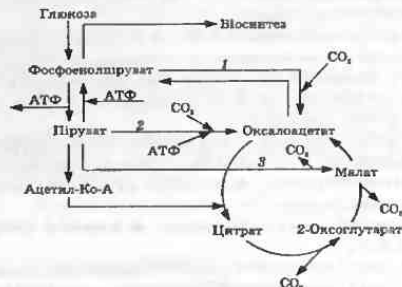


Рис. 11.8. Реакції карбоксилювання фосфоенолпірувату та пірувату:

ферменти: 1 — фосфоенолпіруваткарбоксилаза, 2 — піруваткарбоксилаза; 3 — малатдегідрогеназа (декарбоксилювальна)

карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату (фермент *піруваткарбоксилаза*):



карбоксилювання пірувату з утворенням малату (фермент *малатдегідрогеназа* декарбоксилювальна).

## 11.6. ДИХАЛЬНИЙ ЛАНЦЮГ І ФОСФОРИЛЮВАННЯ (СИНТЕЗ АТФ) ПРИ ПЕРЕНЕСЕННІ ЕЛЕКТРОНІВ

Відомі два основні механізми синтезу АТФ: субстратне фосфорилування та фосфорилування при перенесенні електро-

нів. У той час як більшість анаеробних мікроорганізмів здатні синтезувати АТФ тільки фосфорилуванням на рівні субстрату, аероби можуть значно ефективніше регенерувати АТФ. Вони мають особливий апарат: *дихальний (електрон-транспортний) ланцюг* та фермент *АТФ-синтазу*. Обидві ці системи у прокариот містяться у плазматичній мембрані, а у еукаріот — на внутрішній мембрані мітохондрій.

При окисненні субстратів утворюються відновлювальні еквіваленти (протони та електрони), які у вигляді НАДН (у разі окиснення органічних субстратів) надходять у дихальний ланцюг. Основним джерелом НАДН під час вирощування мікроорганізмів на глюкозі є цикл трикарбовоних кислот. Крім того, НАДН утворюється в початкових реакціях катаболізму глюкози:

на етапі утворення 1,3-дифосфогліцерату з гліцеральдегід-3-фосфату при катаболізмі глюкози за гліколітичним і КДФГ-шляхами;

при окисненні глюкози до глюконату за участю НАД<sup>+</sup>-залежної глюкозодегідрогенази.

У дихальному ланцюгу при окисненні НАДН (тобто при перенесенні електронів від НАДН на кисень або інший акцептор електронів) звільнюється енергія, яка використовується для синтезу АТФ.

Донором електронів для дихального ланцюга, крім НАДН, є також сукцинат. Один із ферментів ЦТК *сукцинатдегідрогеназа* окиснює сукцинат до фумарату. Сукцинатдегідрогеназа переносить електрони від сукцинату на ФАД, від якого електрони надходять у дихальний ланцюг.

Для того щоб зрозуміти, як відбувається синтез АТФ при перенесенні електронів, необхідно знати: компоненти дихального ланцюга; їх окисно-відновні потенціали; взаєморозміщення компонентів ланцюга у мембрані.

### 11.6.1. Компоненти дихального ланцюга

Основними компонентами дихального ланцюга є ферменти з міцно зв'язаними низькомолекулярними простетичними групами. Найважливішими з них є флавопротеїни, залізо-сіркові білки, хінони та цитохроми.

**Флавопротеїни.** Це — ферменти, що містять як простетичну групу флавімононуклеотид (ФМН) або флавінадиніклинук-

леотид (ФАД). Ці ферменти переносять водень. Активною групою флавопротеїнів є ізоалкоказинова система (рис. 11.9, а), яка діє як оборотна окисно-відновна система. Реагуючими центрами служать два атоми азоту, кожен з яких може зв'язатись з одним протоном. Зв'язування може відбуватися у два етапи через стан семіхінону. Завдяки здатності переносити то один,

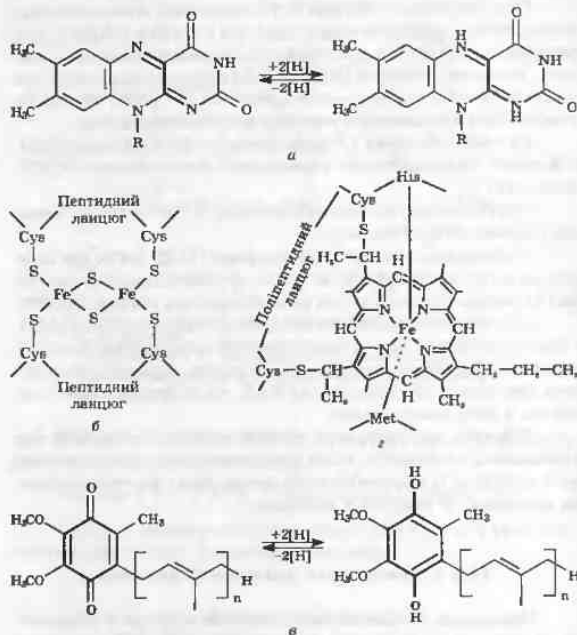


Рис. 11.9. Структурні формули деяких найважливіших компонентів дихального ланцюга:

а — ізоалкоказинова кільцева система ФМН або ФАД в окисненій і відновленій формі; б —  $[2Fe + 2S]$ -центр залізосіркового білка; в — відновлення ubiquinone до ubiquinolone; г — активна ділянка цитохрому с

то два протони, флавопротеїни можуть бути посередниками між двома типами процесів перенесення водню.

**Залізосіркові білки.** Це — окисно-відновні системи, які переносять електрони. Вони містять атоми заліза, зв'язані, з одного боку, з сіркою амінокислоти цистеїну, а з другого — з неорганічною сульфідною сіркою (рис. 11.9, б). Неорганічна сульфідна сірка легко відщеплюється у вигляді сірководню при підкисленні. Залишки цистеїну входять до складу поліпептидних ланцюгів. Fe-S-центри можна розглядати як простетичні групи поліпептиду.  $[2Fe + 2S]$ -центри є компонентами дихального ланцюга, здатні переносити тільки один електрон.

Крім транспорту електронів, ці білки беруть участь у фіксації молекулярного азоту, відновленні сульфату та нітриту, фотосинтезі та інших процесах. Прикладом залізосіркового білка може бути ферредоксин, який бере участь в окисненні пірватату в анаеробних бактерій.

**Хінони.** На внутрішній мембрані мітохондрій та у грамінегативних бактерій є ubiquinone (кофермент Q, рис. 11.9, в), у грампозитивних бактерій — нафтохінони, а у хлоропластах — пластохінони. Хінони локалізуються у ліпідній фазі мембрани. Вони здатні переносити водень або електрони. Перенесення може здійснюватися двома етапами через проміжну форму — семіхінон. У порівнянні з іншими компонентами дихального ланцюга хінони містяться у 10–15-кратному надлишку. Вони є “збирачами” водню, який постається різними коферментами та простетичними групами у дихальному ланцюгу та передають його цитохромам.

**Цитохроми.** Цитохроми є окисно-відновними системами, які переносять тільки електрони. Водень цитохроми не транспортують. До цитохромів електрони надходять від пулу хінонів. При перенесенні електронів еквівалентна кількість протонів надходить у розчин. Як простетичну групу цитохроми містять гем (рис. 11.9, г). Центральний атом заліза гемінового кільця бере участь у перенесенні електронів, змінюючи свою валентність. Цитохроми забарвлені, вони відрізняються один від одного спектрами поглинання та окисно-відновними потенціалами. Розрізняють цитохроми а,  $a_3$ , б, с, о та ряд інших.

Цитохроми беруть участь також у перенесенні електронів на кисень. Цитохромоксидаза (цитохром  $aa_3$ ) — термінальна оксидаза, яка реагує з киснем і передає йому чотири електрони:



Цитохром *о*, який часто зустрічається у бактерій, також може реагувати з молекулярним киснем. Ця термінальна оксидаза може бути інгібована ціанідом або окисом вуглецю.

Наявність цитохромів дуже довго розглядалась як ознака належності до аеробних організмів або фототрофів. Відкриття цитохрому  $c_2$  у анаеробної бактерії *Desulfovibrio* спочатку здавалося несподіваним, але потім стало зрозуміло, що відновлення сульфату цими сульфатвідновлювальними бактеріями дає їм можливість здійснювати окиснювальне фосфорилування в анаеробних умовах, і таким чином відновлення сульфату формально відповідає диханню.

### 11.6.2. Окисно-відновний потенціал

Транспорт водню та транспорт електронів — процеси еквівалентні. Дихальний ланцюг можна розглядати як ланцюг перенесення електронів. Компоненти дихального ланцюга переходять поперемінно з окисненого стану у відновлений і навпаки, тобто ведуть себе як типові окисно-відновні системи, яким притаманний окисно-відновний потенціал.

Окисно-відновний потенціал — це кількісна міра здатності тих чи інших сполук або елементів віддавати електрони. Цей потенціал розраховують відносно потенціалу молекулярного водню. Водневий напівелемент — платинований чи платиновий електрод, поміщений у розчин кислоти у рівновазі з газоподібним молекулярним воднем за тиску в 1 атм і рН 0, має потенціал, що дорівнює нулю ( $E_0 = 0$ ).

Залежність окисно-відновного потенціалу від концентрації компонентів системи виражається рівнянням Нернста:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{окисл.}]}{[\text{відн.}]},$$

де  $R$  — газова постійна;  $T$  — абсолютна температура;  $n$  — кількість електронів;  $F$  — константа Фарадея.

У всіх реакціях, які проходять за участю протонів, стандартний окисно-відновний потенціал відносять до рН 0. Але для біологічних систем зручніше розраховувати потенціал за рН 7,0, оскільки біологічні процеси проходять за значень рН, близьких до нейтрального.

При рН 7,0 та температурі 30 °C потенціал водневого електрода стає рівним -0,42 В:

$$E_0^1 = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln 10^{-7} = 0 + \frac{8,314 \cdot 303}{1 \cdot 96494} 2,303 \cdot 7 = -0,42 \text{ В.}$$

Окисно-відновний потенціал є мірою максимальної корисної роботи, яку може виконати система, тобто мірою зміни *вільної енергії* ( $\Delta G_0$ ) у даній реакції. За різницею окисно-відновних потенціалів двох реагуючих одна з одною систем ( $\Delta E_0$ ) можна розрахувати зміну вільної енергії у даній реакції, кДж/моль:

$$\Delta G_0 = -nF\Delta E_0 = -n \cdot 96,5 \Delta E_0.$$

Значення  $E_0^1$  окремих компонентів дихального ланцюга перебувають у межах від -0,32 В (для НАДН/НАД) до +0,81 В (для  $O_2$  /  $\frac{1}{2}O_2$ ).

Значення окисно-відновних потенціалів компонентів дихального ланцюга, різниця потенціалів між окремими компонентами та еквівалентні зміни вільної енергії наведені у табл. 11.3.

Таблиця 11.3  
Окисно-відновні потенціали компонентів дихального ланцюга, різниця потенціалів та еквівалентні зміни вільної енергії

Компоненти дихального ланцюга	$E_0^1$ , В	Різниця потенціалів, В	$-\Delta G_0$ , кДж/моль
Водень	-0,42		
НАД	-0,32	0,10	19,3
Флавопротеїн	-0,08	0,24	46,4
Цитохром <i>b</i>	-0,04	0,04	7,7
Цитохром <i>c</i>	+0,27	0,31	59,8
Цитохром <i>a</i>	+0,29	0,02	3,8
Кисень	+0,81	0,52	100,4

### 11.6.3. Розміщення та функції окисно-відновних систем у дихальному ланцюгу

За окисно-відновним потенціалом компоненти дихального ланцюга можна розмістити в ряд, який починається з НАД (найбільш негативний потенціал) і закінчується цитохромоксидазою та киснем (найбільш позитивний потенціал) (табл. 11.3



і рис. 11.10). Хінони та цитохроми є допоміжними елементами. Ці компоненти відновлюються воднем, який постачається різними донорами.

Розглянемо детальніше рис. 11.10. Водень, який одержується через НАД за допомогою НАДН-дегідрогенази переноситься на хінон (кофермент Q). Аналогічно на хінон надходить водень від сукцинату (через сукцинатдегідрогеназу), а також водень, який отримується при дегідруванні жирних кислот (через інші специфічні дегідрогенази). Хінон є своєрідним резервуаром водню з субстратів у дихальному ланцюгу. Деякі з ферментів, які беруть участь у перенесенні водню, містять ФМН або ФАД, а також залізосіркові білки. Відновлені хінони знову окиснюються системою цитохромів. Цитохроми приймають електрони та передають їх кисневі; водень іонізується та покидає мембрану (транспортується назовні).

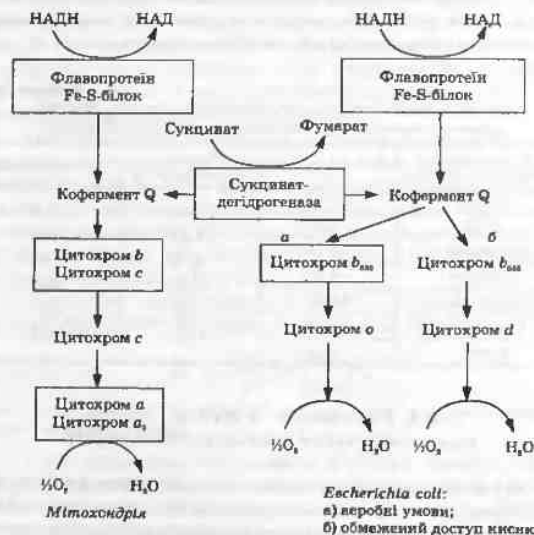


Рис. 11.10. Компоненти дихального ланцюга мітохондрій та *Escherichia coli*

### 11.6.4. Коефіцієнт P/O та енергетичний баланс

Аналіз окисно-відновних потенціалів (див. табл. 11.3) показує, що у дихальному ланцюгу є тільки три етапи окиснення, на яких вивільнюється стільки енергії, скільки міститься в одному макроергічному зв'язку. При перенесенні двох протонів від НАДН на кисень тільки три електронні переходи можуть бути спряжені з фосфорилуванням АДФ у АТФ. Такий зв'язок окиснення та фосфорилування виражають у вигляді коефіцієнта P/O.

P/O — це кількість молекул АТФ, які утворюються в розрахунку на один атом кисню. У мітохондріальному дихальному ланцюгу цей коефіцієнт дорівнює трьом, якщо донором електронів служить НАДН, і двом, якщо донором електронів є ФАД. Відомі навіть пункти утворення АТФ (див. табл. 11.3): дегідрування НАДН, окиснення цитохрому b та окиснення цитохрому a.

У бактерій дуже часто є тільки два пункти фосфорилування. Такими пунктами у *E. coli* є дегідрування НАДН та окиснення одного з цитохромів.

Тривалий час вважалося, що фосфорилування при перенесенні електронів у бактерій є менш ефективним, ніж у еукаріот. Проте за останніми дослідженнями можна зробити висновок, що деякі аеробні бактерії здатні окиснювати НАДН через дихальний ланцюг з відношенням P/O, що дорівнює трьом.

Знаючи співвідношення P/O, можна скласти енергетичний баланс для окиснення глюкози. Наприклад, припустимо, що глюкоза катаболізується за гліколітичним шляхом. У цьому разі на 1 моль використаної глюкози кількість утворених відновляльних еквівалентів (НАДН) становить (див. рис. 11.3 і 11.7):  
при окисненні глюкози до пірвату — 2 моль НАДН;  
при дегідруванні пірвату — 2 моль НАДН;  
у циклі трикарбонових кислот —  $2 \times 3 = 6$  моль НАДН і 2 моль ФАД.

При P/O, рівному 3, кількість АТФ становитиме:  $10 \times 3 + 2 \times 2 = 34$  моль АТФ. Якщо до цього додати 2 моль АТФ, які синтезуються у гліколізі, та 2 моль, які утворюються при окисненні 2-оксоглутарату, одержимо  $34 + 4 = 38$  моль АТФ.

При P/O, рівному 2, кількість АТФ становить:  $10 \times 2 + 2 \times 1 + 4 = 26$  моль.

### 11.6.5. Механізм синтезу АТФ при перенесенні електронів

Як синтезується АТФ при перенесенні електронів у дихальному ланцюгу? Звідки береться енергія, яка потім акумулюється в макроергічних зв'язках АТФ? Яким є механізм синтезу АТФ при перенесенні електронів? Відповідь на ці запитання дає *хіміо-осмотична гіпотеза*, запропонована англійським ученим П. Мітчелом у 1961 р. Основні її положення такі (рис. 11.11):

мембрана, в якій локалізований дихальний ланцюг, є непроникною для протонів та гідроксильних іонів;

віддані субстратами відновлювальні еквіваленти переносяться на плазматичну мембрану чи на внутрішню мембрану мітохонд-

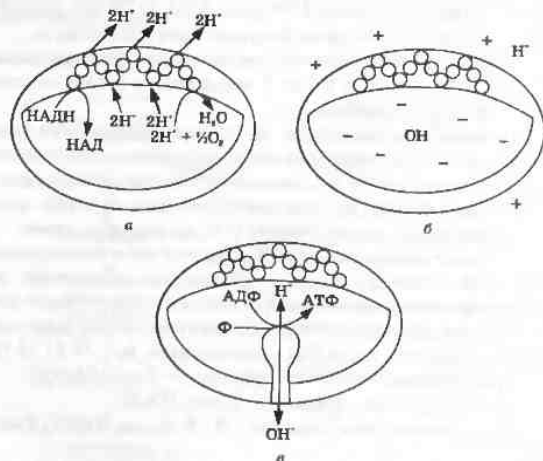


Рис. 11.11. Хіміо-осмотична гіпотеза окиснювального фосфорильовання в мітохондріях:

а — окиснення НАДН у дихальному ланцюгу супроводжується виділенням протонів із внутрішньомітохондріального простору; б — наслідком є встановлення градієнта рН і мембранного потенціалу; в — АТФ-синтаза окиснювана у мембрані таким чином, що протони адсорбуються гідроксильними іонами всередині, а іони гідроксиду — протонами зовні

рій. Взаєморозміщення компонентів дихального ланцюга у мембрані є таким, що при транспорті електронів від субстрату до кисню протони зв'язуються всередині мембрани, а вивільнюються назовні. Можна уявити, що електрони у мембрані проходять зигзагоподібний шлях і при цьому переносять протони зсередини назовні. Так, окиснення НАДН у дихальному ланцюгу супроводжується виділенням протонів на зовнішньому боці мембрани (рис. 11.11, а);

наслідком такої транслокації протонів є встановлення на мембрані градієнта рН ( $\Delta pH$ ) та градієнта електричного заряду ( $\Delta\psi$ ) з позитивним потенціалом назовні та негативним всередині (рис. 11.11, б). Отже, внутрішній простір мітохондрій або внутрішній бік плазматичної мембрани у бактерій є електронегативними по відношенню до зовнішнього середовища і відзначаються більш високим рН. Трансмембранна різниця електричного заряду (електричного потенціалу) та хімічного градієнта концентрації іонів водню (градієнт рН) створюють *трансмембранний електрохімічний градієнт протонів* (*протонрушійна сила*  $\Delta\mu_H$ , *протонний потенціал*). Протонрушійна сила може бути зумовлена або тільки градієнтом рН, або тільки градієнтом електричного заряду;

для розрядки потенціалу, що виникає в певних місцях плазматичної мембрани (чи внутрішньої мембрани мітохондрій), вбудований  $H^+$ -залежний АТФ-синтазний ферментний комплекс, який каталізує реакції синтезу чи гідролізу АТФ (рис. 11.11, в). Реакція синтезу АТФ спряжена з транспортом протонів за градієнтом протонного потенціалу (з зовнішнього боку мембрани на внутрішній), в результаті чого відбувається його розрядка. Енергія, яка виникає при цьому (енергія, яка генерується протонрушійною силою) і акумулюється у макроергічних зв'язках АТФ.

Реакція гідролізу АТФ супроводжується перенесенням протонів проти градієнта, в результаті чого зовні мембрани накопичуються протони і утворюється або збільшується  $\Delta\mu_H$ . Відбувається взаємне перетворення двох форм енергії:  $\Delta\mu_H \leftrightarrow \text{АТФ}$ . Отже, можна сказати, що АТФ-синтазний комплекс відіграє роль "протонного насоса".

Слід зазначити, що енергія протонрушійної сили використовується не тільки для синтезу АТФ. Ця форма енергії забезпечує багато які процеси, локалізовані на мембрані у бактерій: активний транспорт, рух джгутиків, зворотне перенесення електронів та ін. Для деяких процесів ця форма енергії зручніша, ніж АТФ, тому що енергія протонрушійної сили не міститься у вигляді

ді певних порцій, як в АТФ, тому не існує нижньої межі для її утворення. Вона може утворюватись і споживатись в умовах, коли синтез АТФ є неможливим.

Отже, у мікроорганізмів існує *дві форми енергії*: енергія у вигляді АТФ та енергія протонрушійної сили. АТФ утворюється при субстратному фосфорилуванні та фосфорилуванні при перенесенні електронів. Енергія протонрушійної сили генерується під час транспорту електронів у дихальному ланцюгу або у процесі гідролізу АТФ за участю АТФ-синтазного ферментного комплексу.

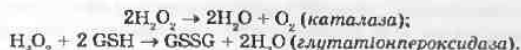
#### 11.6.6. Зворотне перенесення електронів за рахунок енергії АТФ

Особливі проблеми постають перед аеробними хемолітовотрофними бактеріями, які використовують як донор електронів неорганічні сполуки (іони амонію, нітриту, сульфідів, тіосульфату, сульфату та двовалентного заліза) і як джерело вуглецю — вуглекислоту. Ці неорганічні субстрати мають сильно позитивний окисно-відновний потенціал, тому їх окиснення не може бути прямо пов'язане з утворенням НАДН (як за окиснення органічних субстратів) з термодинамічних причин. У той же час НАДН необхідний цим бактеріям для процесів конструктивного метаболізму. Разом з тим було показано, що електрони, які вивільнюються при окисненні неорганічних субстратів, надходять у дихальний ланцюг на рівні цитохромів *c* або *o*. Отже, утворення АТФ може здійснюватись тільки на одному-єдиному етапі окиснення. Більше того, частина цієї енергії витрачається на перенесення електронів у зворотному напрямку дихального ланцюга (у бік утворення НАДН). Отже, у цих бактерій відновлення НАД відбувається в процесі зворотного транспорту електронів, на що витрачається енергія АТФ.

#### 11.6.7. Токсична дія молекулярного кисню на аеробні та анаеробні мікроорганізми

Кисень є кінцевим (термінальним) акцептором електронів під час аеробного дихання і тому потрібен усім аеробним організмам. Ще з часів Л. Пастера відомо, що кисень є токсичним для анаеробів. Несподівано виявилось, що кисень може спричиня-

ти токсичну дію і на аеробні організми. Тому у більшості організмів є ферменти, здатні захищати клітину від токсичної дії похідних кисню, якими є перекис водню, супероксид- і гідроксид-радикали, синглетний кисень. Такими ферментами є *каталаза* та *пероксидаза*, які розкладають перекис водню:



Ферментом, що нейтралізує дію супероксид-радикалів, є супероксиддисмутаза



Як видно з наведеної реакції, супероксиддисмутаза перетворює супероксид-радикали на перекис водню, який далі розкладається за допомогою каталази чи пероксидази.

#### 11.6.8. Електрон-транспортні процеси у анаеробних бактерій

В анаеробних умовах хемоорганотрофи можуть одержувати енергію (у вигляді АТФ) двома способами: бродінням (фосфорилування на рівні субстрату) та фосфорилуванням при перенесенні електронів. Проте в останньому випадку акцепторами електронів не може бути кисень (як у аеробів). Виявляється, що анаеробні бактерії здатні використовувати як акцептори електронів іони нітрату, сульфату, карбонату, фумарату, а також сірку. Такі бактерії об'єднують у відповідні групи: денітрифікатори, сульфатовідновлювальні, метанотворювальні (*метаногени*), ацетогенні бактерії. Оскільки фосфорилування, спряжене з транспортом електронів, тривалий час вважалося характерною ознакою аеробного дихання, то процеси перетворення енергії при окиснювальному фосфорилуванні в анаеробних умовах називають *"анаеробним диханням"*.

Слід зазначити, електрон-транспортне фосфорилування з фумаровою кислотою як акцептором електронів (фумаратне дихання) зустрічається не тільки у бактерій, а й у черв'яків і навіть ссавців. Реакцію, яка каталізується фумаратредуктазою, можна виявити за накопиченням чи виділенням бурштинової кислоти (сукцинату).

### 11.6.9. Інгібітори дихального ланцюга

Розглянемо інгібітори дихального ланцюга, в якому кисень є термінальним акцептором електронів. *Амітал, ротекон* пригнічують активність НАДН-дегідрогенази. *Антиміцин А* блокує перенесення електронів між цитохромами *b* та *c*. *Ціанід* та *окис вуглецю* (CO) інгібують тільки цитохромоксидазу, але не цитохром *c*. Специфічна для цих отруйних речовин разом із змінами характерних спектрів поглинання компонентів дихального ланцюга стали індикаторами, за допомогою яких було вивчено та досліджено цей ланцюг.

## 11.7. МЕХАНІЗМИ ПОГЛИНАННЯ СУБСТРАТІВ

Для того щоб екзогенний субстрат міг бути використаний клітиною, він повинен потрапити у клітину, тобто пройти через її пограничні шари. Клітинна стінка, як правило, не є суттєвою перешкодою для невеликих молекул та іонів, але вона затримує макромолекули, молекулярна маса яких перевищує 600 Да. Пограничним шаром, відповідальним за транспорт поживних речовин, є *плазматична мембрана*.

Перенесення поживних речовин через плазматичну мембрану є специфічним: можуть поглинатися тільки ті речовини, для яких є відповідна транспортна система. За невеликими винятками, транспорт залежить від наявності специфічних *пермеаз* чи *транслоказ*. Це мембранні білки, сама назва яких вказує на те, що їм притаманні властивості ферментів, тобто вони можуть індукуватися субстратом, є специфічними щодо субстрату і утворюються в таких умовах, в яких є можливим синтез білків.

Існує ряд механізмів транспорту поживних речовин у клітину. Деякі з них здатні забезпечити тільки транспорт, але не накопичення речовини в клітині. Їм можна протиставити процеси *активного транспорту*, які приводять до акумуляції речовин всередині клітини.

При порівнянні способів, за допомогою яких речовини з навколишнього середовища проходять через плазматичну мембрану у цитоплазму, можна виділити чотири різних механізми: пасивну дифузію, полегшену дифузію, активний транспорт і перенесення груп.

### 11.7.1. Пасивна дифузія

Речовина, яка переноситься, не взаємодіє специфічно з компонентами клітинної мембрани. Вона проходить через мембрану, поки не встановиться рівновага між концентрацією всередині та зовні. Оскільки в природі концентрація більшості метаболітів у клітині є вищою, ніж назовні, то очевидно, що транспорт шляхом пасивної дифузії не є дуже поширеним і обмежений невеликою групою речовин, а саме газами (кисень), водою та деякими іонами. Шляхом простої дифузії у клітину проникають інгібітори, отруйні та інші невластиві клітині сторонні речовини. У *E. coli* іони натрію надходять у клітину шляхом пасивної дифузії, у той час, як іони калію та магнію транспортуються активно. Проте інші бактерії використовують системи активного транспорту натрію.

### 11.7.2. Полегшена дифузія

Полегшена дифузія — це процес, схожий з пасивною дифузією у тому, що жоден з цих процесів не потребує метаболічної енергії, обидва вони є легко оборотними, так що концентрація речовини у клітині та середовищі є однаковою.

На відміну від пасивної, полегшена дифузія містить у собі транспорт відповідної речовини за допомогою *специфічного мембранного переносника*. Речовина, яка транспортується, зв'язується з переносником назовні мембрани та вивільнюється всередині клітини. Отже, транспорт є специфічним щодо субстрату.

Еритроцити та дріжджові клітини шляхом полегшеної дифузії поглинають цукри. У аеробних бактерій такий механізм транспорту не є суттєвим, але у анаеробів він, очевидно, бере участь у поглинанні деяких речовин і виділенні продуктів бродиння.

### 11.7.3. Активний транспорт

Більш висока ефективність активного транспорту у порівнянні з процесами дифузії показана на *рис. 11.12*. Активний транспорт приводить до насичення клітини субстратом за значно нижчої концентрації цього субстрату в середовищі, ніж у дифу-



Рис. 11.12. Криві насичення при транспорті субстрату активним та шляхом дифузії

зійних процесах. Спостерігалось концентрування речовини в кілька сотень разів. Отже, активний транспорт дає клітинам можливість рости на середовищах з низькою концентрацією субстратів — ситуація, звичайна в природі.

Особливості активного транспорту такі:  
 специфічність щодо субстрату; зовні мембрани утворюється комплекс переносник—субстрат;  
 потреба в метаболічній енергії;  
 транспорт субстрату проти градієнта концентрації;  
 вивільнення в цитоплазму немодифікованого субстрату (на відміну від перенесення груп).

Джерелом енергії для процесів активного транспорту є **енергія протонрушійної сили**, яка генерується при перенесенні електронів через мембрану.

Іншим джерелом енергії для забезпечення активного транспорту є **енергія гідролізу АТФ** (енергія, яка виділяється при гідролізі АТФ). Власне кажучи, гідроліз АТФ, який здійснюється АТФ-синтазним ферментним комплексом, супроводжується перенесенням протонів із внутрішнього боку мембрани назовні, завдяки чому також генерується протонрушійна сила. При синтезі та гідролізі АТФ відбувається взаємне перетворення двох форм енергії: енергія протонрушійної сили перетворюється на енергію АТФ (синтез АТФ) і енергія АТФ перетворюється

на енергію протонрушійної сили (гідроліз АТФ). Тому буде правильним сказати, що джерелом енергії для процесів активного транспорту є протонрушійна сила, яка може виникати за рахунок перенесення електронів і гідролізу АТФ.

Згідно з літературними даними, АТФ-залежним є такий активний транспорт, для забезпечення якого використовується енергія (АТФ), яка утворюється на рівні субстратного фосфорилування. Отже, існують два джерела енергії для процесів активного транспорту: енергія протонрушійної сили та енергія АТФ. Відповідно розрізняють  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -залежні та АТФ-залежні механізми активного транспорту.

$\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -**залежний механізм** активного транспорту інакше називають "хіміосмотичним механізмом". Бактеріальні клітини підтримують протонний потенціал, безперервно відкачуючи з клітини протони та інші іони ( $\text{Na}^+$ ). Для цього в мембрані є специфічні транспортні білки. Існують такі різновиди цього механізму (рис. 11.13):

**симпорт** — одночасне та односпрямоване перенесення двох речовин, наприклад, як показано на рис. 11.13, субстрату (А або В) та іона ( $\text{H}^+$  або  $\text{Na}^+$ );

**антипорт** — одночасне зустрічне перенесення двох іонів (наприклад,  $\text{H}^+$  і  $\text{Na}^+$ , або протона та аніона органічної кислоти);

**уніпорт** — перенесення одного іона ( $\text{K}^+$  на рис. 11.13).

У прокариот переважає симпорт з протонном, в еукариот — симпорт з  $\text{Na}^+$ .

Як розрізнити  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ - та АТФ-залежні механізми активного транспорту?  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -залежні механізми до осмотичного шоку, але чутливіми до дії протонофорів (протонофори знімають протонний потенціал на мембрані, причому розсіюють обидві його складові — як граді-

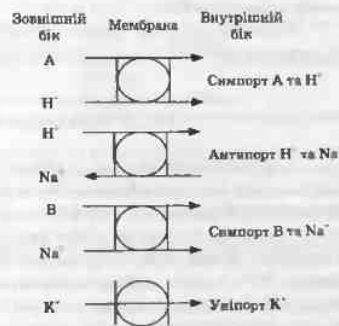


Рис. 11.13. Різні види активного транспорту з використанням енергії протонрушійної сили

єнт рН, так і градієнт електричного заряду), *стійкими до арсенату* (який призводить до вичерпання АТФ у клітині).

#### 11.7.4. Перенесення (транслокація) груп

Цей процес відрізняється від активного транспорту тим, що субстрат з'являється всередині клітини у *хімічно модифікованій формі* — зазвичай у вигляді фосфатного ефіру. У багатьох мікроорганізмів саме так транспортуються цукри. Джерелом енергії у цьому разі є фосфоеноліпурват (енергія, яка виділяється при переведенні ФЕП у піруват, використовується для транспортних процесів).

Процеси транспорту, спряжені з перетворенням субстрату (наприклад, глюкози) на похідні субстрату (глюкозо-6-фосфат), називаються процесами *транслокації*. У *E. coli* такі транспортуються глюкоза, фруктоза, манноза та маніт, а у *Staphylococcus aureus* — лактоза та інші дисахариди. Але фосфотрансферазна система транспорту цукрів властива не всім бактеріям. Багато з них (в основному аероби) використовують для поглинання глюкози систему активного транспорту. Фосфотрансферазна система функціонує здебільшого у факультативних і строгих анаеробів. Для анаеробів ця система має велике значення, бо дає змогу зберегти АТФ.

Є докази того, що пуринові та піримідинові основи також транспортуються шляхом транслокації.

#### 11.7.5. Транспорт заліза

Для транспорту цього макроелемента мікробна клітина має спеціальний механізм. В анаеробних умовах залізо представлене двовалентним іоном ( $Fe^{2+}$ ), його концентрації можуть досягати  $10^{-1}$  моль/л, так що не лімітують ріст мікроорганізмів. Але в аеробних умовах за рН 7,0 залізо має вигляд гідроксидного комплексу  $Fe^{3+}$ , який є майже нерозчинним. Концентрація іонів тривалентного заліза становить лише  $10^{-18}$  моль/л. Тому не дивно, що мікроорганізми здатні синтезувати речовини, які переводять залізо у розчинну форму. Це так звані *сідерофори*. Вони зв'язують іони  $Fe^{3+}$  в комплекс і в такому вигляді транспортують

ють його в клітину. Сідерофори — це низькомолекулярні (молекулярна маса не вище 1500) водорозчинні речовини, за хімічною природою є фенолятами або гідроксаматами.

#### Контрольні запитання до розділу 11

1. Що таке метаболізм? На які етапи можна поділити перетворення речовин у клітині?
2. Дайте визначення поняттю "енергетичний метаболізм". У яких процесах бере участь АТФ? Яке відношення до енергетичного метаболізму мають відновлювальні еквіваленти?
3. Які особливості притаманні ферментам мікроорганізмів?
4. Які ферменти функціонують у мікроорганізмів? Наведіть приклади реакцій.
5. Охарактеризуйте шляхи катаболізму глюкози. Які з них функціонують тільки у мікроорганізмів? Чому КДФГ-шлях рідко зустрічається у анаеробів? Чому пентозофосфатний шлях не є основним шляхом катаболізму глюкози?
6. Які ключові ферменти притаманні кожному з відомих шляхів катаболізму глюкози?
7. Яким чином відбувається катаболізм вуглеводів, відмінних від глюкози? Чому фосфорилази є економічнішими для розщеплення дисахаридів, ніж відповідні гідролази?
8. В яких реакціях може відбуватися окиснення пірувату? У яких мікроорганізмів функціонують ці реакції і чому?
9. Наведіть основні функції циклу трикарбонових кислот у клітині. Для чого необхідні авалеротичні реакції?
10. Охарактеризуйте компоненти дихального ланцюга. Чому флавопротеїни містяться на початку дихального ланцюга, а цитохроми — в кінці?
11. Як утворюється емергія протонірувальної сили? Для реалізації яких клітинних процесів необхідна енергія протонірувальної сили?
12. В яких формах може існувати енергія в клітині? Наведіть механізми синтезу двох форм енергії.
13. Чим відрізняється аеробне дихання від анаеробного?
14. Чим відрізняється активний транспорт від пасивної та полегшеної дифузії?
15. Чим відрізняється активний транспорт субстрату в клітину від транслокації груп? Чому транспорт субстрату перенесенням груп є характерним переважно для анаеробів і факультативних аеробів?
16. Чим відрізняються між собою  $\Delta\mu$ -залежні та АТФ-залежні механізми активного транспорту?
17. Який механізм використовується для транспорту заліза у мікроорганізми?



## 12. МЕТАБОЛІЧНА АКТИВНІСТЬ АЕРОБНИХ ГЕТЕРОТРОФІВ

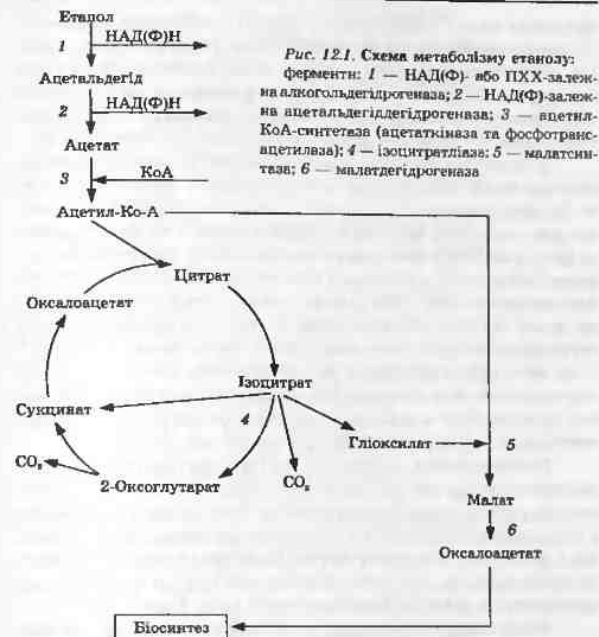
Крім вуглеводів, мікроорганізми здатні асимілювати широкий спектр органічних вуглецевих субстратів: відновлені  $C_1$ -сполуки (метан, метанол),  $C_2$ -сполуки (етанол, ацетат), органічні кислоти, амінокислоти, аліфатичні вуглеводні, ароматичні сполуки та ін. Слід зазначити, що *Pseudomonas putida* може використовувати як єдине джерело вуглецю та енергії будь-яку з 200 різних органічних речовин.

### 12.1. МЕТАБОЛІЗМ $C_2$ -СПОЛУК

#### 12.1.1. Етанол та ацетат як субстрати

Окиснення етанолу. Першим етапом метаболізму етанолу у бактерій є його окиснення до ацетальдегіду, яке здійснюється ферментом *алкогольдегідрогеназою* (рис. 12.1). Відомі два типи алкогольдегідрогеназ: НАД(Ф) - та ПХХ-залежні ферменти. У першому випадку акцептором електронів є НАД<sup>+</sup> або НАДФ<sup>+</sup>, у другому — піролохінолінхінон. ПХХ-залежна алкогольдегідрогеназа виявлена у бактерій роду *Pseudomonas*. Окиснення етанолу у *Acinetobacter calcoaceticus* та *Acetobacter aceti* здійснюється НАД<sup>+</sup>-залежним ферментом. У 90-і роки ХХ ст. у деяких грамположитивних бактерій виявлено новий тип нікотинпротейнових алкогольдегідрогеназ, які використовують N,N-диметил-4-нітрозосанлін як акцептор електронів.

Окиснення ацетальдегіду. Окиснення ацетальдегіду відбувається за участю ферментів *ацетальдегіддегідрогеназ*. У першому випадку НАД(Ф)-залежні ферменти каталізують окиснення ацетальдегіду до ацетату. У другому випадку НАД<sup>+</sup>-залежний фермент (*ацетальдегіддегідрогеназа ацилювальна*) акцептує кофермент А, і з ацетальдегіду утворюється ацетил-КоА (без стадії утворення ацетату). Так, за участю цього ферменту утворюється ацетил-КоА з ацетальдегіду і коферменту А у бактерій *Pseudomonas* sp.



Метаболізм ацетату. Залучення ацетату до метаболізму відбувається двома шляхами: за участю *ацетаткінази* та *фосфотранс-ацетилази* або за допомогою *ацетил-КоА-синтетази*, яка акцептує КоА з утворенням ацетил-КоА (див. рис. 12.1). Для багатьох бактерій, у тому числі *Escherichia coli*, характерна наявність як ацетаткінази, так і ацетил-КоА-синтетази, причому *E. coli* реалізує один з двох шляхів асиміляції ацетату залежно від концентрації цього субстрату в середовищі.

На наступному етапі ацетил-КоА вводить у цикл трикарбонових кислот (див. рис. 12.1).

Гліюксилатний цикл. Виникає запитання: як під час росту на етанолі чи ацетаті відбувається регенерація проміжних

продуктів циклу трикарбонових кислот, необхідних для процесів конструктивного метаболізму? Під час росту на глюкозі такими анаплеротичними реакціями є карбоксилювання пірувату та фосфоенолпірувату. Але під час вирощування на  $C_2$ -субстратах ці реакції функціонувати не можуть, оскільки з етанолу та ацетату прямого утворення фосфоенолпірувату не відбувається.

У цьому разі анаплеротичною послідовністю реакцій є *гліюксилатний цикл*. Його називають також циклом Кребса—Корнберга. Ця анаплеротична послідовність реакцій здійснюється за участю двох ключових ферментів: *ізоцитратліази* та *малатсинтази* (див. рис. 12.1). Ізоцитратліаза розщеплює ізоцитрат на сукцинат і гліюксилат, а малатсинтаза каталізує приєднання гліюксилату до ацетил-КоА з утворенням малату. Отже, у гліюксилатному циклі під дією ізоцитратліази та малатсинтази відбувається перетворення одного моля ізоцитрату і одного моля ацетил-КоА у два моля  $C_4$ -дикарбонових кислот (сукцинат і малат), які далі перетворюються на оксалоацетат. Під час росту на етанолі чи ацетаті оксалоацетат є вихідною сполукою для синтезу вуглеводів, необхідних для процесів конструктивного метаболізму.

**Гліюконеогенез.** Дійсно, під час росту на етанолі чи ацетаті клітинам доводиться не тільки поповнювати витрати проміжних продуктів циклу трикарбонових кислот, що відбувається у гліюксилатному циклі, а й синтезувати глюкозу та її похідні, які є необхідними для конструктивного метаболізму (біосинтезу полісахаридів, нуклеїнових кислот та ін.). Ці перетворення здійснюються шляхом *гліюконеогенезу* (рис. 12.2).

Оксалоацетат перетворюється на фосфоенолпіруват під дією ферменту *фосфоенолпіруваткарбоксикинази*, який є *ключовим ферментом* гліюконеогенезу. А далі проходять реакції гліюколізу, тільки в зворотному напрямку: з ФЕП утворюється фосфогліцерат (ферменти *фосфогліцератфосфомутаза* та *гліцератфосфомутаза*), потім 1,3-дифосфогліцерат (фермент *фосфогліцераткиназа*), триозофосфати — гліцеральдегід-3-фосфат та діоксиацетон (фермент *гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа*) і фруктозо-1,6-дифосфат (фермент *фруктозо-1,6-дифосфатаза*).

Далі спостерігаються відмінності від гліюколізу, зумовлені тим, що у гліюколізі реакції, які каталізуються *фосфогліцераткиназою* та *гексокиназою*, є незворотними. Для їх обходу використовуються інші ферментативні реакції. Так, фруктозо-6-фосфат утворюється з фруктозо-1,6-дифосфату під дією ферменту *гексо-*

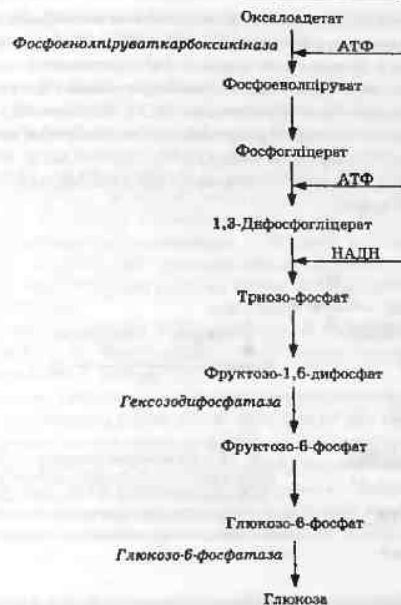


Рис. 12.2. Реакції гліюконеогенезу

*зодифосфатази*, а глюкозо-6-фосфат перетворюється на глюкозу в реакції, яка каталізується *глюкозо-6-фосфатазою*.

### 12.1.2. Гліюксилат і оксалат як субстрати. Гліцератний шлях

Шлях перетворення найбільш окисненої  $C_2$ -сполуки оксалату ( $\text{HOOC}-\text{COOH}$ ) на гліюксилат ( $\text{O}=\text{CH}-\text{COOH}$ ) потребує попереднього відновлення субстрату. Джерелом відновника є процес окиснення частини оксалату до  $\text{CO}_2$  після його декарбокси-

лювання (рис. 12.3). Так, оксалоацетат під дію ферменту *оксалил-КоА-синтетази* перетворюється на оксалил-КоА, який декарбоксилюється з утворенням форміл-КоА (фермент *оксалил-КоА-декарбоксилаза*). Форміл-КоА трансформується у форміат, який окиснюється *форміатдегідрогеназою* до  $\text{CO}_2$ . Утворювані у форміатдегідрогеназній реакції відновлювальні еквіваленти використовуються для відновлення оксалау до гліоксилату. Так, оксалил-КоА відновлюється у гліоксилат під дію ферменту *гліоксилатдегідрогенази*.

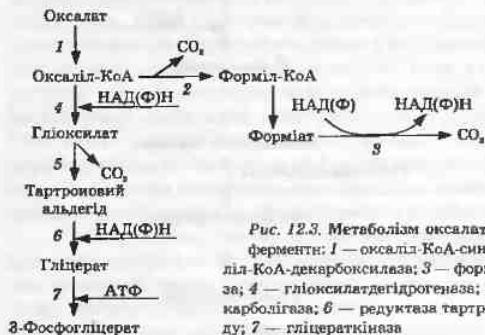


Рис. 12.3. Метаболізм оксалау і гліоксилату: ферменти: 1 — оксалил-КоА-синтетаза; 2 — оксалил-КоА-декарбоксилаза; 3 — форміатдегідрогеназа; 4 — гліоксилатдегідрогеназа; 5 — гліоксилаткарболігеза; 6 — редуктаза тартронового альдеїду; 7 — гліцераткіназа

Коли джерелом вуглецю є гліоксилат (або його попередники — гліколат ( $\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{OH}$ ) чи сечова кислота), індуюються ферменти *гліцератного шляху*.

Дві молекули гліоксилату під дію *гліоксилаткарболігези* перетворюються на тартроновий альдегід з виділенням  $\text{CO}_2$ . Цей альдегід відновлюється за допомогою *редуктази тартронового альдеїду* до гліцерату, який фосфорилується з утворенням 3-фосфогліцерату (фермент *гліцераткіназа*). Із 3-фосфогліцерату звичайним шляхом утворюється ацетил-КоА, який включається у цикл трикарбонових кислот та окиснюється.

Постачання проміжних продуктів, необхідних для конструкторного метаболізму, забезпечує *малатсинтаза*. Вона каталізує реакцію приєднання молекули гліоксилату до ацетил-КоА, в результаті чого утворюється малат. Синтез вуглеводів здійснюється у результаті функціонування реакцій гліоконеогенезу.

## 12.2. РІСТ НА ВІДНОВЛЕНИХ $\text{C}_1$ -СПОЛУКАХ (МЕТАН, МЕТАНОЛ)

Мікроорганізми, які здатні рости на відновлених  $\text{C}_1$ -сполуках (метан, метанол, метиламіни, формальдегід, форміат) називаються *металофрами*. Метилотрофні мікроорганізми можна поділити на кілька фізіологічних груп:

1) *метаноокиснювальні* (або *облігатні метанотрофи*) — бактерії, які облігатно асимілюють тільки метан. Інші джерела вуглецевого живлення є непридатними для їх росту;

2) *облігатні метилотрофи* — бактерії, які використовують тільки метанол (або метиламіни) як джерело вуглецевого живлення. Вони не здатні рости на метані, а також на багатовуглецевих сполуках;

3) *факультативні метилотрофи* — бактерії, які здатні, крім метанолу (чи метиламінів), асимілювати широкий спектр інших органічних субстратів.

Першим виділеним метилотрофом була бактерія, названа *Bacillus methanicus* (1906 р.). У 30-х роках XX ст. вона була знову виділена і на цей раз названа *Pseudomonas methanica* (*Methylobacillus methanica*). Облігатні метанотрофи належать до родів *Methylococcus*, *Methylobacillus*, *Methylocystis*, *Methylosinus*.

Факультативними метилотрофами є дріжджі, бактерії — представники родів *Huphomicrobium*, *Pseudomonas*, *Methylobacterium*.

### 12.2.1. Енергетичний метаболізм метанотрофів

Якщо, що при рості на метані відновлювальні еквіваленти для дихального ланцюга можуть бути одержані тільки окисненням метану ( $\text{CH}_4$ ) до  $\text{CO}_2$ , оскільки в цих умовах не утворюється ацетил-КоА, необхідний для окиснення в ЦТК. Окиснення метану відбувається так:

- $\text{CH}_4 + \text{O}_2 + \text{НАДН} \rightarrow \text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{НАД}$   
(метаномоноксигеназа);
- $\text{CH}_3\text{OH} + \text{X} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{XH}_2$   
(метанолдегідрогеназа);
- $\text{CH}_2\text{O} + \text{X} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{НСООН} + \text{XH}_2$   
(формальдегіддегідрогеназа);
- $\text{НСООН} + \text{НАД} \rightarrow \text{CO}_2 + \text{НАДН}$   
(форміатдегідрогеназа).



Рибулосомонофосфатний цикл. Інша назва цього циклу — *гексулозофосфатний*. Основними реакціями циклу (рис. 12.6) є конденсація рибулозо-5-фосфату та формальдегіду під дією ключового ферменту *гексулозофосфатсинтази* та ізомеризація продукту реакції у фруктозо-6-фосфат. Акцептор (рибулозо-5-фосфат) регенерується під дією ферментів *транскетолази* та *трансальдолази*. У результаті функціонування циклу три молекули формальдегіду перетворюються на молекулу діоксиацетонфосфату, який може використовуватись для конструктивного метаболізму.

Суттєвою особливістю метаболізму метаноокиснювальних бактерій з гексулозофосфатним шляхом є дефект у циклі Кребса — відсутність 2-оксоглутаратдегідрогенази. У зв'язку з цим цикл Кребса відіграє винятково біосинтетичну роль, а анаплеротичною реакцією, в якій синтезуються  $C_4$ -дикарбонові кислоти, є карбоксилювання фосфоенолпірувату. Вуглеводи синтезуються шляхом глюконеогенезу.

Цей шлях асиміляції  $C_1$ -сполук є характерним для бактерій родів *Methylococcus*, *Methylomonas*.



Рис. 12.6. Рибулосомонофосфатний цикл фіксації формальдегіду

### 12.2.3. Факультативні метилотрофи

Для росту на метанолі факультативно метилотрофні бактерії використовують сериновий або рибулосомонофосфатний шлях асиміляції  $C_1$ -сполук. Дріжджі здатні використовувати тільки метанол, але не метан. У деяких дріжджів (*Candida boidinii*, *Hansenula polymorpha*) включення метанолу у клітинну речовину відбувається також через формальдегід, але не через рибулозо-5-фосфат (як у бактерій у рибулосомонофосфатному шляху), а через ксилулозо-5-фосфат. У цьому *ксилулозомонофосфатному циклі фіксації формальдегіду* останній разом з ксилулозо-5-фосфатом перетворюється за допомогою спеціальної *транскетолази* на гліцеральдегідфосфат і діоксиацетон. Обидва продукти (діоксиацетон після фосфорилування) надходять на шляхи синтезу.

### 12.3. КАТАБОЛІЗМ ВИЩИХ $n$ -АЛКАНІВ І ЖИРНИХ КИСЛОТ

$n$ -Алкани — це парафіни, вуглеводні, які містять 10–18 атомів вуглецю. Ріст на парафінах досить поширений серед мікроорганізмів (бактерій — *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas fluorescens*, представники родів *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, дріжджі — *Candida lipolytica*, *Torulopsis colliculosa*, гриби *Cephalosporium roseum*). Вуглеводні — сполуки нерозчинні, і їх поглинання є складним процесом. Дуже часто мікроорганізми, які ростуть на вуглеводнях, синтезують позаклітинні емульгатори або поверхнево-активні речовини, які здатні емульгувати вуглеводні і полегшувати їх транспорт у клітину. Прикладом може бути емульсан — позаклітинний і асоційований з клітинами ліпополісахарид, синтезований *Acinetobacter calcoaceticus*. Емульсан містить у своєму складі до 19 % жирних кислот, завдяки чому є прекрасним емульгатором.

Окиснення вуглеводнів каталізується, як правило, монооксигеназами з утворенням відповідних спиртів. У реакції беруть участь також молекулярний кисень і відновник. Загальне рівняння для реакції цього типу має такий вигляд:



Моноксигенази є поліферментними системами, до складу яких входять гідроксилазний компонент (який і каталізує окиснення вуглеводнів), а також переносники електронів від НАДН і НАДФН (можливі й інші відновники) до гідроксилазного компонента.

Продукти монооксигенування вуглеводів (спирти) окиснюються спочатку до альдегідів, а потім до відповідних жирних кислот за участю дегідрогеназ.

Вищі жирні кислоти розкладаються шляхом  $\beta$ -окиснення. Спочатку жирна кислота перетворюється за допомогою ферменту *ацил-КоА-синтетази* на відповідний складний ефір коферменту А. Далі КоА-ефір окиснюється по  $\beta$ -положенню (фермент *ацил-КоА-дегідрогеназа*) і розщеплюється з утворенням ацетил-КоА та КоА-ефіру жирної кислоти, скороченої на два вуглецевих атоми. При цьому відновлюється одна молекула НАД та молекула ФАД. Потім цикл  $\beta$ -окиснення повторюється до повного розпаду жирної кислоти.

У результаті розпаду жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю утворюється тільки ацетил-КоА. Тому мікроорганізмам, які ростуть на таких субстратах, потрібен гліколітичний цикл як анаплеротична послідовність і глюконеогенез для синтезу вуглеводів для конструктивного метаболізму.

У випадку жирних кислот з непарною кількістю атомів вуглецю кінцевий цикл  $\beta$ -окиснення дає ацетил-КоА та пропіоніл-КоА. Пропіоніл-КоА може залучатися до подальшого метаболізму двома шляхами:

- 1) перетворення на сукциніл-КоА складається з трьох реакцій. Такий шлях обміну пропіоніл-КоА виявлений у різних тканинах тварин, у ризобій, *Paracoccus denitrificans*;
- 2) перетворення пропіоніл-КоА на пірватид через акриліль-КоА та лактил-КоА. Такий шлях характерний для *E. coli*.

## 12.4. КАТАБОЛІЗМ БІЛКІВ ТА АМІНОКИСЛОТ

Як і інші високомолекулярні сполуки, білки спочатку розкладаються прозаклітинними протезазами на фрагменти, які здатні легко проникати у клітину — пептиди, олігопептиди та частково амінокислоти (рис. 12.7). Пептиди надходять у клітину і гідролізуються внутрішньоклітинними пептидазами



Рис. 12.7. Розпад білків і можливі подальші перетворення амінокислот

до амінокислот. Амінокислоти або використовуються клітиною для синтезу білка, або піддаються перетворенням, у результаті яких вони дезамінуються і після цього залучаються до проміжного обміну.

Розпад білків у ґрунті супроводжується утворенням аміну. Відбувається мінералізація азоту, або амоніфікація. У розкладі білків беруть участь гриби та бактерії.

Першою реакцією катаболізму амінокислот є *декарбоксилювання*, *дезамінування* або *трансамінування*. У результаті дезамінування та трансамінування амінокислоти перетворюються на відповідні оксокислоти:

Глутамат  $\rightarrow$  2-Оксоглутарат.

Аспартат  $\rightarrow$  Оксалоацетат.

Аланін  $\rightarrow$  Пірват.

Валін  $\rightarrow$  2-Оксоізовалеріанат.

Лейцин  $\rightarrow$  2-Оксоізокапроат.

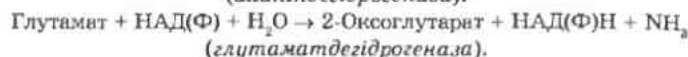
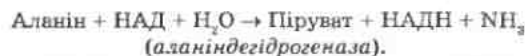
Ізолейцин  $\rightarrow$  2-Оксо-3-метилвалеріанат.

*Декарбоксилювання* відбувається переважно у кислому середовищі. У результаті декарбоксилювання амінокислот утворюється  $\text{CO}_2$  і первинні аміни (які називаються також "біогенними" амінами). З них найбільш відомими є кадаверин, путресцин і агматин (раніше їх називали трупною отрутою); вони утворюються відповідно з лізину, орнітину та аргініну. Первинні аміни виявляються у звичайних гнильних процесах у кишечнику та інших анаеробних процесах розпаду білків.



Під *дезамінуванням* розуміють відщеплення аміаку від амінокислоти. Залежно від частки вуглецевого скелета амінокислоти розрізняють *окиснювальне дезамінування*, *гідролітичне дезамінування* та *дезамінування, яке супроводжується утворенням ненасичених сполук*.

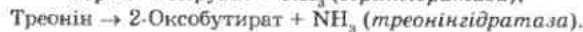
*Окиснювальне дезамінування* — найпоширеніший тип розпаду амінокислот. Відбувається за участю НАД(Ф)-залежних дегідрогеназ:



*Дезамінування, яке супроводжується утворенням ненасиченої сполуки:*

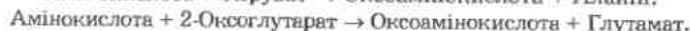
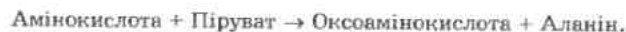


*Гідролітичне дезамінування* відбувається за участю гідратаз:



Утворений 2-оксобутират окиснюється далі мультиферментним комплексом, схожим на піруватдегідрогеназний комплекс, з утворенням пропіоніл-КоА.

При *трансамінуванні* аміногрупа амінокислоти переноситься на 2-оксокислоту. Трансамінування каталізують *трансамінази*. Як акцептор аміногрупи служать, наприклад, піруват і 2-оксеглутарат:



## 12.5. КАТАБОЛІЗМ АРОМАТИЧНИХ СПОЛУК

Рослини синтезують багато сполук, які містять ароматичні кільця. Кількісно серед них переважає лігнін — до 20 % деревини (за масою). Здатність розщеплювати такі сполуки з розривом ароматичного кільця притаманна багатьом бактеріям і грибам. Для розщеплення ароматичних сполук необхідна присутність молекулярного кисню.

Поліциклічні сполуки (нафталін, фенантрен, антрацен) спочатку дегридує до ароматичних сполук (рис. 12.8). Більшість природних ароматичних сполук розщеплюється спочатку до пірокатехіну або до протокатехової кислоти, які піддаються діоксигенуванню (полівійному окисненню).

Перед розривом ароматичного кільця відбувається його монооксигенування, яке каталізується *монооксигеназами* (гідро-

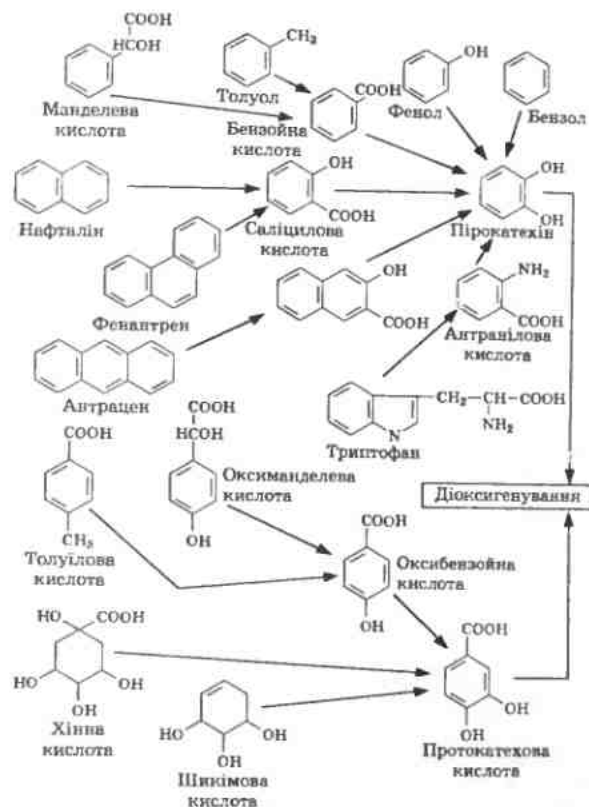


Рис. 12.8. Шляхи розпаду деяких ароматичних амінокислот

ксилазами) з використанням енергії відновника та залученням молекулярного кисню.

Можливі замісники ароматичного кільця відщеплюються перед його розривом. Розрив ароматичного кільця каталізується *оксиеназами* і розрив відбувається *орто*- або *мета*-розщепленням (рис. 12.9).

При *орто*-розщепленні пірокатехін перетворюється на *цис,цис*-муконову кислоту, а протокатехова кислота — на 3-карбокси-*цис,цис*-муконову кислоту.

При *мета*-розщепленні пірокатехін перетворюється на 2-оксимуконовий напівальдегід, а протокатехова кислота — на 4-карбокси-2-оксимуконовий напівальдегід.

Ще одним проміжним продуктом при розщепленні ароматичних сполук є гентизинова кислота. При розриві її ароматичного кільця утворюється малеїлпіровиноградна кислота (див. рис. 12.9).

Далі малеїлпіровиноградна кислота розщеплюється до фумарату, малату та пірувату. 2-Оксимуконовий напівальдегід деградує до форміату, ацетальдегіду та пірувату, 4-карбокси-2-оксимуконовий напівальдегід — до двох молекул пірувату та молекули форміату. *Цис,цис*-муконова та 3-карбокси-*цис,цис*-муконова кислоти трансформуються до ацетил-КоА і сукцинату.

Підсумкові дані метаболічної активності аеробних гетеротрофів наведені у таблиці.

## 12.6. НЕПОВНІ ОКИСНЕННЯ

Більшість аеробних мікроорганізмів у процесі дихання окиснюють органічні поживні речовини до  $\text{CO}_2$  та води. Оскільки в молекулі  $\text{CO}_2$  досягається найвищий ступінь окиснення вуглецю, то відбувається *повне окиснення*. Цей тип дихання відрізняють від *неповних окиснень*, за яких як продукти обміну виділяються частково окиснені органічні сполуки.

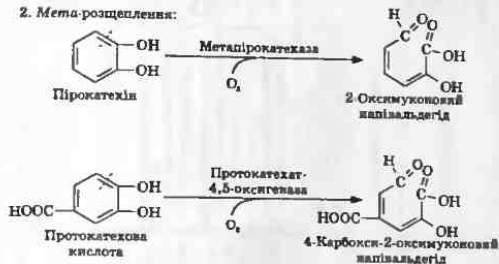
Кінцевими продуктами неповних окиснень можуть бути оцтова, глюконова, фумарова, лимонна, молочна кислота та інші сполуки. Оскільки ці продукти подібні до тих, що утворюються у процесі бродіння, неповні окиснення називають «*окиснювальним бродінням*».

Неповні окисненнями в біотехнології є такі важливі процеси, як утворення органічних кислот бактеріями та гриба-

### 1. Орто-розщеплення:



### 2. Мета-розщеплення:



### 3. Розщеплення через гентизинову кислоту:

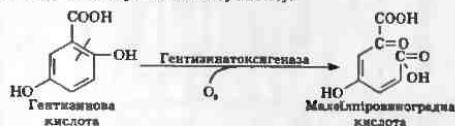


Рис. 12.9. Три типи розриву ароматичного кільця

Метаболічна активність аеробних гетеротрофів

Субстрат	Шлях метаболізму	Ключові ферменти	Енергетичні метаболіти (НАДФ, НАДН, дихальний ланцюг)	Конструктивний метаболізм	
				Анаплеротичні реакції для синтезу С <sub>4</sub> -дикарбонових кислот	Гліко-неогенез
Вуглеводи (гексози)	Гліколіз	фосфофруктокіназа	ЦТК	Карбоксилювання пружує та фосфоенолпируват	Немає
	КДЛФ-шлях	6-Фосфоглюконатдегідратаза; 2-мето-3-дезоксис-6-фосфоглюконатальфадеза	ЦТК	Те саме	Немає
	Розщеплення через глюкозат	НАДФ- або ПХХ-залежні глюкозатдегідрогенази	ЦТК, окиснення глікогену	- -	Немає
Етанол	Окиснення через ацетальдегід (АА) та ацетат до ацетилю КоА	НАДФ- або ПХХ-залежні алкогольдегідрогенази	Окиснення ацетилю, АА, ЦТК, гліоксидатний цикл	Глюксидатний цикл	Є
Ацетат	Утворення ацетилю-КоА	Ацетаткіназа, ацетилю-КоА-синтетаза	ЦТК, глюксидатний цикл	- -	Є
Окислат, глюксидат	Гліцератний шлях	Глюксидаткарбоксилаза	ЦТК	Утворення малату з глюксидату та ацетилю-КоА (малатасина-тоа)	Є
Метан, метанол	Окиснення до НСОН (далі — серіновий шлях)	Серинтринсоксиметиліаза; оксипіруватредуктаза	Окиснення метану та метанолу до СО <sub>2</sub>	Реакція, для каталізується ізоцитрат-піаю	Є

Закінчення

Субстрат	Шлях метаболізму	Ключові ферменти	Енергетичні метаболіти (утворення НАДН для дихального ланцюга)	Конструктивний метаболізм	
				Анаплеротичні реакції для синтезу С <sub>4</sub> -дикарбонових кислот	Глюко-неогенез
Метан, метанол	Окиснення до НСОН (далі — гексулозофосфатний шлях)	Гексулозофосфаткіназа	Окиснення метану та метанолу до СО <sub>2</sub>	Карбоксилювання фосфоенолпируват	Є
Аліфатичні та жирні кислоти	Окиснення в алкані до жирних кислот; β-окиснення жирних кислот	Моноксигенази; ацетилю-КоА-синтетази	ЦТК, β-окиснення жирних кислот	Глюксидатний цикл	Є
Ароматичні, ністолує	Трансформация до пірокатехіну та протокатехінової кислоти з наступним глюксидатним циклом (прото- та метакатехінової кислоти)	Прокатехілаза; протокатехін-3,4-оксигеназа; Металіпрокатехілаза; протокатехін-4,5-оксигеназа	ЦТК	Карбоксилювання пружує; глюксидатний цикл	Є
	Трансформация до гентіанінової кислоти	Гентіанінокіназа	ЦТК	Карбоксилювання пружує; глюксидатний цикл	Є

ми; утворення амінокислот бактеріями; трансформація речовин мікроорганізмами; утворення вторинних метаболітів (антибіотиків, полісахаридів, вітамінів, лектинів та ін.).

### 12.6.1. Утворення оцтової кислоти та оцтовокислих бактерій

Усім оцтовокислим бактеріям притаманна здатність утворювати кислоти неповним окисненням цукрів або спиртів. Оцтовокислі бактерії — це грамнегативні палички з перитрихально (*Acetobacter*) чи полярно (*Gluconobacter*) розміщеними джгутиками, які здатні до деякої рухливості. Характеризуються високою стійкістю до кислот. У природних умовах вони, як правило, існують на рослинах. Серед оцтовокислих бактерій розрізняють групи *peroxydans* і *suboxydans*. Група *peroxydans* — організми, які накопичують кислоту тільки як проміжний продукт. Типовим представником є *Gluconobacter oxydans*. У організмів групи *suboxydans* оцтова кислота не піддається подальшому окисненню (*Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianum*). Між цими двома групами існує багато проміжних форм, які здатні окиснювати оцтову кислоту дуже повільно. Більшість оцтовокислих бактерій потребує для росту складних поживних середовищ.

Оцтовокислі бактерії здатні рости на середовищі з етанолом. Етанол окиснюється НАД<sup>+</sup>-залежними алкоголь- та ацетальдегіддегідрогеназами з утворенням ацетату та двох молекул НАДН. Утворений НАДН використовується для одержання АТФ у дихальному ланцюгу. Крім етанолу, оцтовокислі бактерії окиснюють велику кількість інших спиртів до відповідних кислот і кетонів:

Пропанол → Пропіонат.  
Ізопропанол → Ацетон.  
Гліцерин → Діоксиацетон.  
Глюкоза → Глюконат.  
Глюконат → 5-Оксоглюконат.

Ці організми не здатні до синтезу катаболічних ферментів, необхідних для високоактивного розщеплення цих субстратів. У результаті кислоти й спирти виділяються у середовище. Оцтовокислі бактерії характеризуються наявністю ПХХ-залежної глюкозодегідрогенази.

Особливий інтерес викликає здатність оцтовокислих бактерій окиснювати D-сорбітол до L-сорбіози. Сорбіоза потрібна у великих кількостях для синтезу вітаміну С.

### 12.6.2. Утворення кислот грибами

Для грибів характерним є окиснювальний тип метаболізму. Та це не означає, що вони не здатні до анаеробного розщеплення вуглеводів, тобто не можуть їх збродувати (спиртове бродіння здійснюється якраз дріжджами!), але в анаеробних умовах тривалий ріст грибів неможливий.

У природних місцях існування грибів ніколи не накопичуються проміжні продукти їх життєдіяльності. За браком поживних речовин гриби одержують максимум енергії та утворюють клітинні речовини за рахунок повного окиснення та асиміляції субстратів. У лабораторних і промислових умовах для синтезу органічних кислот грибам створюють умови, які "дезорганізують" їх метаболізм. Такими умовами є надлишок вуглеводного субстрату та вилучення з поживного середовища деяких мікроелементів (залізо, марганець, мідь, магній, калій, кальцій).

Часткова інформація про утворення органічних кислот грибами наведена у розд. 8.

**Молочну кислоту** утворюють переважно представники порядку *Mucorales* (*Rhizopus oryzae*, *Rhizopus nigricans*). Проте у грибів молочна кислота не єдиний продукт, як у гомоферментативних молочнокислих бактерій. Крім молочної, у невеликих кількостях утворюються фумарова, бурштинова, яблучна, мурашина, оцтова кислоти та етанол. Для максимального виходу молочної кислоти необхідна присутність кисню.

Представники порядку *Mucorales* здатні також до утворення **фумарової кислоти**.

**Глюконову кислоту** синтезують аспергіли та пеніцили. Глюконова кислота є продуктом ферментативного окиснення глюкози позаклітинною глюкозооксидазою.

**Щавлеву кислоту** синтезують багато грибів. Її утворенню сприяє лужна реакція поживного середовища.

Промисловим продуцентом **лимонної кислоти** є *Aspergillus niger*. Оптимальним рН для її утворення є 2,5–3,5. За підвищення рН починає утворюватись глюконова, а потім — щавлева кислоти. Найвищий вихід кислоти можна одержати в умовах, коли залізо та цинк присутні в лімітувальних концентраціях.

Ітаконову кислоту утворюють небагато штамів (*Aspergillus itaconicus*, *Aspergillus terreus*).

Механізм утворення кислот у грибів. В утворенні різних кислот з глюкози беруть участь реакції циклу трикарбонових кислот (рис. 12.10).

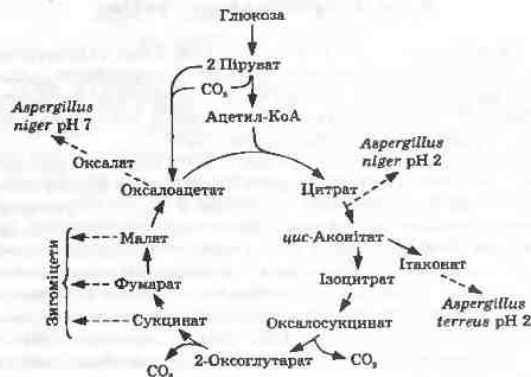


Рис. 12.10. Утворення органічних кислот у грибів

Яблучна (малат), фумарова, бурштинова (сукцинат), лимонна (цитрат) кислоти утворюються безпосередньо у ЦТК і виділяються в середовище. Щавлева кислота (оксалат) утворюється в результаті гідролізу оксалоацетату (фермент *оксалоацетатгідролаза*). Попередником ітаконові кислоти є *цис*-аконітат, його декарбоксилювання приводить до утворення ітаконові кислоти.

Якщо проміжні продукти (у даному разі органічні кислоти) видаляються з циклу, то повинні функціонувати анаплотичні реакції, які забезпечують ЦТК оксалоацетатом. Такою реакцією є карбоксилювання пірувату з утворенням оксалоацетату.

### 12.6.3. Утворення амінокислот бактеріями

У 1957 р. японець С. Кіносіта виділив *Corynebacterium glutamicum* і тим самим відкрив нову епоху в промисловому використанні

процесів неповного окиснення. Ця бактерія є продуцентом *L*-глутамінової кислоти. Катаболізм глюкози йде за гліколітичним шляхом, далі через цитрат і 2-оксoglutarат утворюється глутамат. Утворення глутамату залежить від накопичення 2-оксoglutarату, зумовленого відсутністю у бактерій *2-оксoglutarатдегідрогенази*. Якщо в середовищі немає іонів амонію, виділяється 2-оксoglutarат. Анаплотичною реакцією, яка постачає ЦТК оксалоацетатом, є карбоксилювання пірувату. Штами *Corynebacterium glutamicum* та *Brevibacterium divaricatum* виділяють *L*-глутамінову кислоту за певних фізіологічних умов — ліміту в середовищі біотину. Концентрація біотину (1–5 мкг/л) в середовищі є вирішальним фактором для синтезу глутамату. За такої концентрації біотину в клітинній мембрані відбуваються структурні та функціональні зміни, проникність мембрани для глутамінової кислоти збільшується, амінокислота виділяється з клітин. Аналогічна дія характерна для деяких антибіотиків і поверхнево-активних речовин. Мутанти, які не мають 2-оксoglutarатдегідрогенази, на середовищі з лімітом біотину синтезують до 50 г/л глутамінової кислоти.

Пролін належить до родини глутамінової кислоти і утворюється в результаті АТФ-залежного відновлення останньої. Використання прототрофних мутантів *Corynebacterium glutamicum* дає змогу одержати більше 25 г/л проліну. Для вирощування таких мутантів використовують середовища з підвищеним вмістом біотину (не 5 мкг/л, як для утворення глутамінової кислоти, а 1000 мкг/л). У таких умовах глутамінова кислота не виділяється з клітин, а перетворюється на пролін.

Ауксотрофні мутанти (гістидинові, метіонінові, лейцинові, ізолейцинові) бактерій роду *Brevibacterium* синтезують до 20–25 г/л проліну. У таких мутантів інгібовані або репресовані активності ключових ферментів відповідних шляхів, що створює надлишок у клітині як вуглецевих попередників, так і АТФ, яка підвищує активність *глутаматкінази* — першого фермента біосинтезу проліну.

Для одержання інших амінокислот використовуються інші ауксотрофні мутанти *Corynebacterium glutamicum*, а також види роду *Brevibacterium*. Так, мутанти, які потребують гомосерину, є продуцентами лізину. Інші мутанти *Corynebacterium glutamicum*, а також представники родин *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae* є продуцентами гомосерину, валіну, триптофану, тирозину та інших амінокислот.

### 12.6.4. Трансформація речовин мікроорганізмами

Висока специфічність окиснень, які здійснюються окисними бактеріями, досить високий вихід продуктів і велике промислове значення таких процесів (наприклад, виробництва сорбіти) спричинили з 30-х років ХХ ст. активне вивчення мікробіологами каталітичних властивостей мікроорганізмів, їх здатності переробляти властиві та сторонні для них речовини.

Область синтетичного використання мікроорганізмів можна умовно поділити на два напрями:

1) повний біосинтез мікроорганізмами промислово важливих біологічно активних сполук (антибіотиків, ферментів, амінокислот, вітамінів та ін.), який здійснюється клітинами з компонентів поживного середовища;

2) мікробіологічні трансформації, тобто спільне використання окремих хімічних і мікробіологічних етапів у багатостадійному цілеспрямованому синтезі лікарських препаратів та інших практично корисних продуктів.

У наш час прийнято класифікацію мікробіологічних трансформацій за типом виникнення і відщеплення функціональних груп. Основні процеси мікробіологічної трансформації такі: відновлення, декарбоксилювання, дезамінування, утворення глікозидів, гідроліз, метилювання, етерифікація, дегідрування, конденсація, амінування, ацетилювання, галогенування, рацемізація, ізомеризація та ін. Ці біологічні перетворення до того ж є стереоспецифічними. Здійснювати їх здатні актиноміцети та інші бактерії, а також гриби.

Особливо великих успіхів вдалося досягти при використанні мікроорганізмів для синтезу стероїдів. Хімічний синтез кортизону і гідрокортизону має 30 етапів. За допомогою мікроорганізмів процес ведуть у 13 етапів. Найважчим етапом синтезу є введення гідроксильної групи в положення 11 стероїдного скелета. Цей етап здатні здійснювати гриби (*Rhizopus*), а також стрептоміцети.

Прикладом реакції приєднання може бути утворення фенілацетилкарбінолу — важливого проміжного продукту для синтезу ефедрину. Виявилось, що бензальдегід, добавлений у процес бродіння у культуру дріжджів, ацетилюється і перетворюється на фенілацетилкарбінол.

Прикладом керованого ферментативного розщеплення речовин за допомогою мікроорганізмів є виробництво 6-амінопеніциламової кислоти. Деякі бактерії та гриби, які містять специфічні ацилази, розщеплюють природні пеніциліни з утворенням 6-амінопеніциламової кислоти, яка може використовуватись як вихідна речовина для отримання напівсинтетичних пеніцилінів.

### 12.6.5. Утворення вторинних метаболітів

З відкриттям пеніциліну та інших антибіотиків виникла нова галузь промислової мікробіології. Мікроорганізми є продуцентами ряду вторинних метаболітів.

#### 12.6.5.1. Синтез антибіотиків

Ще у ХІХ ст. було відомо, що між різними мікроорганізмами можуть існувати як симбіотичні (взаємовигідні), так і антагоністичні відносини. Антагонізм — взаємодія двох організмів, за якої один пригнічує життєдіяльність іншого. Поштовхом до з'ясування матеріальної основи антибіозу було спостереження А. Флемінга, який у 1928 р. виявив, що колонія гриба *Penicillium notatum* пригнічувала ріст стафілококів. З тих пір було виявлено багато речовин з антибіотичною активністю. Антибіотики — це речовини біологічного походження, здатні навіть у низьких концентраціях пригнічувати ріст мікроорганізмів. Розрізняють речовини, що пригнічують ріст мікроорганізмів (бактеріостатичні, фунгістатичні), і такі, що їх вбивають (бактерицидні, фунгіцидні).

Продуцентами антибіотиків є гриби з групи аспергіїв, актиноміцети (стрептоміцети), а також деякі бактерії (бацили). Нині відомо понад 2000 антибіотиків, але тільки близько 50 з них використовуються як хіміотерапевтичні засоби.

Яке значення мають антибіотики для організмів-продуцентів? До утворення антибіотиків ведуть біохімічні шляхи, які належать до вторинного метаболізму. Ці шляхи та ферменти, які їх забезпечують, не є необхідними для росту та виживання клітин. Генетичний апарат, необхідний для синтезу антибіотиків, у разі їх непотрібності для організму, став би баластом, і організм звільнився б від нього в процесі еволюції. Оскільки в при-



роді зберігається лише те, що є доцільним, потрібно бачити в антибіотиках речовини, які забезпечують їх продуцентам селективні переваги і в природних умовах існування (наприклад, перевага у конкуренції за один і той самий ростовий субстрат).

Найважливіші антибіотики, використовувани в медицині. Перше місце все ще посідають **пеніциліни** (продуценти *Penicillium notatum*, *Penicillium chrysogenum* і деякі інші гриби), що належать до групи  $\beta$ -лактамних антибіотиків. Одержують також напівсинтетичні пеніциліни розщепленням природних пеніцилінів до 6-амінопеніциллавної кислоти, до якої потім хімічним шляхом приєднують різні бокові групи — метицилін, карбеніцилін, ампицилін, фенетицилін та ін. Багато бактерій синтезують фермент **пеніциліназу**, який розщеплює  $\beta$ -лактамне кільце та інактивує пеніцилін. Проте ряд напівсинтетичних пеніцилінів не розкладаються пеніциліназами. Оскільки напівсинтетичні пеніциліни є стійкими до дії кислот, вони можуть вводитись в організм перорально.

**Цефалоспори́ни** — продукти одного з видів гриба *Cephalosporium*. Цефалоспорин С має  $\beta$ -лактамове кільце і за своєю структурою схожий з пеніцилінами. Одержують напівсинтетичні цефалоспори́ни (цефалотин, цефалоридин), які за своєю дією схожі на похідні пеніциліну.

**Стрептоміци́н** був уперше виділений з культури *Streptomyces griseus*, але його синтезують і інші види *Streptomyces*. Успіх використання стрептоміцину зумовлений його дією на ряд кислотостійких і грампозитивних бактерій, нечутливих до пеніциліну. Проте стрептоміцин викликає у хворих різко виражені алергічні реакції. Цей антибіотик застосовується також у ветеринарії і для боротьби з захворюваннями рослин.

**Хлороміцетин** (хлорамфенікол, левоміцетин) вперше виявлений у культурах *Streptomyces venezuelae*, але його можна одержати і синтетичним шляхом. Він надзвичайно стабільний і діє на більшість грампозитивних бактерій, у тому числі на спірохети, рикетсії, а також на актиноміцети і великі віруси.

**Тетрациклі́ни** також являють собою метаболіти стрептоміцетів (*Streptomyces aureofaciens*). Хімічно тетрацикліни (хлортетрациклін, окситетрациклін і тетрациклін) близькі між собою і мають в основі структури нафтацен. Відзначаються широким спектром дії.

До **макроліди́в** належать антибіотики різного походження з відносно великою молекулярною масою, для яких характер-

ним є макроциклічне лактонове кільце (еритроміцин, карбаміцин А, пікроміцин).

**Актиноміци́н** був виділений у 1940 році. Це перший антибіотик, виявлений серед стрептоміцетів.

**Поліпепти́дні антибіоти́ки** (граміцидин S, поліміксини, бацитрацин та ін.) характеризуються високим спорідненням до плазматичної мембрани, тому є однаково токсичними як для про-, так і еукаріот. У клінічній практиці не застосовуються. Завдяки своїй здатності вибірково транспортувати іони через мембрану поліпептидні антибіотики використовують у дослідній роботі як іонофори. Вальноміцин, наприклад, полегшує транспортування калію через мембрану. Додавання вальноміцину до клітинної суспензії призводить до втрати клітинами іонів калію.

#### 12.6.5.2. Мікотоксини

Серед мікотоксинів слід відзначити **стахіботриотоксини** — комплекс токсинів, що утворюються грибом *Stachybotrys alternans*, **дендротоксини** — токсини, що синтезуються грибом *Dendrodochium toxicum*, **спорофузаріотоксини**, що утворюються грибом *Fusarium sporotrichiella*. За хімічною природою стахіботриотоксин є стероїдом, дендротоксини та спорофузаріотоксини належать до трихотеценів. **Афлатоксини** синтезуються грибами групи *Aspergillus flavus-oryzae*. Афлатоксини є похідними дегідрофурану (кумарину).

#### 12.6.5.3. Мікробні екзополісахариди

Практична значущість ЕПС зумовлена їх спроможністю в невисоких концентраціях істотно змінювати реологічні характеристики водних систем. Різноманітність фізико-хімічних властивостей мікробних полісахаридів зумовлює їх використання в нафтодобувній, харчовій, фармакологічній, хімічній промисловостях, сільському господарстві, медицині.

Згідно з класифікацією англійського вченого І. Сазерленда мікробні ЕПС належать до п'яти груп.

**Перша група** містить декстрини і споріднені полісахариди (левани, мути). Вони складаються з моносахаридів одного

типу, тобто є гомополісахаридами. Синтез цих ЕПС здійснюється на середовищах, що містять сахарозу як специфічний субстрат. За відсутності такого специфічного субстрату (крім сахарози, це можуть бути інші споріднені вуглеводи) утворення ЕПС не визначається. Продуцентами ЕПС першої групи є представники родів *Streptococcus* і *Leuconostoc*. Декстран ( $\alpha$ -D-глюкан) продукується бактеріями *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus viridans*. Декстран використовується як заміник плазми, а також для аналітичних досліджень у хімії та біології. Незважаючи на те що промисловий випуск декстрану існує з 40-х років ХХ ст., його частка на ринку мікробних ЕПС є відносно невисокою.

Для утворення ЕПС другої групи також необхідна наявність специфічного вуглецевого субстрату, проте синтезовані ЕПС є гетерополісахаридами. Нині встановлено утворення такого ЕПС жовтозбарвленою псевдомонадою.

До **третьої групи** належать гомополісахариди, що синтезуються на різних вуглецевих субстратах. Деякі з цих гомополісахаридів складаються лише з вуглеводів, наприклад бактеріальна целюлоза або пуллан (продуцент *Aureobasidium pullulans*), інші вміщують ацетильні групи (наприклад, ЕПС, синтезовані певними видами *Agrobacterium*).

**Курдлан** —  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)-глюкан — синтезується бактеріями *Alcaligenes faecalis* і *Agrobacterium radiobacter*. Цей полісахарид при нагріванні до 54 °С утворює гель, який, на відміну від агарових, зберігає свою структуру в широкому діапазоні температур (від 18 до 80 °С). Курдлан характеризується надзвичайною стійкістю до кислотної обробки. Завдяки цим властивостям курдлан використовують у харчовій промисловості, а також для приготування мікробіологічних середовищ.

**Четверта група** мікробних ЕПС найчисленніша. Її представники являють собою гетерополісахариди, які складаються із структур з повторюваними блоками. До цієї групи належить найбільш досліджений мікробний ЕПС — ксантан, а також промислово цінні ЕПС — гелан і емульсан.

До складу **ксантану** (продуцент *Xanthomonas campestris* NRRL В-1459) входять залишки D-глюкози, D-манози, D-глюкуронової кислоти у співвідношенні 2,8:2,0:2,0. Крім того, ЕПС містить близько 4,7 % O-ацетильних груп і близько 3 % залишків шкварової кислоти, зв'язаних із залишками глюкози

в бокових ланцюгах у вигляді циклічного кеталю. Ксантан вперше був описаний у 60-х роках ХХ ст. В Інституті мікробіології і вірусології НАН України селекціоновано штам *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8162, який синтезує біополімер, авалогічний ксантану.

Розчиням ксантану притаманна висока в'язкість за низьких концентрацій, яка залишається постійною в широкому діапазоні рН і не залежить від температури та наявності солей у розчині. Основні характеристики ксантану уможливають його використання в нафтодобуванні, а також у виготовленні харчових продуктів.

Новим полісахаридом з унікальними властивостями є **етаполан** (розробка Інституту мікробіології і вірусології НАН України).

Комплексний полісахаридний препарат етаполан, синтезований штамом бактерій *Acinetobacter* sp. 12S, складається з нейтрального і двох кислих ЕПС, один з яких є ацильованим. Нейтральний ЕПС є міноним компонентом. Ацильований і неацильований полісахариди ідентичні за молярним співвідношенням D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової і шкварової кислот (3:2:1:1:1:1) і структурою повторюваної одиниці вуглеводного ланцюга. Різниця між цими ЕПС полягає в тому, що ацильований полісахарид вміщує жирні кислоти (C<sub>12</sub>—C<sub>18</sub>). Реологічні властивості розчинів етаполану (здатність до емульгування, підвищення в'язкості в присутності одно- і двовалентних катіонів, при зниженні рН, в області низьких швидкостей зсуву, у системі Ca<sup>2+</sup>-гліцин) визначаються співвідношенням у його складі ацильованого і неацильованого компонентів, а також вмістом жирних кислот в ацильованому полісахариді.

Етаполан є полісахаридом багатофункціонального призначення і може бути використаний у нафтодобувній, харчовій, хімічній промисловостях як загущувальний, стабілізувальний, емульгувальний та суспендувальний агент. На основі етаполану розроблено спосіб ізоляції припливу пластових вод, який дає можливість при застосуванні 1 т етаполану видобути додатково до 240 т нафти та знизити її обводнення з 84 до 15 %. З використанням етаполану як головної складової частини розроблені технології виготовлення косметичних кремів за загальною назвою "Екол", технічного мийного засобу "БІМС-1". Завдяки спроможності адсорбувати та виводити з організму солі важких металів, етаполан може входити до рецептури хлібопродуктів, рекомендованих для профілактичного харчування.

**Гелан** — гетерополісахарид, синтезований *Pseudomonas elodea* ATCC 31461. Він складається з тетрасахаридних повтворюваних одиниць, що містять залишки глюкози, рамнози, глюкуронової кислоти і О-ацетильні групи. Гелан існує у вигляді трьох форм — нативний, низькоацетильований і низькоацетильований освітлений. Низькоацетильований гелан одержують нагріванням нативного гелану за рН 10. Після охолодження гелан утворює тверді гелі, стійкість яких залежить від концентрації гелану і наявності в розчині солей. Гелан за торговою назвою "Тельрит" використовується як гелеутворювальний агент для приготування мікробіологічних середовищ. У порівнянні з агаром "Тельрит" має такі переваги: стабільність під час багаторазового автоклавування; інертність до більшості добавок, які є компонентами біологічних ростових середовищ; стійкість до ферментативної деградації; більш висока прозорість; нижча токсичність щодо чутливих мікроорганізмів. Висока температура плавлення геланових гелів дає можливість використовувати цей ЕПС у харчових продуктах, які піддаються тепловій обробці.

**Емульсан** є мікробним ЕПС, який одержують у промисловому масштабі на основі нехарчової сировини — етанолу. Емульсан складається з N- і О-ацильованих залишків D-галактозаміну, D-глюкози і аміноуронової кислоти. О-ацильна частина емульсану вміщує 5–19 % залишків жирних кислот. Вміст білка в емульсані становить 5–15 %. Розчиняючи емульсан у притаманній емульгувальній властивості, що зумовило його використання в нафтовій промисловості для підвищення нафтовидобутку.

До **п'ятої групи** мікробних ЕПС належить бактеріальний альгінат. Цей гетерополісахарид складається з мономерів двох типів: D-мануронової і L-гулууронової кислот. На відміну від ЕПС четвертої групи, в альгінаті немає повтворюваних одиниць. Продуцентами альгінату є *Pseudomonas aeruginosa* і *Azotobacter vinelandii*. Бактеріальний альгінат відрізняється від альгінату з морських водоростей наявністю О-ацетильних груп, приєднаних до D-мануронової кислоти. Мікробні альгінати використовуються в харчовій промисловості як заміники водоростевих альгінатів.

#### 12.6.5.4. Лектини мікробного походження

Лектини — це вуглеводз'язувальні білки, які характеризуються певною вуглеводною специфічністю. Здатні взаємо-

діяти з певним вуглеводом — фундаментальна характеристика лектинів. Лектини використовуються як лікарські препарати, діагностичними та аналітичними реагентами. Найбільш вивченими біологічними реакціями, що відбуваються за участю лектинів, є такі: аглютинація еритроцитів та інших типів клітин; адгезивна активність; мітогенна\* стимуляція лімфоцитів<sup>†</sup>; фагоцитарна активність; ферментативна активність і токсичність щодо еукаріотичних клітин.

До недавнього часу джерелом одержання лектинів були рослини та тканини тварин. Проте навіть серед них існує дефіцит лектинів з рідкісною вуглеводною специфічністю (щодо фукози, уронових і сіалових кислот). Сіалові кислоти (N-ацетилгексамінова та N-гліколілгексамінова кислоти) можна уявити як продукт конденсації N-ацетилглюкозаміну з піровиноградною кислотою. Сіалові кислоти не зустрічаються у вільному вигляді, а входять до складу глікопротеїнів, глікокон'югатів біологічних рідин, є складовою поверхні еукаріотичних клітин.

Технологія одержання позаклітинних сіалоспецифічних бактеріальних лектинів (80-ті роки ХХ ст.) є розробкою Інституту мікробіології і вірусології НАН України. Продуцентами таких унікальних лектинів є представники роду *Bacillus* (*Bacillus subtilis*). Слід зазначити, що серед сапрофітних бактерій адаптність до синтезу лектинів була виявлена вперше.

Сіалоспецифічні бацилярні лектини за хімічною природою є глікопротеїнами, які містять до 10 % вуглеводів. Вони є гетерогенними за молекулярною масою: у складі очищених лектинів виявлені компоненти з молекулярною масою від 10 000 до 70 000. Молекулярна маса неочищених лектинів не перевищує 15 000–19 000.

Бактеріальні лектини можуть бути внутрішньоклітинними, асоційованими з поверхнею клітин і позаклітинними. Найбільший інтерес для біотехнології викликають позаклітинні лектини, які містяться в культуральній рідині, оскільки виділення таких лектинів є простішим, ніж клітинних. Вміст лектинів в культуральній рідині є невисоким і, як правило, не перевищує 100 мг/л.

\* *Мітогенна активність* — стимуляція росту та ділення лімфоцитів.

<sup>†</sup> *Лімфоцити* — однієї клітини живого організму, здатні розпізнавати різні антигени і здійснювати відповідні імунологічні реакції.

### 12.6.5.5. Поверхнево-активні речовини мікробного походження

Поверхнево-активні речовини (ПАР) — це сполуки, які здатні знижувати поверхневий натяг на межі розподілу фаз. Такі речовини, завдяки силам міжмолекулярної взаємодії, можуть концентруватися (адсорбуватися) на межі розподілу фаз, знижуючи величини поверхневого натягу. ПАР поділяються на *молекулярно-розчинні*, які утворюють істинні розчини, та *колоїдні (міцелярно-розчинні)*. Основні характеристики ПАР такі:

1) критична концентрація міцелоутворення (ККМ). ККМ визначається як концентрація ПАР, за якої в його розчині утворюються міцели, що перебувають у рівновазі з молекулами чи іонами. На практиці ККМ визначається як максимальна концентрація істинно розчинного ПАР, яка може бути отримана в даних умовах;

2) величина гідрофільно-ліпофільного балансу (ГЛБ). ГЛБ визначається за 20-бальною шкалою і показує співвідношення гідрофільної та гідрофобної частин у молекулі ПАР. Чим вище значення ГЛБ, тим гідрофільнішою є сполука.

ПАР мікробного походження називаються *біо-ПАР*, *біосурфактантами*. Розробляти їх почали у 70-х роках ХХ ст., тобто, як і мікробні лектини, вони є відносно новим продуктом біотехнології. Субстратами для синтезу ПАР є переважно вуглеводні (*n*-алкани) — нерозчинні у воді сполуки, і у зв'язку з цим синтез ПАР мікроорганізмами можна розглядати як життєво важливу функцію, а саме — емульгування важкодоступних субстратів і введення у форму, доступну для засвоєння. З такої точки зору біо-ПАР можна розглядати як первинні метаболіти. Проте, крім вуглеводнів, як субстрати для синтезу ПАР можуть бути використані і водорозчинні сполуки (глюкоза, етанол). У таких випадках утворення ПАР не є життєво необхідною функцією, і їх можна розглядати як вторинні метаболіти.

Біо-ПАР є міцелярно-розчинними сполуками, тобто складаються з гідрофобної та гідрофільної частин. ПАР на основі значення ККМ можна поділити на три групи:

1) ПАР, для яких ККМ перевищує 7 г/л. Таким ПАР не притаманні мийні властивості;

2) типові мийні засоби, емульгатори. Значення ККМ становить 0,2–7,0 г/л;

3) ПАР, слабкорозчинні у воді і добре розчинні у вуглеводневих середовищах. ККМ не перевищує 0,2 г/л.

Слід зазначити, що дистильована вода має поверхневий натяг 73 мН/м. Ефективні біо-ПАР знижують це значення до 29–32 мН/м, маючи при цьому низькі значення ККМ.

За хімічною природою біо-ПАР поділяються на п'ять груп (класифікація німецького вченого Ф. Вагнера, який є провідним спеціалістом у галузі біотехнології мікробних ПАР): 1) гліколіпіди; 2) ліпопептиди (ліпопротейни); 3) ліпополісахариди; 4) жирні кислоти та їх похідні; 5) фосфоліпіди.

Продуктами ПАР можуть бути бактерії, дріжджі, гриби та мікрводорості. Найвідомішими з мікробних ПАР є гліколіпіди (продуктами є артробактерії, псевдомонади синтезують ПАР, який називається "рамнолілід Р-1", дріжджі родів *Candida* та *Torulopsis*). Серед ліпопротейнів найбільш відомими є бацілярні ПАР — сурфактин, ліхемизин, серед ліпополісахаридів — емульсан.

За класифікацією ізраїльського вченого Е. Розенберга (1999 р.) біосурфактанти поділяються на низько- та високомолекулярні. До низькомолекулярних належать гліколіпіди (трегалозоліпіди, софороліпіди, рамноліпіди) та ліпопептиди (сурфактин, поліміксин, грамцидини S). Високомолекулярні біосурфактанти — це полісахариди, білки, ліпополісахариди, ліпопротейни або комплекси цих сполук. Низькомолекулярні ПАР здатні знижувати поверхневий натяг на межі розподілу фаз, а високомолекулярні є ефективними стабілізаторами емульсій типу "масло у воді", тобто вони є емульгаторами.

#### Контрольні запитання до розділу 12

1. При вирощуванні мікроорганізмів на яких субстратах є необхідним функціонування глікоксилатного циклу і чому?
2. При вирощуванні мікроорганізмів на яких субстратах є необхідним функціонування реакції глюконеогенезу і чому?
3. Які ключові ферменти можна визначити під час вирощування бактерій на  $C_5$ -субстратах?
4. Назвіть особливості метаболізму оксалату і гліоксилату у мікроорганізмів.
5. Які ключові ферменти можна визначити під час вирощування бактерій на  $C_5$ -субстратах?
6. На які групи поділяються метилотрофні бактерії?
7. Охарактеризуйте особливості конструктивного метаболізму метилотрофів.

8. Як утворюються відновлювальні еквіваленти у процесі вирощування бактерій на метані?

9. Назвіть принципові відмінності між метаболізмом глюкози та метаболізмом ацетату у аеробних гетеротрофів.

10. Як відбувається катаболізм *n*-алканів і жирних кислот у мікроорганізмів?

11. Охарактеризуйте реакції катаболізму амінокислот.

12. Як відбувається розщеплення ароматичних сполук у мікроорганізмів?

13. Які процеси належать до неповних окиснень?

14. Охарактеризуйте практично цінні вторинні метаболіти мікроорганізмів.

15. Яке біологічне значення має здатність до синтезу антибіотиків у мікроорганізмів?

16. На які групи поділяються мікробні екзополісахариди?

17. Яке практичне значення мають лектини мікробного походження та біосурфактанти?

### 13. БІОСИНТЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У МІКРООРГАНІЗМІВ

У процесі росту мікроорганізмів на глюкозі в аеробних умовах близько 50 % глюкози окиснюється до  $\text{CO}_2$  для одержання енергії. Решта 50 % глюкози перетворюється на клітинний матеріал. Саме на ці перетворення і витрачається більша частина АТФ, утвореного під час окиснення субстрату.

Розглянемо біосинтез низькомолекулярних сполук (мономерів) — амінокислот, нуклеотидів, вуглеводів і жирних кислот, які є будівельними блоками для синтезу полімерів (білків, полісахаридів, нуклеїнових кислот, ліпідів), а також основні реакції, що відбуваються з витратами АТФ.

#### 13.1. ПОТРЕБИ В АТФ ДЛЯ УТВОРЕННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ КЛІТИН З ГЛЮКОЗИ

Понад 95 % клітинного матеріалу мікроорганізмів складається з макромолекул. На частку білків припадає приблизно 52 %, нуклеїнових кислот — 19 % маси сухої речовини. Близько 3 % становлять низькомолекулярні органічні сполуки та солі.

Макромолекули	Вміст макромолекул у бактеріальних клітинах Кількість, г/100 г сухих клітин
Білки	52,4
Полісахариди	16,6
Ліпіди	9,4
РНК	15,7
ДНК	3,2
Разом	97,3

З наведених нижче даних про витрати енергії на утворення бактеріальних клітин з глюкози (потреба в АТФ для синтезу

макромолекул, з яких складається клітина) видно, що основна кількість АТФ, одержаного в дихальному ланцюгу, витрачається на полімеризацію амінокислот. Значна кількість енергії потрібна для утворення нуклеозидмонофосфатів, а також на забезпечення транспортних процесів.

Потреба в АТФ для утворення бактеріальних клітин із глюкози

Молекули	Кількість АТФ, потрібних для синтезу макромолекул, які містяться в 1 г сухих клітин, ммоль
Полісахариди	2,1
Віаки:	
Глюкоза → Амінокислоти	1,4
Полімеризація амінокислот	19,1
Ліпіди	0,1
РНК:	
Глюкоза → Нуклеозидмонофосфати	3,5
Полімеризація	0,9
ДНК:	
Глюкоза → Дезоксинуклеозидмонофосфати	0,9
Полімеризація	0,2
АТФ, необхідна для транспортних процесів	5,2
АТФ, необхідна для обороту РНК	1,4
Загальна потреба в АТФ	34,8

### 13.2. БІОСИНТЕЗ АМІНОКИСЛОТ

Більшість мікроорганізмів здатні синтезувати *de novo* всі 20 амінокислот, з яких складаються білки. Вуглецеві скелети амінокислот будуються з проміжних продуктів обміну, аміногрупи вводяться *прямим амінуванням* або *трансамінуванням*. Переведення неорганічного азоту в органічні сполуки завжди відбувається через аміак. Нітрати, нітроти, молекулярний азот (джерела азоту в поживних середовищах) попередньо відновлюються до аміаку (асиміляційна нітратредукція) і тільки після цього включаються до складу органічних сполук (рис. 13.1, а, б, в).

Лише небагато амінокислот утворюються в результаті *прямого амінування* вільними іонами амонію. У первинній асиміляції аміаку беруть участь *L-глутаматдегідрогеназа* та *L-аланіндегідрогеназа*, які здійснюють відновлювальне амінування 2-оксокислот (піруват та 2-оксоглутарату) (рис. 13.1, д, е). АТФ у цьому процесі

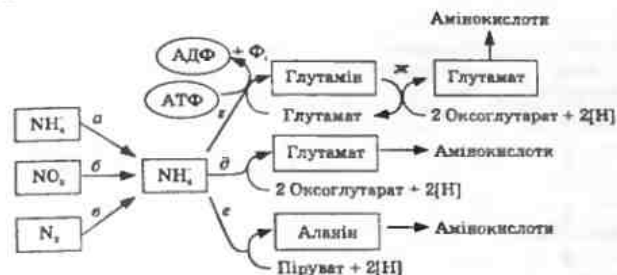


Рис. 13.1. Найважливіші шляхи асиміляції азоту:

іони амонію, що містяться у поживному середовищі, безпосередньо поглинаються клітинами (а). Іони нітрату під час асиміляційної нітратредукції (б), а молекулярний азот під час фіксації азоту (в) відновлюються до іонів амонію. В органічні сполуки амонійний азот перетворюється або за участю АТФ утворенням глутаміну, або без витрат АТФ прямим відновлювальним амінуванням 2-оксоглутарату чи пірувату

участі не бере. Утворення глутаміну з глутамату каталізується *глутамінсинтетазою* і потребує витрат АТФ (рис. 13.1, г). За допомогою *глутаматсинтази* аміногрупа глутаміну може бути перенесена на 2-оксоглутарат з утворенням глутамату (рис. 13.1, ж).

Решта амінокислот отримує свою аміногрупу від первинних амінокислот у результаті *трансамінування*. З вільних амінокислот у цитоплазмі кількісно переважає глутамінова кислота (більше половини всього "пулу" амінокислот).

Всі необхідні для синтезу білків 20 амінокислот утворюються з певних метаболічних попередників (рис. 13.2).

Попередник	Попередники біосинтезу амінокислот	Амінокислота
Піруват		Аланін, валін, лейцин
Оксалоацетат		Аспартат, аспарагін, метіонін, лізин, треонін, ізолейцин
2-Оксоглутарат		Глутамат, глутамін, аргінін, пролін
3-Фосфогліцерат		Серин, гліцин, цистеїн
Фосфенопіруват, еритрозо-4-фосфат		Фенілаланін, тирозин, триптофан
5-Фосфорибозил-1-пірофосфат + АТФ		Гістидин

Як видно з наведених даних, субстратами для синтезу амінокислот є декілька сполук — піруват, оксалоацетат, 2-оксоглу-



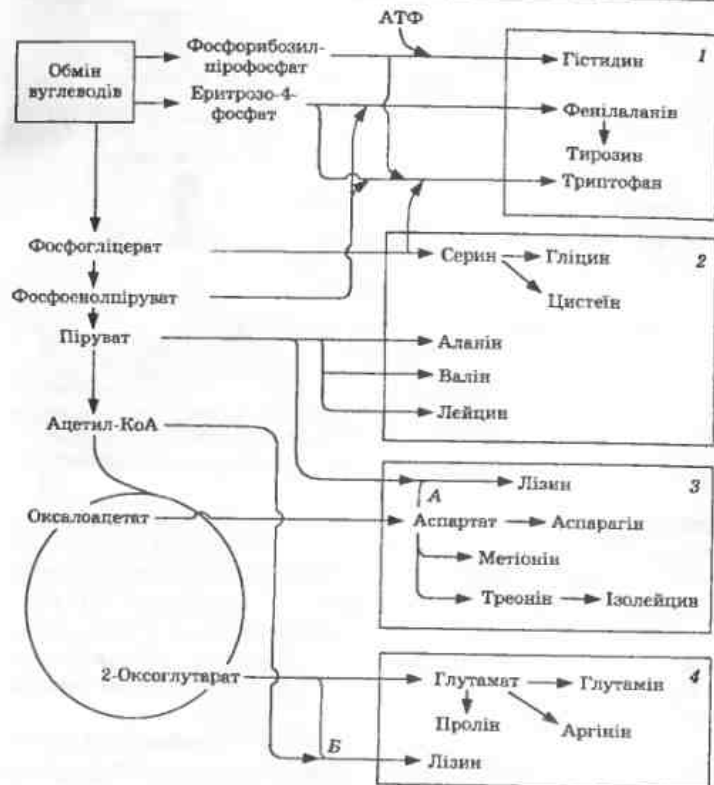


Рис. 13.2. Шляхи біосинтезу амінокислот:  
 родини амінокислот: 1 — ароматичних амінокислот і гістидину; 2 — пір-  
 ватна; 3 — аспаратна; 4 — глутаматна. Шляхи біосинтезу лізину: А — діаміно-  
 пімеліновий; Б — аміноадипіновий

тарат, 3-фосфогліцерат, фосфоеноліпіруват, еритрозо-4-фосфат і 5-фосфорибозил-пірофосфат. Оксалоацетат являє собою відправну точку для синтезу шести амінокислот, 2-оксоглутарат є попередником синтезу чотирьох, а піруват — трьох амінокислот. На рис. 13.2 показано два можливі шляхи синтезу лізину: А — діамінопіримідиновий і Б — аміноадипіновий.

Мікрородості, гриби, дріжджі здійснюють синтез лізину через аміноадипінову, бактерії — через діамінопімелінову кислоту.

Аланін та аспарат синтезуються з пірувату та оксалоацетату трансамінуванням з використанням глутамату як донора аміногрупи. Аспарат утворюється в реакції, аналогічній реакції, що каталізується *глутамінсинтетазою*. Відновлення аспартату дає напівальдегід аспарагінової кислоти — попередник лізину, треоніну та метіоніну. Дезамінування треоніну приводить до утворення 2-оксобутирату, який в результаті послідовної дії чотирьох ферментів перетворюється на ізолейцин. Під дією чотирьох ферментів піруват перетворюється на валін; проміжний продукт синтезу валіну служить попередником в утворенні лейцину. Серин, гліцин і цистеїн синтезуються з 3-фосфогліцерату, а пролін та аргінін — з глутамату.

Складнішим є синтез ароматичних амінокислот (рис. 13.3). Еритрозо-4-фосфат і фосфоенолпіруват конденсуються з утворенням С<sub>3</sub>-сполуки, яка піддається циклізації. Загальним проміжним продуктом синтезу ароматичних амінокислот є **хоризмат**. У цій точці біосинтетичний шлях розгалужується на два: 1) утворення триптофану через антранілат; 2) утворення тирозину та фенілаланіну через пренат (рис. 13.3).



Рис. 13.3. Біосинтез ароматичних амінокислот

### 13.3. БІОСИНТЕЗ НУКЛЕОТИДІВ

Попередниками піримідинових нуклеотидів є карбамоїл-фосфат та аспартат (рис. 13.4). Конденсація цих сполук дає карба-

моїласпартат, який піддається циклізації і перетворюється на 4,5-дигідрооротат. Дегідровання цієї сполуки приводить до утворення оротату — першого проміжного продукту, який містить піримідинове кільце. Рибозо-5-фосфат, утворений у пентозофосфатному циклі, активується перетворенням на 5-фосфорибозил-1-пірофосфат. Реакція 5-фосфорибозил-1-пірофосфату з оротатом дає оротидинмонофосфат, який далі декарбоксилюється в **уридинмонофосфат**.

Синтез **пуринових нуклеотидів** проходить складнішим шляхом (рис. 13.5). У результаті метаболічного шляху, який починається з 5-фосфорибозил-1-пірофосфату утворюється імідазольний нуклеотид. Три атоми піримідинового кільця, необхідні для утворення пуринового кільця з імідазольного нуклеотиду, надходять із бікарбонату, аспартату та формілтетрагідрофолієвої кислоти. Замикання кільця дає інозинмонофосфат (пуриновий нуклеотид, ІМФ). Декілька додаткових реакцій приводять від ІМФ до АМФ або до ГМФ, і нарешті утворюються АТФ та ГТФ.

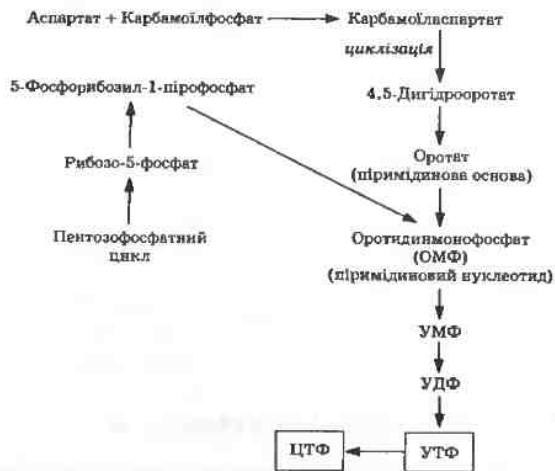


Рис. 13.4. Схема біосинтезу піримідинових нуклеотидів

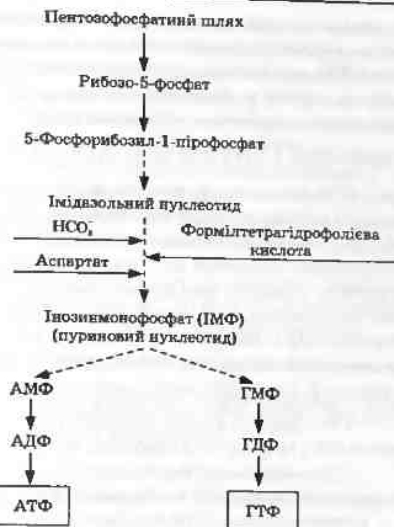


Рис. 13.5. Схема біосинтезу пуринових нуклеотидів

Відновлення рибонуклеотидів до дезоксирибонуклеотидів відбувається на рівні дифосфатів. Відновлювальним агентом у цій реакції є флавопротеїтioreдоксин; його відновлена форма регенерується за рахунок НАДФН.

### 13.4. БІОСИНТЕЗ ЖИРНИХ КИСЛОТ

Більшість жирних кислот, які входять до складу бактеріальних ліпідів, містять 16 або 18 атомів вуглецю. Ці кислоти є або насиченими, або мають один чи більше подвійних зв'язків. Попередником жирних кислот є ацетил-КоА. Проте подовження ланцюга у даному разі не відбувається за рахунок конденсації двох молекул ацетил-КоА з наступною подальшою конденсацією утвореної  $C_4$ -сполуки з ацетил-КоА. У біосинтезі жирних кислот є дві принципові відмінності:

1. КоА-похідні не є субстратами ферментів, що беруть участь у синтезі жирних кислот. Замість них використовується *ацилпереносний білок (АПБ)*, який містить як протетичну групу 4-фосфопантатеїн, тобто є схожим на кофермент А. Перша реакція у синтезі жирних кислот — це утворення ацетил-АПБ:



2. Ацетил-АПБ функціонує у синтезі жирних кислот як затравка, а  $C_2$ -фрагменти приєднуються до цієї затравки у формі малоніл-КоА. Малоніл-КоА синтезується з ацетил-КоА у два етапи.

Для подовження ацил-АПБ на два атоми вуглецю необхідні чотири ферменти. Спочатку ацетил-АПБ реагує з малоніл-АПБ з утворенням ацетоацетил-АПБ, який потім відновлюється до  $\beta$ -гідроксибутирил-АПБ. Відщеплення води дає кротоіл-АПБ, а наступне відновлення приводить до утворення бутирил-АПБ:

- 1) Ацетил-АПБ + Малоніл-АПБ  $\leftrightarrow$  Ацетоацетил-АПБ +  $CO_2$  + АПБ  
(3-кетואцил АПБ-синтетаза);
- 2) Ацетоацетил-АПБ + НАДФН  $\leftrightarrow$   $\beta$ -гідроксибутирил-АПБ + НАДФ  
(3-кетואцил АПБ редуктаза);
- 3)  $\beta$ -гідроксибутирил-АПБ  $\leftrightarrow$  Кротоіл-АПБ +  $H_2O$   
( $\beta$ -гідроксацил АПБ дегідратаза);
- 4) Кротоіл-АПБ + НАДФН  $\leftrightarrow$  Бутирил-АПБ + НАДФ  
(еноіл-АПБ редуктаза).

Точкою розгалуження синтезу насичених і ненасичених жирних кислот є  $\beta$ -гідроксидеканоіл-АПБ.

Основними субстратами для утворення *фосфатидних кислот* є 3-фосфогліцерин та ацил-АПБ. 3-Фосфогліцерин утворюється з діоксиацетонфосфату — проміжного продукту гліколізу. Фосфатидні кислоти утворюються в результаті перенесення ацильного залишку від ацил-АПБ на 3-фосфогліцерин. Більша частина фосфатидних кислот (через стадію утворення складних ефірів із спиртами) використовується для синтезу фосфоліпідів.

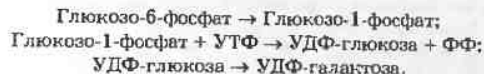
### 13.5. УТВОРЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ — КОМПОНЕНТІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ

Якщо субстратом служить глюкоза, то продуктами її катаболізму є глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифос-

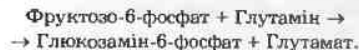
фат, у пентозофосфатному циклі утворюються рибулозо-5-фосфат, ксилулозо-5-фосфат, рибозо-5-фосфат. У разі неуглеводних субстратів такі вуглеводи, як глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, синтезуються в реакціях глікогенезу. Взаємоперетворення моносахаридів відбувається через нуклеозиддифосфатсахариди (наприклад, через УДФ-похідні).

Як приклад розглянемо біосинтез окремих компонентів клітинної стінки у грамнегативних бактерій *E. coli*.

Одним з попередників ліпополісахариду клітинної стінки *E. coli* є УДФ-галактоза, яка утворюється з глюкозо-6-фосфату:



Другим попередником ліпополісахариду клітинної стінки є *гексозаміни*, що утворюються з фруктозо-6-фосфату. Фруктозо-6-фосфат перетворюється на глюкозамін-6-фосфат за рахунок глутаміну як донора аміногрупи:



Із глюкозамін-6-фосфату утворюються інші гексозаміни.

УДФ-*N*-ацетилмурамова кислота та УДФ-*N*-ацетилглюкозамін — попередники пептидоглікану — також синтезуються з глюкозамін-6-фосфату (рис. 13.6). Спочатку фосфатна група переноситься з положення 6 у положення 1 з утворенням глюкозамін-1-фосфату. Наступна реакція з ацетил-КоА дає *N*-ацетилглюкозамін-1-фосфат, який зв'язується з УДФ. На останньому етапі УДФ-*N*-ацетилглюкозамін реагує з фосфенолпіруватом, утворюючи УДФ-*N*-ацетилмурамову кислоту.

Будівельним блоком пептидоглікану є УДФ-



Рис. 13.6. Синтез попередників пептидоглікану

N-ацетилмурамілпентапептид. Пентапептид синтезується з УДФ-N-ацетилмурамової кислоти в результаті послідовних реакцій з L-аланіном + АТФ, D-глутаматом + АТФ, мезо-діамінопімелатом + АТФ та D-аланід-D-аланіном + АТФ.

#### Контрольні запитання до розділу 13

1. Які біосинтетичні процеси у мікроорганізмів потребують найбільших витрат енергії (АТФ)?
2. Як у мікроорганізмів відбувається асиміляційна нітратредукція?
3. Які амінокислоти утворюються в результаті прямого амінування?
4. Які амінокислоти утворюються в результаті трансамінування?
5. Назвіть попередників синтезу амінокислот.
6. Які є шляхи біосинтезу лізину у мікроорганізмів?
7. Як відбувається синтез ароматичних амінокислот?
8. Назвіть основні етапи синтезу піримідинових та пуринових нуклеотидів.
9. Які особливості притаманні біосинтезу жирних кислот?
10. Як відбувається синтез фосфатидних кислот і фосфоліпідів?
11. Як синтезуються попередники пептидоглікану (N-ацетилмурамова кислота та N-ацетилглюкозамін)?
12. Як відбувається утворення вуглеводних попередників ліпополісахаридів клітинної стінки у грамнегативних бактерій?

## 14. ТИПИ БРОДІННЯ

### 14.1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСУ БРОДІННЯ

Із трьох принципово можливих способів регенерації АТФ (дихання, бродіння та фотосинтез) бродіння найпростіший.

**Бродіння** — це такий метаболічний процес, у якому регенується АТФ, а продукти розщеплення органічного субстрату можуть служити одночасно і донорами, і акцепторами водню. Загальна схема бродіння показана на рис. 14.1. Органічний субстрат є джерелом енергії та вуглецю. Реакції синтезу АТФ є реакціями окиснення. Від окисненого вуглецю клітина позбавляється, виділяючи  $\text{CO}_2$ . Окремі етапи окиснення являють собою дегідрування, за якого водень переноситься на НАД. Акцепторами водню, який міститься у вигляді НАДН, є проміжні продукти розщеплення суб-

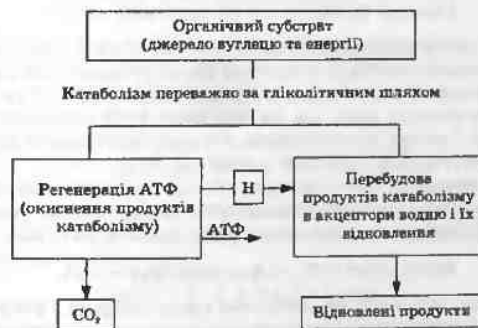


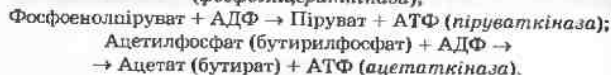
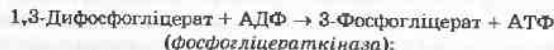
Рис. 14.1. Загальна схема бродіння

страту. За рахунок НАДН ці проміжні продукти відновлюються, а продукти відновлення виводяться з клітини.

У процесі зброджування вуглеводів та інших субстратів утворюються (окремо чи в суміші) такі продукти, як етанол, лактат (молочна кислота), пропіонат, формиат, бутират, сукцинат, ацетат, *n*-бутанол, 2,3-бутандіол, ацетон, 2-пропанол,  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ . Залежно від того, які продукти переважно утворюються, розрізняють спиртове, молочнокисле, маслянокисле, пропанонокисле, мурашиннокисле та оцтовокисле бродіння. Молекулярний кисень у процесах бродіння участі не бере. Більшість мікроорганізмів, які здійснюють бродіння, є облигатними анаеробами або факультативними аеробами, здатними рости як у присутності кисню, так і без нього. При цьому кисень пригнічує бродіння, і воно змінюється диханням.

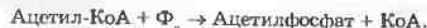
#### 14.1.1. Регенерація АТФ у процесі бродіння

У процесі зброджування глюкози утворюється від одного до чотирьох молей АТФ. У фосфорилуванні на рівні субстрату беруть участь такі три найважливіші реакції:



У більшості мікроорганізмів використовуються перші дві реакції. При цьому необхідні акцептори водню утворюються з пірувату або ацетил-КоА. У процесі зброджування одного моля глюкози утворюється лише два або три моля АТФ, а продуктами бродіння є лактат, етанол, ацетон, бутират, *n*-бутанол, 2-пропанол, 2,3-бутандіол, капронат, ацетат,  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ .

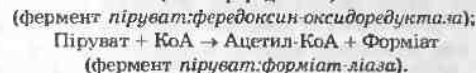
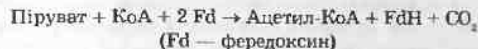
При використанні третьої реакції, яка каталізується *ацетаткіназою*, утворюється додатковий АТФ. Ацетилфосфат утворюється з ацетил-КоА за допомогою *фосфотрансацетилази*:



Крім того, можливе утворення ацетилфосфату з фосфорильованих сахаридів (ксилозулозо-5-фосфат, фруктозо-6-фосфат) за участю *фосфокетоллази*.

Здатність бактерій здійснювати третю реакцію залежить від того, чи можуть вони виділяти молекулярний водень. При перенесенні відновлювальних еквівалентів (електронів) на протони вони можуть виділятися у вигляді молекулярного водню. У цьому разі клітині немає потреби синтезувати акцептори водню. Для того щоб зрозуміти цей механізм, необхідно розглянути механізми вивільнення водню.

Механізми вивільнення водню. Анаеробні бактерії окиснюють піруват до ацетил-КоА двома способами:



У першій реакції (є характерною для клостридій) відновлюється фередоксин, окисно-відновний потенціал якого є дуже низьким ( $-420 \text{ мВ}$ ), тому за допомогою спеціальної гідрогенази може вивільнюватися водень:



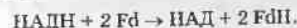
У другій реакції (є характерною для синтеробактерій) утворюється формиат, окисно-відновний потенціал якого теж є низьким, тому він може розщеплюватися з утворенням  $\text{H}_2$ :



Враховуючи те, що окисно-відновні потенціали як у  $\text{FdH}$ , так і у формиату є досить низькими, клітині неважко позбавлятися від відновлювальних еквівалентів, що утворюються при окисненні пірувату до ацетил-КоА.

На відміну від цього, водень, що утворюється у процесі дегідратування гліцеральдегід-3-фосфату у вигляді НАДН, у більшості анаеробних бактерій далі передається на органічні акцептори.

Проте деякі бактерії можуть вивільняти молекулярний водень навіть із НАДН завдяки наявності фермента *НАДН:фередоксин-оксидоредуктази*:



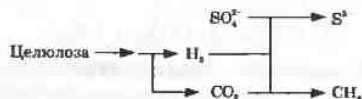
Як відомо, за допомогою *гідрогенази* з  $\text{FdH}$  утворюється водень. Проте ці реакції можуть проходити тільки тоді, коли утворюва-

ний водень безперервно виводиться (споживається). Це зумовлено тим, що такі реакції утворення водню пов'язані з підвищенням потенціалу Н (від  $-320$  мВ для НАДН до  $-420$  мВ для ферредоксину), і їх рівновага є несприятливою для виділення водню. Тому організми, які можуть утворювати водень із НАДН, можуть використовувати цей елегантний спосіб позбавлення від водню у формі  $H_2$  тільки тоді, коли існують разом з мікроорганізмами, що безперервно споживають водень. Саме так відбувається у природі. Таке явище називають *міжвидовою передачею водню*, що є особливою формою симбіозу у мікробних спільнотах.

Звичайно ж, що бактерії, які здатні позбавлятися від зв'язаного з НАД водню, виділяючи його у вигляді  $H_2$ , можуть обходитись без реакцій перетворення ацетил-КоА на акцептори для НАДН. Тому вони здатні перетворювати ацетил-КоА на ацетилфосфат і регенерувати додатковий АТФ шляхом ацетаткіназної реакції. Виділяють вони, головним чином, ацетат і здатні регенерувати до чотирьох молей АТФ.

#### 14.1.2. Роль процесів бродиння у балансі природи

Мікроорганізми, які здійснюють бродиння, відіграють важливу роль у природному кругообігу речовин. Більша частина целюлози, яку споживають рослиножуйні тварини, виводиться з їх організму у неперетравленому вигляді. У разі потрапляння такого целюлозного детриту в анаеробні шари ґрунту або донні осади водойм целюлоза піддається зброджуванню клостридіями і деякими іншими строго анаеробними бактеріями. При цьому утворюються всі названі продукти бродиння, у тому числі майже завжди молекулярний водень. Водень міститься на початку анаеробного харчового ланцюга, головними продуктами якого є метан та/або сірководень. В осадах прісноводних озер та в рубці жуйних тварин водень перетворюється метаноутворювальними бактеріями на метан, а в морських анаеробних екосистемах сульфатовідновлювальні бактерії перетворюють водень і сульфат на сірководень:



### 14.2. СПИРТОВЕ БРОДИННЯ

Основними продуцентами етанолу є дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* та бактерії (*Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Sarcina ventriculi*).

#### 14.2.1. Утворення етанолу дріжджами

Катаболізм глюкози у процесі зброджування її до етанолу та  $\text{CO}_2$  здійснюється гліколітичним шляхом. Глюкоза окиснюється до пірувату. Перетворення пірувату на етанол проходить у два етапи (рис. 14.2):

1) піруват декарбоксилюється *піруватдекарбоксилазою* до ацетальдегіду;

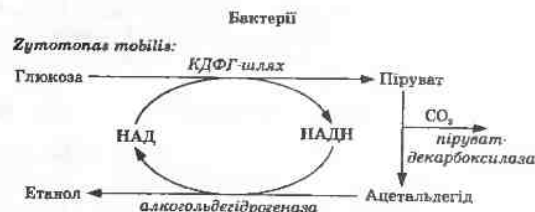
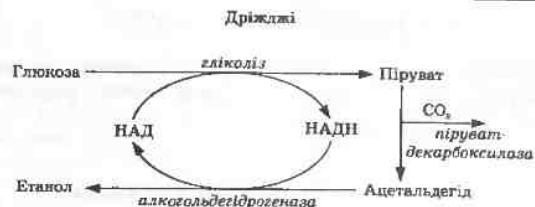
2) ацетальдегід відновлюється *алкогольдегідрогеназою* до етанолу за участю НАДН. При цьому переносяться водень, який утворився під час дегідрування триозофосфату. Окисно-відновний баланс, таким чином, зберігається.

**Форми бродиння, відкриті К. Нейбергом.** Якщо до дріжджів, які зброджують глюкозу, додати бісульфіт (він є нетоксичним для дріжджів), то з'явиться новий продукт — гліцерин і одночасно знизиться вихід етанолу та  $\text{CO}_2$ . Ацетальдегід зв'язується бісульфітом з утворенням ацетальдегідсульфіту і тому не може служити акцептором водню — етанол не утворюється. Замість ацетальдегіду таким акцептором водню є діоксиацетонфосфат. Він відновлюється до гліцерин-3-фосфату і дефосфорилується до гліцерину. Бродиння у присутності бісульфіту використовують у промисловості для одержання гліцерину. Це *друга форма бродиння за Нейбергом*.

Якщо у процесі бродиння у розчин додати бікарбонат натрію або двозаміщений фосфорнокислий натрій, також утворюється гліцерин, оскільки ацетальдегід перетворюється в результаті реакції дисмутації на етанол та оцтову кислоту і тому не може служити акцептором водню. Це *третьою формою бродиння за Нейбергом*. *Першою формою бродиння* є нормальне дріжджове бродиння.

**Ефект Пастера.** Зброджування дріжджами глюкози — процес анаеробний, хоча дріжджі є аеробними мікроорганізмами.





*Leuconostoc mesenteroides:*

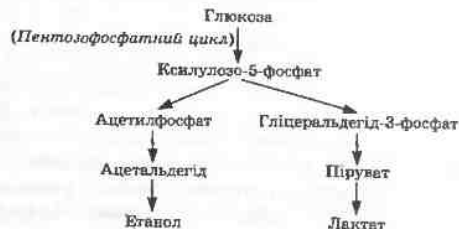


Рис. 14.2. Спиртове бродіння

В анаеробних умовах бродіння відбувається дуже інтенсивно, але відзначається слабкий ріст. Під час аерації бродіння послаблюється, починається дихання і активний ріст. У деяких дріжджів бродіння можна майже пригнітити посиленою аерацією (ефект Пастера). Л. Пастер відкрив цей ефект понад сто років тому. Він властивий не тільки дріжджам, а й усім факультативно аеробним клітинам, у тому числі й клітинам тканин вищих тварин.

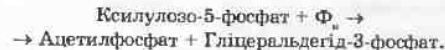
#### 14.2.2. Утворення етанолу бактеріями

Відомий для дріжджів шлях утворення етанолу (гліколіз, піруватдекарбоксилазна реакція, відновлення ацетальдегіду) з усіх досліджених бактерій виявлений тільки у *Sarcina ventriculi*.

Бактерія *Zytoplasma mobilis* розщеплює глюкозу КДФГ-шляхом, піруват розкладається у піруватдекарбоксилазній реакції на ацетальдегід і  $\text{CO}_2$ , ацетальдегід відновлюється до етанолу (див. рис. 14.2). Єдиними продуктами бродіння у цьому разі є етанол, вуглекислий газ і невеликі кількості молочної кислоти.

У процесі бродіння, що здійснюється деякими видами ентеробактерій і клостридіями, етанол є побічним продуктом. Попередник етанолу — ацетальдегід — утворюється у цьому разі не з пірувату, а шляхом відновлення ацетил-КоА.

Зовсім іншим шляхом утворюють етанол гетероферментативні молочнокислі бактерії *Leuconostoc mesenteroides* (див. рис. 14.2). Глюкоза розкладається пентозофосфатним шляхом до пентозофосфату. Ксилулозо-5-фосфат за участю фосфокетоллази перетворюється на ацетилфосфат і гліцеральдегід-3-фосфат:



Ацетилфосфат відновлюється ацетальдегіддегідрогеназою та алкогольдегідрогеназою до етанолу. Інший продукт розщеплення глюкози — гліцеральдегід-3-фосфат — відновлюється до лактату через піруват.

### 14.3. МОЛОЧНОКИСЛЕ БРОДІННЯ І РОДИНА LACTOBACILLACEAE

#### 14.3.1. Характеристика молочнокислих бактерій

Молочнокислі бактерії об'єднують у родину Lactobacillaceae. Ця група є морфологічно гетерогенною, але має спільні фізіологічні ознаки. Всі бактерії є грам-позитивними, не утворюють спор (за винятком *Sporolactobacillus inulinus*), переважно нерухливі. Всі вони використовують вуглеводи як джерело вуглецю та енергії і виділяють молочну кислоту. На відміну від ентеробактерій, які теж виділяють лактат, молочнокислі бак-

терії здатні тільки до бродіння, вони не містять гемопротейнів (цитохромів і каталази). Проте представники родини *Lactobacillaceae* можуть рости у присутності кисню, вони все-таки є аеротолерантними.

Ще однією особливістю молочнокислих бактерій є потреба в ростових факторах. Для росту більшості цих бактерій потрібен ряд вітамінів (тіамін, пантотенова, нікотинова, фолієва кислоти, біотин), амінокислот, а також пуринів і піримідинів. Вирощують молочнокислі бактерії переважно на складних середовищах, що містять достатньо високі концентрації дріжджового автолізу, томатного соку, молочної сироватки і навіть крові. Отже, молочнокислі бактерії є своєрідними "метаболічними інвалідами", які, очевидно, в силу своєї спеціалізації (ріст на молочці та інших багатих середовищах) втратили здатність до синтезу багатьох метаболітів. З іншого боку, їм притаманна здатність, якої немає в інших мікроорганізмів: вони можуть використовувати молочний цукор (лактозу). Лактоза зустрічається тільки у ссавців, у рослинному царстві її немає. Лактоза являє собою дисахарид, який перш ніж катаболізуватися, повинен бути розщеплений на глюкозу та галактозу (фермент  $\beta$ -галактозидаза). У зв'язку з тим, що молочнокислі бактерії виділяють велику кількість молочної кислоти, середовище для їх культивування повинно бути забуференим.

Молочнокислі бактерії ніколи не зустрічаються в ґрунті або водоймах. Місця їх існування такі:

молоко й місця його переробки, молочні продукти (*Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*);

рослини й рослинні залишки (*Lactobacillus plantarum*, *L. delbrückii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Streptococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*);

кишечник і слизові оболонки людини й тварин (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus faecalis*, *S. bovis*, *S. pneumoniae*).

Серед стрептококів зустрічаються паразити крові — досить вірулентні збудники захворювань.

Залежно від того, які продукти утворюються у процесі зброджування глюкози (тільки молочна кислота або також і інші органічні продукти та  $\text{CO}_2$ ), молочнокислі бактерії поділяються на **гомо-** та **гетероферментативні**.

### 14.3.2. Гомоферментативне молочнокисле бродіння

Гомоферментативні молочнокислі бактерії утворюють тільки одну молочну кислоту (вона становить не менше 90 % усіх продуктів бродіння). Глюкоза катаболізується гліколітичним шляхом. Водень, який відщеплюється під час легідування гліцеральдегід-3-фосфату у вигляді НАДН, передається на піруват (рис. 14.3). У присутності *лактатдегідрогенази* піруват відновлюється до лактату. Лише невелика частина пірувату декарбонізується та перетворюється на оцтову кислоту, етанол і  $\text{CO}_2$ , а також ацетон. Гомоферментативне молочнокисле бродіння здійснюють стрептококи, серед лактобацил — *Lactobacillus lactis*, *L. bulgaricus*, *L. delbrückii*, *L. acidophilus*.

### 14.3.3. Гетероферментативне молочнокисле бродіння

У гетероферментативних молочнокислих бактерій (на відміну від гомоферментативних) відсутні такі ферменти гліколізу,

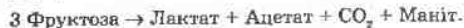


Рис. 14.3. Молочнокисле бродіння

як альдолаза та триозофосфатізомераза. Початкове розщеплення глюкози у них відбувається лише пентозофосфатним шляхом (див. рис. 14.3). Рибулозо-5-фосфат під дією *епімерази* перетворюється на ксилулозо-5-фосфат, який в результаті реакції, що каталізується *пентозофосфокетоллазою*, розщеплюється з утворенням гліцеральдегідфосфату та ацетилфосфату. З гліцеральдегідфосфату через піруват утворюється молочна кислота, а ацетилфосфат відновлюється через ацетил-CoA та ацетальдегід до етанолу. Такий тип бродіння є характерним для *Leuconostoc mesenteroides*.

Інші гетероферментативні бактерії переводять частково чи повністю ацетилфосфат в оцтову кислоту, що супроводжується утворенням АТФ. У цьому разі надлишок водню передається на глюкозу, яка відновлюється до маніту. З гліцеральдегідфосфату через піруват утворюється лактат.

Зброджування фруктози здійснюється за рівнянням



Фруктоза при цьому служить акцептором надлишкових відновлювальних еквівалентів і відновлюється до маніту.

Гетероферментативне молочнокисле бродіння здійснюють *Leuconostoc mesenteroides*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Bifidobacterium bifidum*.

Бродіння, яке здійснюється *Bifidobacterium bifidum*. Ця бактерія отримала назву за свою V- та Y-подібну форму (*lat. bifidus* — роздвоєний). Вона відома тим, що переважає в кишечнику немовлят. Всі представники роду *Bifidobacterium* є строгими анаеробами, вони ростуть в атмосфері, яка містить 10 %  $\text{CO}_2$ . Біфідобактерії розщеплюють глюкозу на молочну кислоту та ацетат. Причому вони не мають ні альдолази, ні глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. У цих бактерій глюкоза перетворюється на фруктозо-6-фосфат гліколітичним шляхом, а потім фруктозо-6-фосфат за допомогою активних фосфокетолаз перетворюється на ацетилфосфат і ксилулозо-5-фосфат. Ксилулозо-5-фосфат у свою чергу дає ацетилфосфат і гліцеральдегідфосфат. Ацетилфосфат відновлюється до ацетату, а гліцеральдегідфосфат через піруват — до лактату.

#### 14.3.4. Використання молочнокислих бактерій

Розмножуючись, молочнокислі бактерії сильно знижують рН (до значень, менших за 5,0) і тим самим пригнічують ріст

інших анаеробних бактерій. Завдяки такій стерилізувальній і консервуючій дії вони використовуються в домашньому та сільському господарстві, молочній промисловості. У домашньому господарстві, насамперед для квашення капусти, у молочній промисловості — для виготовлення заквасок з метою одержання молочнокислих продуктів (сметана, кефір, йогурти, ряжанка та ін).

Виготовлення силосу. Для виготовлення силосу використовуються молочнокислі бактерії, які живуть на рослинах та їх залишках. Для цього використовують листя цукрових буряків, кукурудзи, картоплі, трави та люцерни. Рослинну масу пресують, додають меласу (з метою підвищення співвідношення вуглець/азот), підкислюють з метою створення сприятливих для росту молочнокислих бактерій умов. У таких умовах відбувається контрольоване молочнокисле бродіння.

## 14.4. ПРОПІОНОВОКИСЛЕ БРОДІННЯ ТА ПРОПІОНОВОКИСЛІ БАКТЕРІЇ

### 14.4.1. Характеристика пропіоновокислих бактерій

Ці бактерії існують у рубці та кишечнику жуйних тварин (корови, вівці), де вони беруть участь в утворенні жирних кислот, головним чином, пропіонової та оцтової. Завдяки цим бактеріям молочна кислота, яка утворюється в результаті різних видів бродіння, перетворюється на пропіонову. Пропіоновокислі бактерії не зустрічаються в молоці, у ґрунті, у водоймах. Рід *Propionibacterium* складається з грам-позитивних нерухомих паличок, які не утворюють спор. Ці бактерії не переносять присутності кисню, ростуть в анаеробних умовах, регенерують АТФ за рахунок бродіння. На основі таких ознак їх довго вважали організмами, які obligатно здійснюють бродіння. Проте у них були виявлені такі ферменти, як каталаза та цитохроми. Пізніше було встановлено, що представники роду *Propionibacterium* здатні рости і в аеробних умовах (за слабкої аерації), але при цьому треба мати на увазі, що кисень все-таки є для них токсичним. Таким чином, щодо кисню пропіоновокислі бактерії є *мікроаеротолерантними* організмами. Крім роду *Propionibacterium*, до пропіоновокислих бактерій відносять *Vellonella alcalescens*, *Clostr-*

*ridium propionicum*, представників родів *Selenomonas*, *Microthoropsis*. В анаеробних умовах ці бактерії зброджують сахарозу, глюкозу, лактозу, пентози, а також малат, лактат, гліцерин та інші субстрати з утворенням пропіонової кислоти. Розщеплення гексоз здійснюється гліколітичним шляхом.

#### 14.4.2. Утворення пропіонової кислоти

Відновлення лактату чи пірувату до пропіонової кислоти відбувається **метилмалоніл-КоА-шляхом** (рис. 14.4).

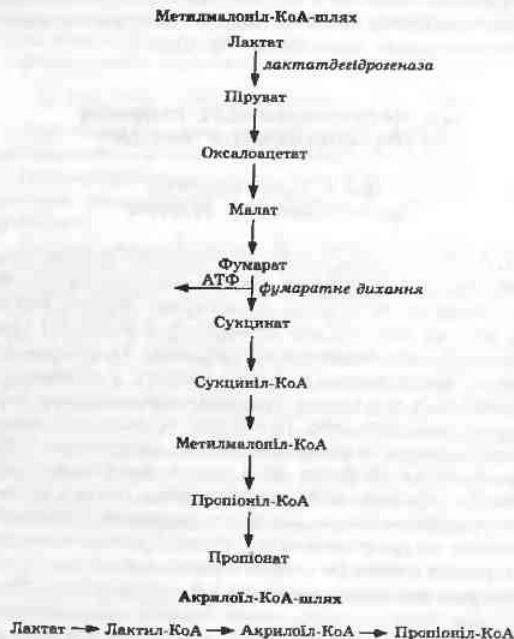


Рис. 14.4. Пропіоновокисле бродіння

Спочатку піруват перетворюється на оксалоацетат, який відновлюється через малат і фумарат до сукцинату. Транспорт електронів на цій ділянці спряжений з фосфорилюванням (фумаратне дихання). Далі сукцинат трансформується у сукциніл-КоА та метилмалоніл-КоА, у процесі декарбоксилювання якого утворюється пропіоніл-КоА.

Таким шляхом пропіонат утворюється у більшості пропіоновокислих бактерій, а також у *Veillonella alcalescens*, *Selenomonas ruminantium*.

Пропіоніл-КоА може утворюватись також **акрилоїл-КоА-шляхом** (див. рис. 14.4). Проміжним продуктом при цьому є похідне акрилоїл-кислоти — акрилоїл-КоА. Так відбувається утворення пропіонату у *Clostridium propionicum*, *Bacteroides rumicola*, *Megasphaera elsdenii*.

### 14.5. МУРАШИНОКИСЛЕ БРОДІННЯ ТА РОДИНА ENTEROBACTERIACEAE

#### 14.5.1. Характеристика ентеробактерій

Деякі мікроорганізми, які утворюють у процесі бродіння кислоти, об'єднують в одну фізіологічну групу на тій підставі, що характерним, хоча і не основним, продуктом бродіння у них є мурашина кислота. Оскільки деякі типові представники цієї групи існують у кишечнику, вся родина має назву Enterobacteriaceae. Це грамнегативні, активно рухливі, що не утворюють спор палички з перитрихіальним джгутикуванням. Факультативні аероби, здатні одержувати енергію як у процесі дихання (аеробні умови), так і у процесі бродіння (анаеробні умови). Дуже невибагливі щодо живлення: ростуть на простих мінеральних середовищах.

*Escherichia coli* — мешканець кишечника, проте за кількістю не є основним (у кишковій мікрофлорі переважають *Bacteroides* і *Bifidobacterium*). Ця бактерія тривалий час зберігає життєздатність і поза кишечником. Цим користуються для виявлення забрудненості питної води фекаліями.

До нормальної кишкової мікрофлори належать також *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes*. До родини Enterobacteriaceae належать бактерії роду *Erwinia* — фітопатогенні бактерії, які уражують стебла, листя та корені рослин. *Klebsiella pneumoniae* —

збудник пневмонії. *Salmonella typhimurium* — найпоширеніша бактерія, яка викликає гастроентерит (подрозання слизової оболонки травного тракту зумовлене ліпополісахаридними токсинами, що синтезуються цією бактерією). *Vibrio cholerae* — збудник холери, він не належить до родини Enterobacteriaceae, але близький до її представників за типом метаболізму.

**Аналіз питної води.** Основна мета аналізу питної води — виявлення *Escherichia coli*. Ця бактерія є нормальним і безпечним мешканцем кишечника, і її присутність у воді не є небезпечною. Проте з *Escherichia coli* у кишечнику можуть міститися і патогенні бактерії. Разом з *Escherichia coli* вони виділяються з калом хворих і потрапляють у питну воду. Щоб не застосовувати спеціальних методів для виявлення кожної з груп можливих патогенних бактерій, користуються загальним індикатором забруднення, яким і є постійний мешканець кишечника *Escherichia coli*. Виявлення цього виду у пробі води свідчить про те, що вода забруднена екскрементами та кишковими бактеріями, серед яких можуть бути і патогенні форми. Нормою для питної води вважається, коли загальна кількість бактеріальних клітин у 1 мл не перевищує 100, при цьому в 100 мл води не повинно бути жодної клітини *Escherichia coli*.

Для виявлення *Escherichia coli* використовують середовище з лактозою. Крім *Escherichia coli*, на лактозі можуть рости також інші бактерії групи кишкової палички (*Enterobacter aerogenes*), а також молочнокислі бактерії. Проте на середовищі з лактозою, пептоном, еозиним і метиленовим синім *Escherichia coli* утворюють колонії темно-синього кольору з металевим блиском (*Enterobacter aerogenes* утворює рожеві колонії без металевго блиску).

#### 14.5.2. Продукти бродіння та метаболічні шляхи

Катаболізм гексоз здійснюється гліколітичним шляхом, дуже рідко — у пентозофосфатному циклі. Катаболізм глюкози здійснюється КДФГ-шляхом. Залежно від того, які продукти бродіння утворюються, розрізняють два типи мурашинокислого бродіння: 1) бродіння, характерне для *Escherichia coli*, — утворюються головним чином кислоти (мурашина, оцтова, бурштинова, молочна) і зовсім не утворюється бутандіол; 2) бродіння, характерне для *Enterobacter*, — основним продуктом є бутан-

діол, кислоти посідають друге місце. Ці типи бродіння відрізняються за реакціями, пов'язаними з перетвореннями пірвату.

**Особливості бродіння *Escherichia coli*.** Такими особливостями є:

1) розщеплення пірвату на ацетил-КоА та форміат (мурашина кислота); 2) розкладання форміату на  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ ; 3) відновлення ацетил-КоА до етанолу; 4) утворення сукцинату як продукту фумаратного дихання; 5) відсутність здатності утворювати з пірвату ацетоїн і бутандіол (рис. 14.5).

**Особливості бродіння *Enterobacter aerogenes*.** Ацетоїн утворюється з двох молекул пірвату (див. рис. 14.5). Цей про-

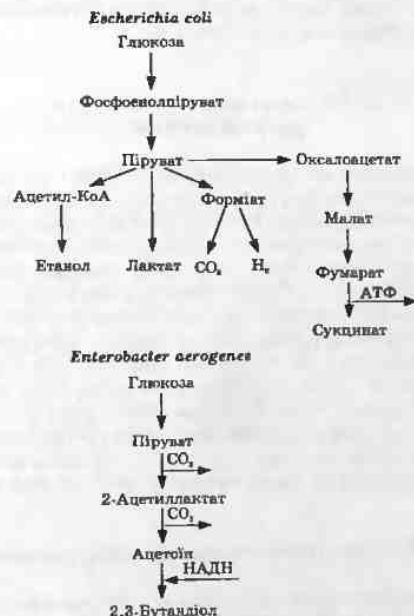


Рис. 14.5. Мурашинокисле бродіння

цес складається з двох реакцій декарбоксилювання з виділенням  $\text{CO}_2$ . Саме таке інтенсивне газовиділення дало назву цій бактерії. Проміжним продуктом є ацетиллактат. 2,3-Бутандіол утворюється при відновленні ацетоїну за участю НАДН.

#### 14.6. МАСЛЯНОКИСЛЕ ТА АЦЕТОНО-БУТИЛОВЕ БРОДІННЯ. КЛОСТРИДІЇ

Масляна кислота (бутират), *n*-бутанол, ацетон, пропанол є типовими продуктами бродиння анаеробних спороутворювальних бактерій (клостридій). Разом з клостридіями розглянемо також деякі спеціалізовані види бактерій, які утворюють у процесі зброджування аналогічні продукти.

##### 14.6.1. Характеристика бактерій роду *Clostridium*

Цей рід належить до родини Bacillaceae. Як і інші представники цієї родини (*Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina*), клостридії є грампозитивними. Рухливі (перитрихально розміщені джгутики), вегетативні клітини паличкоподібні, спори змінюють форму материнської клітини, оскільки їх діаметр є більшим за товщину самої клітини. Спори є терморезистентними.

Клостридії відзначаються різко вираженим **бродинним типом метаболізму**. Вони ростуть тільки в анаеробних умовах, хоча серед них є веротолерантні види. Із запасних речовин характерними є крохмалеподібні полісахариди. Температурний оптимум становить 30–40 °C, є термофільні види (*Clostridium thermoaceticum*). Оптимальним рН є нейтральне або лужне.

За здатністю використовувати різні субстрати клостридії можна поділити на дві групи: **цукролітичні** та **пептолітичні**.

##### 14.6.2. Зброджування глюкози клостридіями

Катаболізм глюкози здійснюється гліколітичним шляхом. Водень, що утворюється у процесі дегідрування гліцеральдегідфосфату, переноситься на органічні кислоти або кетони, які

утворюються з пірувату або ацетил-КоА. Типовим для клостридій процесом зброджування глюкози є бродиння, характерне для *Clostridium butyricum* і *Clostridium acetobutyricum* (рис. 14.6).



Рис. 14.6. Зброджування глюкози *Clostridium butyricum* та *Clostridium acetobutyricum*

Утворення **бутирату** починається з конденсації двох молекул ацетил-КоА і утворенням ацетоацетил-КоА, який потім відновлюється до β-оксибутирил-КоА і бутирил-КоА. Із ацетил-КоА за участю **фосфотрансацетилази** та **ацетаткінази** може утворюватись вільний ацетат, а також молекула АТФ. У міру утворення ацетату та бутирату і зумовленого накопиченням цих кислот підкислення середовища починають синтезуватись ферменти, що каталізують утворення **ацетону** та **бутанолу**. Ацетоацетил-КоА трансформується в ацетоацетат, декарбоксилювання якого дає ацетон. За відновлення ацетону утворюється пропанол. Відновлення бутирил-КоА дає бутанол. У процесі зброджування глюкози клостридіями може також утворюватись і етанол (за відновлення ацетил-КоА). **Молекулярний водень** може виділятися із НАДН, одержаного дегідруванням гліцеральдегідфосфату та окисненням пірувату. Чим більше молекулярного водню буде одержано, тим менше потрібно синтезувати органічних акцепторів водню (ацетоацетил-КоА).



Оскільки ацетон, 2-пропанол та бутанол є важливими органічними розчинниками, бродіння, яке здійснюється клостридіями, має велике технічне значення.

#### 14.6.3. Зброджування клостридіями субстратів, відмінних від глюкози

Етанол та ацетат. *Clostridium kluyveri* здатна зброджувати суміш етанолу й ацетату до бутирату та молекулярного водню (рис. 14.7). Ацетат є додатковим акцептором водню, він утворюється у процесі бродіння. АТФ синтезується тільки в ацетаткіназній реакції.

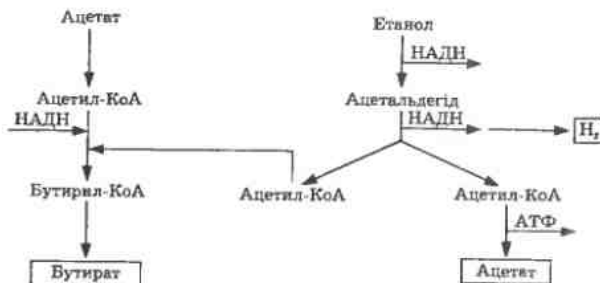


Рис. 14.7. Зброджування етанолу та ацетату *Clostridium kluyveri*

Глутамінова кислота. Зброджування глутамінової кислоти здійснюють бактерії *Clostridium tetanomorphum*. Це бродіння привернуло до себе увагу тим, що під час його дослідження була встановлена біохімічна функція вітаміну  $B_{12}$ . У процесі зброджування глутамату утворюються бутират, ацетат, аміак,  $CO_2$  та молекулярний водень (рис. 14.8). Шлях катаболізму глутамату складається з ряду незвичних реакцій — утворення метиласпаргінової кислоти (за участю кофермента — похідного вітаміну  $B_{12}$ ). На наступній стадії — утворення метилфумарату — відбувається дезамінування. Метилмалат розщеплюється на ацетат і піруват. Ацетат виділяється, а піруват перетворюється на  $CO_2$  та бутират, як показано на рис. 14.6.

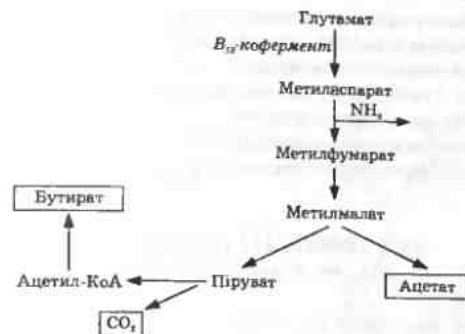


Рис. 14.8. Зброджування глутамату *Clostridium tetanomorphum*

Спряжене зброджування двох амінокислот (реакція Стікленда). Пептолітичні клостридії гідролізують білки і потім використовують амінокислоти. Більшість амінокислот зброджуються не окремо, а разом з якими-небудь іншими. Як встановив американський учений Л.Г. Стікленд (1934 р.), *Clostridium sporogenes* зброджує суміш аланіну та гліцину, але не може використовувати жодну з цих кислот окремо. Продуктами бродіння є ацетат, аміак і  $CO_2$ . Аланін є донором водню, а гліцин — акцептором. Амінокислота-донор дезамінується і перетворюється на оксокислоту. Оксокислота в результаті окиснювального декарбоксилювання перетворюється на жирну кислоту. Цей етап спряжений із фосфорилуванням і являє собою реакцію, яка постачає енергію.

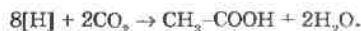
#### 14.6.4. Клостридії — збудники захворювань

Деякі пептолітичні клостридії можуть бути збудниками інфекційних хвороб у разі поранень (газова гангрена та правець), а також причиною харчових отруєнь. Якщо спори *Clostridium histolyticum* і *C. septicum* (спори цих бактерій дуже поширені в ґрунті) потрапляють у відкриту рану, до якої немає доступу повітря або в якій аеробні бактерії, розмножуючись, створюють анаеробні умови, то клостридії починають рости, розщеплювати за допомогою протеаз колаген та інші білки і здійснювати бродіння.

Найважчу форму харчового отруєння — ботулізм — спричиняє *Clostridium botulinum*. Ця ґрунтова бактерія може розвиватися в недостатньо простерилізованих м'ясних продуктах і бобових консервах. Утворюваний нею токсин у разі споживання ураженого продукту може спричинити смерть внаслідок нервового паралічу, зокрема паралічу дихання. Проте цей токсин є термолабільним та інактивується при кип'ятінні впродовж 15 хвилин.

#### 14.7. ГОМОАЦЕТАТНЕ БРОДІННЯ. CO<sub>2</sub> ЯК АКЦЕПТОР ВОДНЮ

Деякі клостридії (*C. thermoaceticum*, *C. formicoaceticum*, *C. cylindrosporum*) здатні переносити водень, відщеплений від субстрату в початкових реакціях окиснення, тільки на CO<sub>2</sub>, утворюючи при цьому ацетат:



Глюкоза окиснюється гліколітичним шляхом до пірувату. Піруват за допомогою *піруват:фредоксин-оксидоредуктази* розщеплюється на ацетил-КоА, CO<sub>2</sub> та відновлений фредоксин. Із ацетил-КоА через ацетилфосфат утворюється ацетат і АТФ. Акцепторами водню є CO<sub>2</sub>, при цьому також утворюється ацетат.

#### 14.8. ЗБРОДЖУВАНІ ТА НЕЗБРОДЖУВАНІ ПРИРОДНІ СПОЛУКИ

Більшість природних сполук, що складаються з вуглецю, водню, кисню та/або азоту, піддаються збродженню в анаеробних умовах. Зброджуються полісахариди, гексози, пентози, багатомісні спирти, органічні кислоти, амінокислоти (за винятком ароматичних), пурини та піримідини.

Не можуть зброджуватися насичені аліфатичні та ароматичні вуглеводні, стероїди, каротиноїди. Однією з причин цього є те, що ці сполуки можуть окиснюватися тільки в присутності молекулярного кисню за участю оксигеназ. Очевидно, завдяки такій стабільності вуглеводні так довго зберігаються на нафтових родовищах.

Узагальнена схема найважливіших бродінь показана на рис. 14.9.

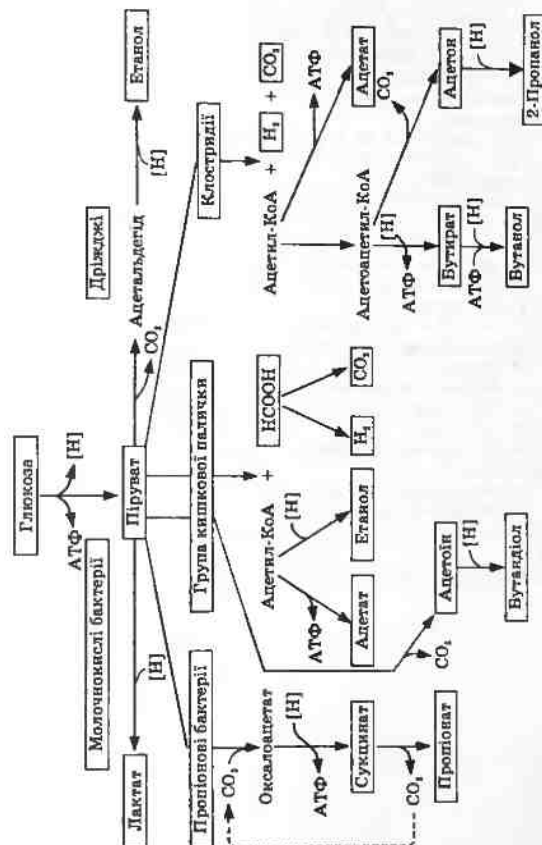


Рис. 14.9. Узагальнена схема найважливіших типів бродіння

## Контрольні запитання до розділу 14

1. Який метаболічний процес називається бродінням? Які особливості притаманні бродінню?
2. Чому у процесі бродіння спостерігається слабкий ріст мікроорганізмів?
3. Яка максимальна кількість молекул АТФ може синтезуватися у процесі бродіння і за якими механізмами?
4. За яких умов у процесі бродіння може утворюватися додатковий АТФ в ацетаткіназній реакції?
5. Чим відрізняється бродильний тип метаболізму від метаболізму веро-бних гетеротрофів?
6. Які мікроорганізми можуть здійснювати спиртове бродіння?
7. Назвіть форми спиртового бродіння за Нейбергом. У чому полягає суть ефекту Пастера?
8. Які особливості притаманні молочнокислому та пропіоновокислому бродінню?
9. Охарактеризуйте представників родини *Lactobacillaceae*.
10. Які бактерії належать до родини *Enterobacteriaceae*?
11. Назвіть два типи мурашникислого бродіння. Які продукти при цьому утворюються?
12. Як здійснюється санітарний аналіз питної води?
13. Дайте характеристику пропіоновокислих бактерій.
14. На прикладі молочнокислих і пропіоновокислих бактерій поясните різницю між таксономічною та фізіологічною групою мікроорганізмів.
15. Охарактеризуйте бактерії роду *Clostridium*. Яке бродіння здійснюють ці бактерії?
16. Як відбувається зброджування клостридіями  $C_2$ -сполук та глутамінової кислоти?
17. У чому полягає суть реакції Стікленда?
18. Які бактерії здійснюють гомоцетатне бродіння?
19. Чому ароматичні амінокислоти та парафіни не піддаються зброджуванню?
20. Яка роль процесів бродіння у природі?

## 15. ПЕРЕНЕСЕННЯ ЕЛЕКТРОНІВ В АНАЕРОБНИХ УМОВАХ (АНАЕРОБНЕ ДИХАННЯ)

У результаті фосфорилювання, спряженого з перенесенням електронів у процесі дихання аеробних мікроорганізмів, утворюється набагато більше АТФ, ніж при субстратному фосфорилюванні, яке відбувається під час бродіння. Тому не дивно, що в процесі еволюції виник і зберігся такий тип метаболізму, у якому водень від органічного субстрату переноситься на "зв'язаний" кисень (нітрат, сульфат, карбонат та ін.); ці сполуки відновлюються воднем субстрату. Здатність переносити електрони на такі сполуки дає бактеріям змогу окиснювати субстрати без участі молекулярного кисню і одержувати більше енергії, ніж це можливо у процесі бродіння.

Такі бактерії мають систему транспорту електронів, містять цитохроми. Одержання енергії фосфорилюванням, спряженим з перенесенням електронів на такі термінальні акцептори, як нітрат, сульфат тощо, називають *анаеробним диханням*. Залежно від природи неорганічного акцептора водню розрізняють *нітратне, сульфатне, карбонатне* та інше дихання (рис. 15.1).

### 15.1. ДЕНІТРИФІКАЦІЯ ТА ВІДНОВЛЕННЯ НІТРАТУ

Мікроорганізми використовують нітрат:

1) для синтезу азотмісних клітинних компонентів. Така *асиміляційна нітратредукція* може відбуватися як в аеробних, так і в анаеробних умовах;

2) для нітратного дихання (*дисиміляційна нітратредукція*), при цьому нітрат в анаеробних умовах є термінальним акцептором водню (електронів).

В обох цих випадках нітрат спочатку відновлюється до нітри-ту за допомогою *нітратредуктази*.



Рис. 15.1. Процеси одержання енергії окиснювальним фосфорилюванням в аеробних та анаеробних умовах (аеробне та анаеробне дихання)

У процесі асиміляційної нітратредукції утворений нітрит відновлюється до аміаку за допомогою *нітритредуктази*, на що витрачається шість електронів. Електрони надходять від НАД(Ф)Н (у грибів і бактерій) або ферредоксину (у рослин і деяких бактерій). Аміак використовується для синтезу клітинних компонентів.

Денітрифікуючі бактерії здатні відновлювати нітрат через нітрит до газоподібного закису азоту ( $\text{N}_2\text{O}$ ) та азоту ( $\text{N}_2$ ). Цей процес *денітрифікації* виявлений тільки у *факультативних аеробів*. Деякі денітрифікатори можуть рости, використовуючи як термінальний акцептор водню не тільки нітрат, а й нітрит, а також іноді й закис азоту. Представниками денітрифікуючих бактерій є ґрунтові бактерії, наприклад, *Paracoccus denitrificans*.

Збіднення ґрунту азотом внаслідок денітрифікації. Тимчасові втрати азоту на обмежених ділянках ґрунту пов'язані з діяльністю денітрифікуючих бактерій. Активно цей процес відбувається, коли в ґрунті створюються анаеробні умови (наприклад, застійне перезволоження), особливо при застосуванні у цей період органічних добрив і нітратів. Нітрит, який утворюється з нітрату у процесі денітрифікації, акумулюється в стічних водах, а також може потрапляти і в питну воду.

**Значення денітрифікації у природі.** Денітрифікація — єдиний біологічний процес, завдяки якому зв'язаний азот перетворюється на вільний молекулярний азот. З глобальної точки зору цей процес має вирішальне значення для збереження життя на земній суші. У ґрунтах і водоймах, які нормально аеруються, нітрат є кінцевим продуктом мінералізації. Завдяки своїй високій розчинності у воді і слабкому зв'язуванню ґрунтом нітрат-іони вимивались би з ґрунтів і накопичувались у морській воді. Це призвело б до того, що вміст молекулярного азоту в атмосфері почав би зменшуватися, і процеси росту рослин і продукції біомаси на суші кінцем кінцем припинилися б.

## 15.2. УТВОРЕННЯ СІРКОВОДНЮ У ПРОЦЕСІ ВІДНОВЛЕННЯ СУЛЬФАТУ

Сульфатредукуючі (сульфатовідновлювальні) бактерії характеризуються здатністю до перенесення водню на сульфат як термінальний акцептор електронів і таким чином до відновлення сульфату до сульфідів. Цей процес називається *сульфатним диханням*, або *дисиміляційною сульфатредукцією*. Основним продуктом цього процесу є сірководень. Більша частина сірководню, який є в природі, утворюється завдяки життєдіяльності бактерій-сульфатредукторів.

**Характеристика сульфатовідновлювальних бактерій.** Сульфатредукуючі бактерії — це фізіологічна група, для якої характерним є здатність до утворення сірководню з сульфату. Сульфатовідновлювальні бактерії, на відміну від нітратредукторів, є **облігатними анаеробами**. Донорами водню служать прості низькомолекулярні сполуки, які утворюються внаслідок анаеробного розкладання біомаси (в основному целюлози): лактат, ацетат, пропіонат, бутират, форміат, етанол, вищі жирні кислоти, молекулярний водень. За ступенем засвоєння органічних кислот розрізняють дві групи сульфатредукторів:

1) окиснюють донор не повністю та виділяють окиснювальну кислоту. Такими є представники споруутворювального роду *Desulfotomaculum* (наприклад, *D. nigrificans*) та неспоруутворювального роду *Desulfovibrio* (*D. vulgaris*, *D. desulfuricans*). Ці бактерії не мають повного циклу трикарбонних кислот;

2) частина представників цієї групи може рости, використовуючи спирти, ацетат, вищі жирні кислоти або бензоат, тобто є **хемоорганогетеротрофами**, а інші здатні навіть до **хемолітоавтотрофного** росту у присутності водню та форміату. Деякі штами здатні синтезувати клітинні компоненти з ацетату, якщо донором водню служить  $H_2$ , тобто є **хемолітогетеротрофами**. До них належать споруутворювальні (*Desulfotomaculum acetoxidans*) та неспоруутворювальні палички (*Desulfohalobacter*), коки (*Desulfococcus*), сарцини (*Desulfosarcina*), нитчасті форми, які рухаються ковзанням (*Desulfonema*), та ін.

Деякі сульфатредуктори можуть рости у присутності  $H_2$  і сульфату як єдиних джерел енергії. Здатність же до відновлення сульфату за допомогою молекулярного водню і утворення при цьому великих кількостей сірководню, не пов'язаного з помітним ростом, є характерною для більшості сульфатредукторів.

**Асиміляційна та дисиміляційна сульфатредукція.** Майже всі бактерії, гриби та зелені рослини здатні використовувати як джерело сірки сульфат. Вони одержують із сульфату сульфід, необхідний для синтезу сірковмісних амінокислот, шляхом **асиміляційної сульфатредукції** (рис. 15.2). Сульфат двічі активується за рахунок АТФ з утворенням аденозин-5-фосфосульфату (АФС) та фосфаденозин-5-фосфосульфату (ФАФС) (ферменти АТФ-сульфурилаза, АФС-кіназа). Лише цей двічі активований сульфат може відновлюватись спочатку до сульфіту (ФАФС-редуктаза), а потім до сульфіду (сульфітредуктаза).

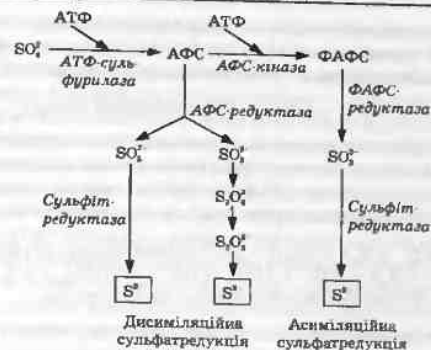


Рис. 15.2. Схема дисиміляційної та асиміляційної відновлення сульфату

Перший етап **дисиміляційної** сульфатредукції є аналогічним процесу асиміляції сульфату (утворення активованого аденозинфосфосульфату). Далі АФС відновлюється (фермент АФС-редуктаза), причому відновлення може відбуватися двома шляхами: 1) за допомогою **сульфітредуктази** сульфат прямо (без утворення проміжних продуктів) відновлюється до сульфіду, на що витрачається шість електронів; 2) послідовне триетапне відновлення з утворенням проміжних продуктів таких, як тритіонат і тіосульфід.

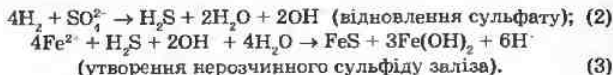
**Сіркове дихання.** Бактерія *Desulfuromonas acetoxidans* здатна використовувати елементарну сірку як акцептор водню у процесі анаеробного перенесення електронів. Сірка при цьому відновлюється до сірководню. Ця виділена з морської води бактерія здатна повністю (до  $CO_2$  та води) окиснювати етанол та ацетат.

**Поширення та роль сульфатредукторів у природі.** Сульфатредуктори зустрічаються в основному в сірководневому мулі, де органічні речовини піддаються анаеробному розкладанню. Основну масу сірководню, утвореного в природі, слід вважати кінцевим продуктом сульфатного дихання. Більшість **сіркових родовищ** мають невулканічне походження. Це так звана біогенна сірка, яка утворилася шляхом відновлення сульфатів морської води за допомогою сульфатредукуючих бактерій.

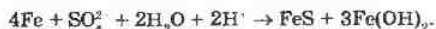
Результатом життєдіяльності сульфатредукторів є так звана **анаеробна корозія заліза** (мікробна корозія). Відомо, що у вологому середовищі іонізація заліза може відбуватися і в анаеробних умовах:



Плівка з молекулярного водню захищає залізо від подальшого руйнування. Проте у присутності сульфатредукторів і за наявності у середовищі сульфатів відбувається катодна деполізація, і залізо окиснюється навіть у відсутності кисню:



Сумарна реакція рівнянь (1)–(3) може бути наведена у вигляді



Зумовлене такою корозією пошкодження залізних труб є дуже збитковим.

Сульфатредуктори є відповідальними за високий вміст сірководню в глибинних шарах (понад 200 м) Чорного моря.

### 15.3. УТВОРЕННЯ МЕТАНУ У ПРОЦЕСІ ВІДНОВЛЕННЯ КАРБОНАТУ

Метан утворюється в результаті анаеробного розкладання органічних речовин. Його запаси є досить значними. Розрахунки показують, що близько 1,5 % вуглецю, який надходить в атмосферу у вигляді  $\text{CO}_2$  в результаті мінералізації органічних речовин, спочатку потрапляє туди у вигляді метану і тільки потім під дією гідроксильних радикалів перетворюється на  $\text{CO}$ , а далі — на  $\text{CO}_2$ . До екосистем, у яких утворюється метан, належать тундри та болота (інша назва метану — болотний газ), рисові поля, осади на дні озер і ставків, лимани, відстійники очисних споруд, а також шлунки (рубці) жуйних тварин. В анаеробних умовах органічні речовини спочатку зброджуються до ацетату,  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ . Ці продукти метаболізму використовуються метаноутворювальними (метаногенними) бактеріями.

**Характеристика метаногенів.** За морфологією метаноутворювальні бактерії можна поділити на паличкоподібні (*Methano-*

*bacterium*), кокоподібні (*Methanococcus*), сарциноподібні (*Methanosarcina*), спірілоподібні (*Methanospirillum*).

Метаногени відрізняються від інших бактерій не тільки тишем метаболізму, а й за складом клітинних структур. У них немає типового пептидогліканового скелета, тому пеніцилін не пригнічує їх ріст. Цитоплазматична мембрана містить ліпід, які складаються з ефірів гліцерину та ізопреноїдних вуглеводнів. Рибосоми за своєю величиною подібні до таких у еубактерій (70S), проте послідовність 16S рРНК зовсім інша, ніж у еубактерій. Механізм трансляції є нечутливим до дії антибіотиків, що пригнічують синтез білка в еубактерій. Метаногени відносять до окремого царства архебактерій.

Метаногени — строгі анаероби, кисень повітря їх вбиває. Тільки після розробки методу Хангейта з'явилась можливість пересівати та виділяти ці бактерії. Більшість відомих метаногенів здатні використовувати  $\text{H}_2$  як донор водню, а деякі з них — також форміат, метанол, ацетат або метиламін. У ряді анаеробних екосистем основним субстратом для утворення метану є ацетат.

Метаногени є останньою ланкою **анаеробного харчового ланцюга** (рис. 15.3). У цьому ланцюгу беруть участь також: 1) бактерії, які зброджують целюлозу до сукцинату, пропіонату, бутирату, лактату, ацетату, спиртів,  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ ; 2) ацетогенні бактерії, які зброджують ці первинні продукти бродиння до ацетату, форміату,  $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ . Ці речовини служать субстратами для метаногенів.

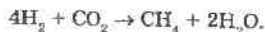
**Карбонатне дихання.** Метаногени тісно взаємодіють із бактеріями, які виділяють водень. Вони здатні активувати водень і здійснювати його окиснення, спряжене з відновленням  $\text{CO}_2$ . Клітинні речовини можуть синтезуватися з  $\text{CO}_2$  як єдиного джерела вуглецю, тому спосіб існування цих бактерій можна розглядати як **хемолітотрофний**. Отже, для метаногенів  $\text{CO}_2$  є джерелом вуглецю та термі-



Рис. 15.3. Анаеробний харчовий ланцюг



нальним акцептором електронів, а  $H_2$  є донором водню. Джерелом енергії є  $CO_2$  та  $H_2$ . При цьому утворюється метан:



Метаноутворення за аналогією з іншими видами дихання можна назвати *карбонатним диханням*.

У біохімічному перетворенні водню та вуглекислого газу на метан бере участь ряд коферментів і простетичних груп, які виявлені тільки у метаногенів (метаноптерин, метанофуран, кофермент М, фактори  $F_{420}$  та  $F_{430}$ ). Автотрофна фіксація  $CO_2$  у метаногенів (як і у сульфатредукторів та ацетогенних анаеробів) відбувається через синтез ацетил-КоА та піруват.

Практичне значення метаногенів. Метан, який утворюється метаногенами, використовується як паливо (біогаз). У сільському господарстві використовують біогаз-ферментатори, а також ями для перегною, щоб зброджувати для одержання метану екскременти тварин разом з відходами, що містять целюлозу.

#### 15.4. УТВОРЕННЯ АЦЕТАТУ У ПРОЦЕСІ ВІДНОВЛЕННЯ КАРБОНАТУ

У різних місцях, де утворюється метан, утворюється також оцтова кислота. Ацетогенні бактерії здатні перетворювати  $CO_2$  та  $H_2$  на ацетат згідно з рівнянням



Ацетогенні бактерії (*Clostridium acetium*, *Clostridium thermoaceticum*, *Acetobacterium woodii*) слід розглядати як анаеробні хемолітотрофні організми, здатні окиснювати водень і одержувати енергію шляхом анаеробного *карбонатного* дихання. Синтез клітинного матеріалу з  $CO_2$  відбувається через ацетил-КоА та піруват (як у метаногенів).

#### 15.5. УТВОРЕННЯ СУКЦИНАТУ У ПРОЦЕСІ ВІДНОВЛЕННЯ ФУМАРАТУ

Утворення сукцинату з фумарату може бути спряжене з окиснювальним фосфорилуванням. Фумаратне дихання (фосфорилу-

вання з фумаратом як термінальним акцептором електронів) дуже поширене у анаеробних хемоорганотрофних бактерій. Причому функція фумарату не зводиться до ролі простого акцептора, який взаємодіє з НАДН, що утворився у процесі окиснення гексоз. Для пари фумарат/сукцинат окисно-відновний потенціал становить  $-30$  мВ ( $-0,03$  В). Тому фумарат може акцептувати електрони, які постачаються коферментами-переносниками водню і які вже пройшли частину шляху по дихальному ланцюгу. Це робить можливим окиснювальне фосфорилування.

Фумаратне дихання є характерним, наприклад, для ентеробактерій. Так, додавання фумарату в поживне середовище супроводжується прискоренням росту і підвищенням виходу біомаси. Це вказує на те, що фумарат робить можливою ефективну регенерацію АТФ. Можна вважати, що у більшості процесів бродіння, пов'язаних з утворенням сукцинату, відбувається фумаратне дихання, що приводить до додаткового утворення АТФ. До таких процесів належать утворення сукцинату у *Escherichia coli* та пропіонату у *Propionibacterium*. Фумаратне дихання зустрічається не тільки у прокариот. Воно є характерним для деяких нижчих тварин (наприклад, факультативно-анаеробних черв'яків).

#### 15.6. ВІДНОВЛЕННЯ ІОНІВ Fe (III) ДО Fe (II)

Змішані популяції ґрунтових бактерій в анаеробних умовах відновлюють іони Fe (III) до Fe (II). Якщо в середовищі, крім Fe (III), є також іони нітрату та нітриту, то спочатку відбувається процес денітрифікації (відновлення нітрату до нітриту та молекулярного азоту), і тільки після цього — відновлення іонів Fe (III). Передбачається, що перенесення електронів на Fe (III) здійснює *нітратредуктаза*. Оскільки відновлення нітрату спряжене з окиснювальним фосфорилуванням, то, очевидно, і відновлення Fe (III) може використовуватися в процесі анаеробного дихання. Окисно-відновний потенціал пари  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  становить  $+770$  мВ, тому така реакція є термодинамічно можливою. Враховуючи те, що оксиди тривалентного заліза є практично нерозчинними у воді, вони повинні бути спочатку переведені у розчинну форму, здатну проникати всередину бактеріальної клітини. Це здійснюється, очевидно, за допомогою сірдофорів.

## Контрольні запитання до розділу 15

1. Чим відрізняється аеробне дихання від анаеробного?
2. Як відбувається дисиміляційна нітратредукція?
3. Яка роль процесів денітрифікації у природі?
4. Як відбуваються процеси асиміляційної та дисиміляційної сульфатредукції?
5. Які особливості притаманні сульфатовідновлювальним бактеріям?
6. Яка роль сульфатредукції у природі?
7. Як відбувається анаеробна корозія заліза?
8. Охарактеризуйте метаногенні бактерії. Чому вони належать до археобактерій?
9. Які бактерії здатні здійснювати карбонатне дихання?
10. Як відбувається фіксація вуглекислого газу у метаногенних бактерій?
11. Які бактерії здатні здійснювати фумаратне дихання?
12. Як відбувається процес відновлення тривалентного заліза до двовалентного за участю мікроорганізмів?

## 16. ВИКОРИСТАННЯ НЕОРГАНІЧНИХ ДОНОРІВ ВОДНЮ: АЕРОБНІ ХЕМОЛІТОТРОФНІ БАКТЕРІЇ

Багато груп ґрунтових і водних бактерій можуть використовувати як донори водню чи електронів неорганічні сполуки (іони амонію, нітриту, сульфідів, тіосульфату, сульфиту та двовалентного заліза), а також елементарну сірку, молекулярний водень і CO, тобто здатні одержувати в результаті їх окиснення відновлювальні еквіваленти та енергію для синтетичних процесів. Одержання енергії, як правило, проходить у результаті дихання з  $O_2$  як термінальним акцептором водню. Такий спосіб існування з використанням неорганічного донора водню називають *хемолітотрофізмом*. Більшість бактерій з таким типом метаболізму використовують  $CO_2$  як джерело вуглецю. Тому вони є *хемолітоавтотрофами*. Для деяких хемолітотрофних бактерій такий спосіб існування є облигатним, інші ж є факультативними хемолітотрофами, тобто здатні також і до хемоорганогетеротрофного росту.

Зворотний транспорт електронів у дихальному ланцюгу. Неорганічні субстрати (аміак, нітрит, сульфід та ін.) мають сильно позитивний окисно-відновний потенціал ( $NH_4^+/NH_2OH + 899$  мВ;  $NO_3^-/NO_2^- + 420$  мВ;  $Fe^{3+}/Fe^{2+} + 770$  мВ), у той же час окисно-відновний потенціал пари НАД/НАДН становить  $-320$  мВ. Тому їх окиснення не може бути прямо пов'язане з утворенням НАДН (як при окисненні органічних субстратів) з термодинамічних причин. Водночас НАДН необхідний цим бактеріям для процесів конструктивного метаболізму. Разом з тим було показано, що електрони, які вивільняються у процесі окиснення неорганічних субстратів, надходять у дихальний ланцюг на рівні цитохромів c або o. Отже, утворення АТФ у хемолітотрофних бактерій може здійснюватись тільки на одному-єдиному етапі окиснення. Частина цієї енергії витрачається на перенесення електронів у зворотному напрямку дихального ланцюга (у бік утворення НАДН). Отже, у цих бактерій відновлення НАД відбувається в процесі зворот-

ного транспорту електронів, на що витрачається енергія АТФ. Для аеробних хемолітоавтотрофів цей механізм є обов'язковим і необхідним для отримання відновлювальних еквівалентів, які використовуються потім у процесах біосинтезу.

Для хемолітотрофних бактерій характерним є низький рівень біомаси. Так, для синтезу 1 г клітинної біомаси аеробним хемолітоавтотрофом необхідно витратити 30–150 г первинного джерела енергії (аміаку, сульфату), в той час, як хемоорганогетеротрофам — лише близько 1–2 г субстрату (глюкози, нафти та ін.). І зрозуміло чому. Адже хемолітоавтотрофи, з одного боку, одержують мало енергії, а з другого — здійснюють так зване “холосте окиснення”, тобто окиснення субстратів без одночасного синтезу клітинних компонентів. Тому не дивно, що різні перетворення в ґрунті та воді здійснюються порівняно малою кількістю бактерій.

### 16.1. ОКИСНЕННЯ АМІАКУ ТА НІТРИТУ (НІТРИФІКАЦІЯ)

Перетворення аміаку (амонію) на нітрат — *нітрифікація* — здійснюється нітрифікуючими бактеріями. Проте немає таких бактерій, які б перетворювали аміак безпосередньо на нітрат. В його окисненні завжди беруть участь дві групи бактерій: одні окиснюють аміак, утворюючи нітрит, інші окиснюють нітрит у нітрат.

#### Нітрифікуючі бактерії

Бактерії, які окиснюють аміак (Nitroso-)	Бактерії, які окиснюють нітрит (Nitro-)
$\text{NH}_4^+ + 1\frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$	$\text{NO}_2^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$
<i>Nitrosomonas europaea</i>	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>
<i>Nitrosococcus oceanus</i>	<i>Nitrobacter agilis</i>
<i>Nitrospirilla briensis</i>	<i>Nitrospira gracilis</i>
<i>Nitrosolobus multiformis</i>	<i>Nitrococcus mobilis</i>

Нітрифікатори — грамнегативні бактерії, які належать до родин Nitrobacteriaceae. Досі їх вважали obligатними хемолітоавтотрофами, оскільки вони не використовують органічні субстрати, які були додані в поживні середовища. Проте нині існує багато сумнівів щодо obligатності нітрифікаторів. Так, виявилось, що *Nitrobacter winogradskyi* здатний використовувати ацетат для синтезу деяких клітинних речовин (білків, полі-β-оксibuтирату).

Роль процесів нітрифікації в ґрунті. У ґрунті, який інтенсивно верується, іони амонію, що вивільнюються в результаті мінералізації азотамісних речовин, швидко окиснюються. Перехід катіону ( $\text{NH}_4^+$ ) в аніон ( $\text{NO}_3^-$ ) супроводжується підкисленням ґрунту і підвищенням розчинності мінералів (солей калію, кальцію, магнію та фосфорної кислоти). Тому в нітрифікаторах убагачують важливий фактор підвищення родючості ґрунтів. Але нині ця думка змінилася. Виявилось, що іони амонію затримуються в ґрунті значно довше і краще нітрату, який легко вимивається. У зв'язку з цим з'явилася тенденція до обмеження нітрифікації в ґрунтах сільськогосподарських угідь. Вишукуються речовини, які здатні специфічно пригнічувати ріст нітрифікуючих бактерій і стати “стабілізаторами” ґрунтового азоту.

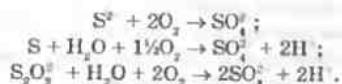
Слід враховувати, що ріст і метаболізм автотрофних нітрифікаторів проходить нормально лише за pH 7–8. Діапазон pH, в якому відбувається повна нітрифікація від аміаку до нітрату, є дуже вузьким, оскільки і аміак (за високих значень pH), і азотна кислота (за низьких значень pH) спричиняють токсичний вплив на *Nitrobacter*.

Нітрифікуючі бактерії опосередковано беруть участь у руйнуванні різних споруд, для яких будівельним матеріалом є вапняк та цемент. Це пов'язано з тим, що нітрифікатори окиснюють аміак, який є в атмосфері та екскрементах тварин, до азотної кислоти.

### 16.2. ОКИСНЕННЯ ВІДНОВЛЕНИХ СПЛУК СІРКИ

Здатність одержувати енергію в результаті окиснення відновлених сполук сірки притаманна грамнегативним бактеріям з полярно розміщеними джгутіками, які об'єднані в рід *Thiobacillus*. До цієї групи бактерій належать також представники родів *Sulfolobus*, *Thiomicrospira* (таблиця).

Більшість тіобацил окиснює різні сполуки сірки, утворюючи як кінцевий продукт сульфат:



Деякі сіркоокиснювальні бактерії є obligатними хемолітоавтотрофами, а деякі — здатні використовувати як джерело енер-

Бактерії, які окиснюють сірку та її сполуки

Бактерії	Інтервал рН для росту	Донори електронів	Автотрофія облигатна (О) чи факультативна (Ф)
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	2-5	$S^0$ , $S_2O_3^{2-}$ , S	О
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	2-6	$Fe^{2+}$ , $S_2O_3^{2-}$ , S	Ф
<i>Thiobacillus thioparus</i>	6-8	$CNS^-$ , $S_2O_3^{2-}$ , S	О
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	6-8	$CNS^-$ , $S_2O_3^{2-}$ , S	О
<i>Thiobacillus intermedius</i>	2-6	$S_2O_3^{2-}$ , S, глутамат	Ф
<i>Thiobacillus novellus</i>	6-8	$S_2O_3^{2-}$ , S, глутамат	Ф
<i>Thiomicrospira pelophila</i>	6-8	$S^0$ , $S_2O_3^{2-}$ , S	О
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	2-3	S, глутамат, пептон	Ф

гії та вуглецю, а також як донори електронів — органічні сполуки. Ці бактерії є аеробами, проте *Thiobacillus denitrificans* може використовувати як термінальний акцептор електронів, крім кисню, також і нітрат. Отже, ця бактерія може здійснювати анаеробне нітратне дихання і денітрифікувати нітрат. Але вона не здатна до асиміляційного відновлення нітрату, тому як джерело азоту їй потрібен тільки аміак (солі амонію).

*Thiobacillus thiooxidans* утворює великі кількості сірчаної кислоти і добре переносить низькі значення рН. Клітини не втрачають життєздатності навіть у 1 н. розчині сірчаної кислоти. Такі властивості цих бактерій використовуються в сільському господарстві з метою зниження лужності ґрунтів: у вапнясті ґрунти вносять елементну сірку, утворювана тіобацилами сірчана кислота переводить нерозчинний карбонат кальцію в більш розчинний сульфат кальцію, який вимивається з ґрунту.

У місцях, де в осадах стоячих вод і вод, які повільно течуть, утворюється сірководень, можна часто виявити на чорній поверхні мулу збурений витчасті сірчобактерії *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thioploca*. Проте виділення чистих культур таких класичних сірчобактерій утруднене і не завжди вдається. Очевидно, для їх росту необхідні органічні речовини.

Сірководень як основа безсвітлової екосистеми. Для життя всіх вищих гетеротрофних організмів необхідна біомаса, яка утворюється за допомогою фотосинтезу (рослини). Проте існує виняток з цього правила. На великих морських глибинах, у місцях, де розходяться континенти, з морського дна б'ють гарячі

джерела з температурою води близько 350 °C. У воді цих джерел розчинено багато різних мінеральних речовин, у тому числі й сірководень. Там, де гаряча вода стикається з холодною морською водою, що містить кисень, можуть рости бактерії, які окиснюють сірку або сірководень. Вони є поживою для моллюсків, ракоподібних, черв'яків. Отже, на великих морських глибинах, куди не проникає світло, у безпосередній близькості від гарячих джерел існує екосистема, в якій продукція біомаси ґрунтується не на фотосинтезі, а на хемолітоавтотрофії.

### 16.3. ОКИСНЕННЯ ДВОВАЛЕНТНОГО ЗІЛІЗА

Залізобактерія *Thiobacillus ferrooxidans* окиснює двовалентне залізо до тривалентного:



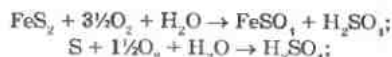
Ця бактерія дуже схожа на *Thiobacillus thiooxidans*, життєздатна за рН до 2,5, але енергію може одержувати не тільки за рахунок окиснення відновлених сполук сірки, а й при окисненні заліза. Існує в кислих рудникових водах, що містять сульфіді різних металів, у тому числі й пірит ( $FeS_2$ ).

Окиснювати залізо здатна також сіркоокиснювальна бактерія *Sulfolobus acidocaldarius*. До інших залізобактерій (крім сіркоокиснювальних) належать *Gallionella ferruginea*, *Leptothrix ochracea*, які можна зустріти в дренажних трубах і гірських ручах серед шарів оксиду заліза.

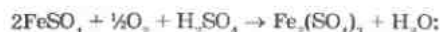
**Вилуговування (вищоложування) металів із руд.** Здатність деяких ацидофільних бактерій, які окиснюють сірку та залізо, перетворювати сульфіді та елементну сірку на водорозчинні сульфати важких металів використовується для вилуговування збіднених руд з метою одержання міді, цинку, нікелю, молібдену та урану. Найпростішим є спосіб пропускання води через товстий шар подрібненого каменю, який містить руду (наприклад, пірит  $FeS_2$ ) з супутніми сульфідами різних металів, а потім збирання розчину, що містить сульфати. Після концентрування такого розчину з нього осаджують метали.

Розчинення сульфідів важких металів відбувається за одночасної дії багатьох процесів:

1) бактеріального окиснення відновлених сполук сірки чи елементної сірки до сірчаної кислоти



2) бактеріального окиснення двовалентного заліза до тривалентного



3) хімічного окиснення нерозчинних солей важких металів до розчинних сульфатів і сірки

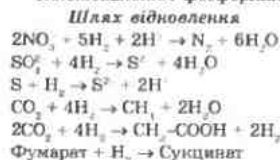


Отже, бактерії постачають сірчану кислоту, а також регенерують  $\text{Fe}^{3+}$ . Ці обидва компоненти витрачаються на вивільнення руд. Такі перетворення здійснюють *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans*. Ці бактерії (їх певні штами) характеризуються надзвичайною стійкістю до досить високих концентрацій міді, кобальту, цинку та інших важких металів.

## 16.4. ОКИСНЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ

Молекулярний водень утворюється внаслідок анаеробного розпаду органічних речовин (бродиння) в осадах водойм та анаеробних ділянках ґрунту. Значна частина цього водню окиснюється бактеріями, які співіснують разом з мікроорганізмами, що його виділяють. Окиснення  $\text{H}_2$  супроводжується відновленням сульфату до сульфідів,  $\text{CO}_2$  — до метану. Майже у всіх групах бактерій, здатних синтезувати АТФ шляхом анаеробного дихання, є форми, які використовують водень як донор електронів.

Використання водню бактеріями, здатними регенерувати АТФ окиснювальним фосфорилуванням в анаеробних умовах



Бактерії

*Paracoccus denitrificans*  
*Denitrobacillus vulgaris*  
*Campylobacter*  
*Methanobacterium*  
*Acetobacterium*  
*Vibrio succinogenes*

Аеробні бактерії, які окиснюють водень. Бактерії, які в аеробних умовах окиснюють молекулярний водень з використанням

кисню як термінального акцептора електронів, об'єднують у групу *воденьокиснювальних (водневих)* бактерій. Всі вони здатні як до автотрофної фіксації  $\text{CO}_2$ , так і до використання органічних субстратів. Водневі бактерії є факультативними хемоліто-автотрофами.

Водневі бактерії ростуть на простих поживних середовищах, які містять тільки неорганічні солі, у газовій атмосфері, що складається з 70 %  $\text{H}_2$ , 20 %  $\text{O}_2$  та 10 %  $\text{CO}_2$  (за об'ємом).

З таксономічного погляду водневі бактерії — надзвичайно велика таксономічна група, яка містить більшість грамнегативних бактерій (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Rhizobium*, *Derxia*), але є і грампозитивні (*Nocardia*, *Mycobacterium*, *Bacillus*).

Молекулярний водень залучається до метаболічних процесів за допомогою *гідрогеназ*, які можуть бути розчинними (містяться у цитоплазмі) або мембранозв'язаними.

Багато водневих бактерій можуть розкладати гексози та глюкозат КДФГ-шляхом. Вони здатні використовувати й інші органічні субстрати. Якщо у розпорядженні водневих бактерій, крім неорганічних субстратів ( $\text{CO}_2$  та  $\text{H}_2$ ), є також і органічні, то бактерії можуть себе поводити як *міксотрофи*. Вони асимілюють органічний субстрат і синтезують з нього клітинний матеріал, а необхідну для цього енергію одержують шляхом окиснення  $\text{H}_2$ . Міксотрофами є представники багатьох факультативних автотрофів.

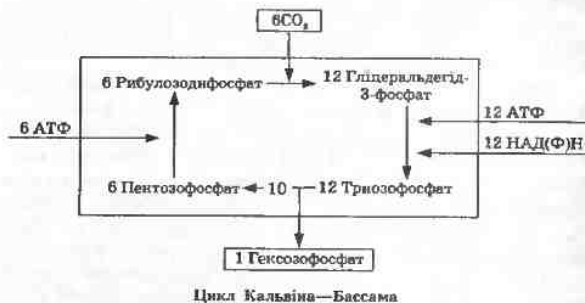
Проте у деяких водневих бактерій використання субстратів строго регулюється. Наприклад, за автотрофного росту *Alcaligenes eutrophus* не містять ферментів для розщеплення фруктози. Якщо такі клітини помістити в середовище з фруктозою і вирощувати в аеробних умовах, то синтезуються ферменти КДФГ-шляху, і клітини ростуть. Але якщо інкубацію проводити у газовій атмосфері (80 %  $\text{H}_2$  і 20 %  $\text{O}_2$ ), то не спостерігається ні синтезу ферментів, ні росту клітин. Отже, молекулярний водень репресує утворення ферментів, необхідних для катаболізму фруктози.

**Карбоксидобактерії.** Так називаються бактерії, які здатні окиснювати  $\text{CO}$  до  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}$  утворюється в природі як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Проте тільки аеробні бактерії здатні рости, використовуючи  $\text{CO}$  як єдиний донор електронів та єдине джерело вуглецю. Представником карбоксидобактерій є *Pseudomonas carbonovorans*. Слід зазначити, що карбоксидобактерії мають мембранозв'язану гідрогеназу і можуть поводитися як водневі бактерії.

16.5. ФІКСАЦІЯ  $\text{CO}_2$ 

**Цикл Кальвіна—Бассам.** Інакше він називається **рибулозодифосфатним циклом**. Рибулзодифосфатний цикл — це відновлювальний процес, у якому  $\text{CO}_2$  відновлюється до рівня вуглеводів. Функціонує у всіх аеробних хемолітоавтотрофів, у майже всіх фототрофних бактерій, ціанобактерій і зелених рослин. Не бере участі у фіксації  $\text{CO}_2$  у метаноутворювальних та ацетогенних бактерій.

Ключовими ферментами циклу є **фосфорибулокіназа** та **рибулозодифосфаткарбоксилаза**. У циклі можна виділити три основні етапи (рисунк): 1) реакція карбоксилювання; 2) реакції відновлення; 3) регенерація молекул — акцепторів  $\text{CO}_2$ .



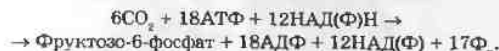
У реакції карбоксилювання до рибулзозо-1,5-дифосфату за участю фермента **рибулозодифосфаткарбоксилази** приєднується  $\text{CO}_2$  і утворюються дві молекули 3-фосфогліцерату.

У реакціях відновлення відбувається відновлення карбоксильної групи 3-фосфогліцерату до альдегідної групи. Беруть участь ферменти гліколізу — **фосфогліцераткіназа** та **гліцеральдегідфосфатдегідрогеназа**. Це — етап асиміляції  $\text{CO}_2$ , який потребує витрат енергії та відновлювальних еквівалентів. Утворений гліцеральдегід-3-фосфат перебуває у рівновазі з діоксидоацетоном, а обидва триозофосфати — у рівновазі з фруктозо-1,6-дифосфатом.

На третьому етапі фруктозодифосфат дефосфорилується під дією ферменту **фруктозодифосфатази** з утворенням фруктозо-6-

фосфату. Потім з однієї молекули фруктозо-6-фосфату та трьох молекул триозофосфату утворюються три молекули рибулзозо-5-фосфату. Останньою реакцією циклу є фосфорилування рибулзозо-5-фосфату за рахунок АТФ (фермент **фосфорибулокіназа**) з утворенням рибулзозо-1,5-дифосфату, який і є акцептором  $\text{CO}_2$ .

Баланс циклу:



Інші шляхи автотрофної фіксації  $\text{CO}_2$ . Анаеробні автотрофні бактерії реалізують два інших шляхи асиміляції вуглекислого газу. Метаноутворювальні, ацетогенні та сульфатовідновлювальні бактерії, які здатні використовувати як донори електронів  $\text{H}_2$  і  $\text{CO}_2$ , відновлюють  $\text{CO}_2$  **анаеробним ацетил-КоА-шляхом** до ацетил-КоА та пірувату. У результаті відомих реакцій піруват залучається до центральних шляхів біосинтезу.

Зелені сіркові бактерії фіксують  $\text{CO}_2$  лише за реакціями **відновлювального циклу трикарбонових кислот**.  $\text{CO}_2$  у такому циклі фіксується завдяки відновлюваному карбоксилюванню сукциніл-КоА.

## Контрольні запитання до розділу 16

1. Які бактерії називаються хемолітоотрофними і чому?
2. Для чого і як відбувається зворотний транспорт електронів у хемолітоавтотрофії?
3. У чому полягає суть процесу нітрифікації? Які бактерії беруть участь у нітрифікації?
4. Яка роль процесів нітрифікації у природі?
5. Які бактерії здатні окиснювати відновлені сполуки сірки? Які особливості метаболізму їм притаманні?
6. Як відбувається окиснення двовалентного заліза за участю мікроорганізмів?
7. Яка роль мікроорганізмів у вищолуженні металів із руд?
8. Як відбувається окиснення молекулярного водню бактеріями в аеробних та анаеробних умовах?
9. Назвіть представників та особливості метаболізму водневих бактерій.
10. Які бактерії здатні окиснювати  $\text{CO}$ ?
11. Як відбувається фіксація вуглекислого газу у циклі Кальвіна—Бассам?
12. Назвіть шляхи фіксації вуглекислого газу у автотрофних бактерій.
13. Чому для аеробних хемолітоавтотрофів характерний повільний і слабкий ріст?



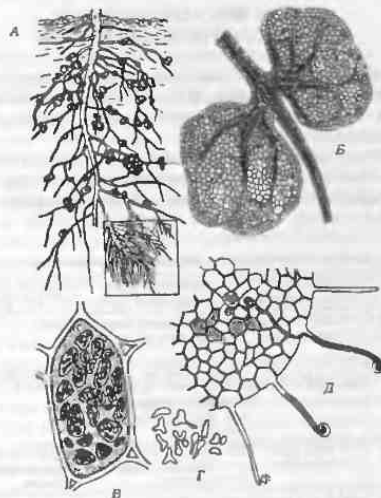
## 17. ФІКСАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТУ

Тільки прокаріоти здатні до фіксації молекулярного азоту. Фіксація азоту може здійснюватися як вільно існуючими бактеріями, так і бактеріями, які перебувають у симбіозі з вищими рослинами (бубльчковими бактеріями). Вільно існуючі азотфіксатори виносять 1–3 кг азоту на 1 га ґрунту на рік. У результаті зв'язування азоту бубльчковими бактеріями 1 га ґрунту збагачується 100–300 кг азоту на рік.

### 17.1. ФІКСАЦІЯ АЗОТУ СИМБІОТИЧНИМИ (БУБЛЬЧКОВИМИ) БАКТЕРІЯМИ

Бактерії, які спричиняють утворення бубльчочок у бобових рослин (бубльчочкові бактерії) належать до роду *Rhizobium* (*Storhizobium*). За специфічністю щодо рослини-хазяїна розрізняють кілька видів бубльчочкових бактерій: *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium lupini* та ін. Зараження рослини відбувається тільки через молоді кореневі волоски (рисунк). Бактерії укорінюються на самому кінчику волоска і ростуть у формі інфекційної нитки до його основи. Потім такі нитки, одягнуті в целюлозну оболонку, проникають крізь тонкі стінки молодих клітин епідермісу в кору кореня і розростаються, утворюючи бубльчочки. Бактерії в бубльчках досить швидко розмножуються і утворюють клітини неправильної форми — бактеріоїди. Молекулярний азот здатні фіксувати тільки бубльчочки, які містять пігмент *леггемоглобін*. Цей пігмент, схожий на гемоглобін; він має високу спорідненість з киснем. Можна вважати, що леггемоглобін полегшує дифузіїю кисню через клітину рослини до бактеріоїда.

Воснові специфічності симбіозу *Rhizobium* з рослинами лежить взаємодія лектинів бобових рослин і полісахаридів ризобій. При



Симбіотична фіксація азоту в коренях бубльчочках бобових рослин:

**A** — корінь гороху з бубльчками; **B** — бубльчок у розрізі; **B** — рослинна клітина, заповнена бактеріями (*Rhizobium*); у розрізі; **C** — бактеріоїди (бактерії у клітинах набувають незвичайної форми); **D** — утворення бактерій через кінчики кореневих волосків і ріст інфекційних ниток

такому симбіозі рослина забезпечує бактерії поживними речовинами (цукрами) і створює для них оптимальні умови.

У деяких небобових рослин також є кореневі бубльчочки, здатні фіксувати азот. У цьому разі фіксація азоту оснований на симбіозі з прокаріотами — актиноміцетами роду *Frankia*. Слід зазначити, що і ціанобактерії також можуть бути партнерами, що фіксують азот, у симбіозі з вищими рослинами.

## 17.2. ФІКСАЦІЯ АЗОТУ ВІЛЬНО ІСНУЮЧИМИ БАКТЕРІЯМИ

Здатність до фіксації азоту виявлена у багатьох бактерій (аноксигенних фототрофних, ціанобактерій, факультативних анаеробів, хемолітавтотрофів, метилотрофів, сульфатредукторів, метаногенів).

Особливо активно фіксують азот види роду *Azotobacter* (близько 20 мг азоту на 1 г використаного цукру). Розрізняють кілька видів *Azotobacter*, поширених у різних місцях існування (таблиця).

Представники групи *Azotobacter* та їх поширення

Вид	Розміри та форма клітин	Характеристика колоній	Місце існування
<i>Azotobacter chroococcum</i>	3,1 × 2 мкм; частіше в парах	Слизові, темнозбурвлені; можуть містити цисти	Ґрунт
<i>Azotobacter vinelandii</i>	3,4 × 1,5 мкм; частіше в парах	Великі, слизові; виділяють жовтий пігмент із зеленою флуоресценцією; можуть містити цисти	Ґрунт і вода
<i>Azotobacter paspali</i>	2 мкм, дуже плеоморфні	Пігмент, як у <i>Azotobacter vinelandii</i> ; можуть містити цисти	Ґрунт, поверхня коренів <i>Paspalum notatum</i>
<i>Azotomonas agilis</i>	3,3 × 2,8 мкм; поодинокі або в парах	Виділяють жовтий пігмент з білою флуоресценцією	Ґрунт і вода
<i>Beijerinckia indica</i>	2 мкм	Великі, слизові, безбарвні	Кислі тропічні ґрунти (pH 4,5)

Бактерії роду *Azotobacter* є грамнегативними, клітини відносно великі, строгі аероби, в певних умовах рухливі (рух за допомогою джгутиків), здатні окиснювати різні органічні сполуки. Утворення слизу та наявність темних пігментів надають колоніям характерного вигляду. За браку поживних речовин утворюють форми спокою — цисти.

Фіксація азоту вільно існуючими ціанобактеріями має велике значення на рисових полях. Вони зв'язують до 30–50 кг азоту на 1 га на рік. Взагалі здатність до фіксації азоту виявлена у 40 видів ціанобактерій.

## 17.3. БІОХІМІЯ АЗОТФІКСАЦІЇ

Азотфіксація здійснюється ферментним комплексом — *нітрогеназою*. Нітрогеназа складається з двох компонентів: білка, до складу якого входять молібден, залізо та сірка, і білка, який містить залізо та сірку. Як сам фермент, так і процес азотфіксації є дуже чутливими до молекулярного кисню. Для фіксації азоту необхідні енергія та відновлювальні еквіваленти, які можуть бути одержані в процесі фотосинтезу, дихання чи бродіння.

У багатьох бактерій нітрогеназа утворюється тільки тоді, коли вона необхідна, тобто за відсутності джерела зв'язаного азоту. Іони амонію пригнічують синтез нітрогенази.

За азотфіксацію відповідальними є так звані *nif*-гени. Американськими вченими сконструйована бактеріальна плазмід, в яку включені всі 17 відомих *nif*-генів з азотфіксуючої бактерії *Klebsiella pneumoniae*. При перенесенні такої плазмід в *Escherichia coli* ця бактерія ставала азотфіксувальною. Французьким ученим вдалося ввести 17 *nif*-генів у дріжджі, які є еукаріотами та більш близькими до рослин, ніж прокаріоти. Проте *nif*-гени у складі дріжджової клітини виявилися не здатними фіксувати азот. Разом з тим ці дослідження додають впевненості в тому, що все-таки вдасться здійснити введення генів азотфіксації в рослини (насамперед у хлібні злаки).

### Контрольні запитання до розділу 17

1. Які мікроорганізми здатні до фіксації молекулярного азоту?
2. Охарактеризуйте бактерії роду *Rhizobium*.
3. Чим визначається специфічність взаємовідносин бульбичкових бактерій з бобовими рослинами?
4. Назвіть бактерії — вільно існуючі азотфіксатори.
5. Охарактеризуйте представників роду *Azotobacter*.
6. Яку кількість азоту здатні зв'язувати бактерії-азотфіксатори?
7. Які мікроелементи необхідні для азотфіксації?
8. Які умови необхідні для функціонування нітрогенази в клітинах бактерій-азотфіксаторів?
9. Які гени є відповідальними за азотфіксацію?

## 18. ФОТОТРОФНІ БАКТЕРІЇ ТА ФОТОСИНТЕЗ

Здатність використовувати світло як джерело енергії, необхідної для росту, притаманна двом групам бактерій, які принципово відрізняються одна від одної.

**Перша група** включає *пурпурові та зелені бактерії*. Згідно з дев'ятим виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій ці бактерії належать до класу *Anoxophotobacteria*. Вони не можуть використовувати воду як донор водню (як це роблять зелені рослини), їм потрібні донори з більш високим ступенем відновлення (сірководень, водень або органічні сполуки). У зв'язку з цим фотосинтез у них проходить без виділення кисню (*аноксигенний фотосинтез*). Бактерії цієї групи — типові водні організми, які існують як у прісній, так і морській воді. Їх червоне, оранжеве чи зелене забарвлення зумовлене наявністю хлорофілів і каротиноїдів.

**Друга група** включає *ціанобактерії*. Вони використовують воду як донор водню і виділяють кисень, тобто здійснюють *оксигенний фотосинтез*. Процес фотосинтезу у ціанобактерій не відрізняється від фотосинтезу у зеленних рослин. Пігментна система ціанобактерій містить хлорофіл *a*, каротиноїди та фікобіліпротеїни.

### 18.1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПУРПУРОВИХ І ЗЕЛЕНИХ БАКТЕРІЙ

Згідно з дев'ятим виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій клас *Anoxophotobacteria* складається з двох порядків (табл. 18.1). Перший порядок *Rhodospirillales* (пурпурові бактерії) об'єднує родини *Rhodospirillaceae* (несіркові пурпурові бактерії) та *Chromatiaceae* (сіркові пурпурові бактерії). Другий порядок *Chlorobiales* (зелені бактерії) об'єднує родини *Chlorobiaceae* (зелені сіркові бактерії) та *Chloroflexaceae*. Морфологія

Таблиця 18.1

Анаеробні фототрофні бактерії

Порядок	Родина	Типовий вид	Характерні ознаки родини				Фотосинтетичний апарат
			Ріст	Окиснення H <sub>2</sub> S	Виділення сірки	Пігменти	
Rhodospirillales (пурпурові бактерії)	Chromatiaceae (пурпурові сіркові бактерії)	Chromatium vinosum	+	+	Виділення сірки	Бета (Бета)	Тилакоїди
	Rhodospirillaceae (пурпурові несіркові бактерії)	Rhodospirillum rubrum	+	+	Внутрішньомембранне	Бета (Бета)	Тилакоїди
Chlorobiales (зелені бактерії)	Chlorobiaceae (зелені сіркові бактерії)	Chlorobium limicola	+	+	Позаклітинне	Бета (Бета)	ПМ <sup>1</sup> Хлорозоми Хлорозоми
	Chloroflexaceae (зелені несіркові бактерії)	Chloroflexus aurantiacus	+	+	—	Бета (Бета)	ПМ <sup>1</sup> Хлорозоми

\* Цил — бактеріохлорофіл, <sup>1</sup>ПМ — плазматична мембрана

но різноманітна група — коки, палички, вигнуті форми (спірили, вібріони), рухливі та нерухливі.

Після проведеного в середині 80-х років ХХ ст. аналізу 16S рРНК у прокаріот зелені фотобактерії увійшли до складу групи 9 (*Chloroflexus*) і групи 10 (*Chlorobium*), а пурпурові бактерії — до групи 11, яка була виділена у 1988 р. в окремий клас *Proteobacteria*.

У книзі "Prokaryotes" (1999 р.) аселі фототрофні бактерії родини *Chlorobiaceae* розміщені в розділі 5, представники родини *Chloroflexaceae* — у розділі 7. Пурпурові фототрофні бактерії входять до складу частини С: *Proteobacteria* (див. розділ 7).

Пурпурові бактерії. Спільним для представників порядку *Rhodospirillales* є те, що їх фотосинтетичний апарат (світлозбирні системи та реакційні центри) міститься на внутрішніх мембранах (*тилакоїдах*), які утворюються з інвагінацій плазматичної мембрани. Тилакоїдні структури можуть бути везикулярні, трубчасті та пластинчасті (ламеллярні). Типовим хлорофілом для цих бактерій є *хлорофіл а*. Фіксація  $\text{CO}_2$  відбувається у циклі Кальвіна. Пурпурові бактерії здатні використовувати органічні сполуки як донори водню та/або джерела вуглецю.

За здатністю використовувати як донор електронів елементну сірку пурпурові бактерії поділяються на сіркові та несіркові. Типовим видом пурпурових сіркових бактерій є *Chromatium vinosum*, несіркових — *Rhodospirillum rubrum*. Сіркові бактерії можна легко розпізнати за внутрішньоклітинними включеннями сірки (мають вигляд кульок, які сильно заломлюють світло).

Зелені бактерії. Для цих бактерій характерна наявність *хлоросом* — оргanel, які прилягають до цитоплазматичної мембрани та містять характерний світлозбирний пігмент — бактеріохлорофіл (*c*, *d* або *e*). Крім того, вони містять невелику кількість і бактеріохлорофілу *a*, який прямо пов'язаний з фотосинтетичними реакційними центрами і локалізований у цитоплазматичній мембрані. Зелені бактерії не здатні фіксувати вуглекислий газ у циклі Кальвіна (у них немає ферменту *рибулозодифосфаткарбоксилази*). Асиміляція  $\text{CO}_2$  відбувається через відновлювальний цикл трикарбонових кислот.

Типовим видом зелених сіркових бактерій є *Chlorobium limicola*, несіркових бактерій — *Chloroflexus aurantiacus*.

Особливості метаболізму пурпурових і зелених бактерій. Цим бактеріям притаманний різнобічний метаболізм. Так, бага-

то які пурпурові несіркові бактерії здатні як до анаеробного росту на світлі, так і до аеробного в темноті (за рахунок органічних субстратів). Інші групи представлені строгими анаеробами і облигатними фототрофами. Багато які види використовують як донор водню молекулярний водень (представники родів *Rhodobacter*, *Chromatium*, а також родоспірили та *Chlorobium* ростуть на світлі, використовуючи  $\text{H}_2$  і  $\text{CO}_2$ ). Деякі види цих бактерій здатні використовувати як донор водню (електронів) сірководень, елементарну сірку. Спостерігається асиміляція  $\text{CO}_2$  та органічних субстратів. Переважна більшість цих фототрофних бактерій здатна до фіксації молекулярного азоту. Як запасні речовини накопичуються полі- $\beta$ -гідроксibuтират, полісахариди та поліфосфати.

Пігменти фотосинтетичного апарату. Задаючи фотосинтетичним пігментам достатньо густі суспензії фототрофних бактерій мають зелене, зелено-синє, пурпурово-фіолетове, червоне, коричневе та рожеве забарвлення. Колір залежить від природи та кількості співвідношення пігментів. Окремі пігменти можна визначити за спектрами поглинання інтактних клітин. Хлорофіли, наприклад, є відповідальними за максимуми поглинання в синій (< 450 нм), червоній та інфрачервоній (650–1100 нм) областях спектра. Поглинання в області 400–550 нм зумовлене каротиноїдами, а у ціанобактерій в області 550–650 нм — фікобіліпротеїнами.

Каротиноїди виконують дві функції: беруть участь у фотосинтезі як світлозбирні пігменти, тобто поглинають світлову енергію та передають її хлорофілу; захищають хлорофіл від фотоокиснення. Синьо-зелені мутантні форми пурпурових бактерій, позбавлені каротиноїдів, здатні рости тільки на слабкому світлі, а за високої інтенсивності світла гинуть.

Покриття фототрофних бактерій. Фототрофні пурпурові та зелені бактерії існують в анаеробних зонах багатьох водойм, у неглибоких ставках, у водах, які повільно течуть, в озерах і морських бухтах. Пурпурові сіркові бактерії нерідко утворюють нальоти, забарвлені у різноманітні відтінки червоного кольору (від ніжнорозового до темно-червоного), на поверхні мулу чи на якомусь органічному матеріалі, що розкладається. Іноді вони ростуть над поверхню мулу, утворюючи шар завтовшки близько 10 см ("цвітіння" води). Інтенсивне розмноження пурпурових сіркових бактерій спостерігається і в мілководних ставках, поверхні яких вкрита щільним шаром ряски або листям водних лілій.

Цей своєрідний біологічний фільтр поглинає ті спектральні компоненти світла, які можуть використовуватись зеленими водоростями та ціанобактеріями, але пропускають світло, що поглинається бактеріохлорофілами та темно-червоними каротиноїдами. Тому під таким зеленим покривом ростуть анаеробні фототрофні бактерії.

Сезонний масовий розвиток пурпурових сіркобактерій спостерігається також в анаеробних зонах озер нижче межі температурного стрибка (термоклин, глибина 10–30 м). Бактерії знаходять тут необхідні їм речовини — сірководень,  $\text{CO}_2$  та органічні сполуки. Інфрачервоне сонячне випромінювання, яке поглинається бактеріохлорофілами, не проникає на таку глибину. У цих умовах максимум енергії припадає на область спектра 450–500 нм, тобто якраз ту область, в якій поглинають каротиноїди. Високий вміст каротиноїдів у клітинах пурпурових бактерій забезпечує можливість фотосинтетичного метаболізму цих бактерій на великих глибинах. Відповідно на таких глибинах і серед зелених сіркобактерій переважають багаті на каротиноїди коричневі форми.

## 18.2. ЦІАНОБАКТЕРІЇ

За морфологічними ознаками поділяються на п'ять груп (табл. 18.2).

Таблиця 18.2

Характеристика ціанобактерій

Група	Характеристика	Представники
1. Хроококкові ціанобактерії	Одноклітинні палички та кони, розікшені поодинці чи в агрегатах, в яких об'єднані капсулами або слизом. Розмножуються бінарним поділом або брунькуванням	Роди <i>Synechococcus</i> , <i>Gloeobacter</i> та ін.
2. Плеврокапсові ціанобактерії	Теж одноклітинні форми, але тільки такі, які можуть розмножуватись і множинним поділом. При цьому всередині клітини, що ділиться, з'являється багато маленьких клітин — беоцитів	Роди <i>Pleurocapsa</i> , <i>Dermocapsa</i> , <i>Myxocapsa</i> та ін.
3. Нитчасті ціанобактерії без гетероцист	Триком складаються тільки з вегетативних клітин	Роди <i>Oscillatoria</i> , <i>Spirulina</i> , <i>Plectonema</i> та ін.

Закінчення табл. 18.2

Група	Характеристика	Представники
4. Нитчасті ціанобактерії з гетероцистами	Крім гетероцист, можуть утворювати актинети — клітини, які перебувають у стані спокою і які диференціюються з вегетативної клітини утворенням товстої зовнішньої оболонки, збільшенням об'єму і накопиченням ціанофіціну, глікогену, апілінів і каротиноїдів. Клітини діляться в одній площині	Роди <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> та ін.
5. Нитчасті ціанобактерії з гетероцистами	Відрізняються від групи 4 тим, що клітини діляться більш ніж в одній площині	Рід <i>Fischerella</i>

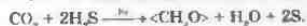
## 18.3. ПРОЦЕСИ ФОТОСИНТЕЗУ

**Фотосинтез** — перетворення світлової енергії у біохімічно доступну енергію (АТФ) та відновлювальні еквіваленти [НАД(Ф)Н], а також зв'язаний з цим синтез клітинних компонентів.

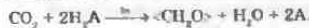
Рівняння фотосинтезу у зелених рослин має вигляд



Рівняння фотосинтезу у фототрофних бактерій має вигляд



Загальне рівняння фотосинтезу можна навести у вигляді



Основою будь-якого фотосинтезу є одна і той самий первинний процес, в різні типи фотосинтезу відрізняються один від одного тільки природою донора водню (вода, сірководень, органічні сполуки). Для того, щоб донором водню могла бути вода, необхідним є здійснення двох послідовних фотореакцій. При використанні донорів з більш негати́вним окисно-відновним потенціалом (сірководень) достатньо однієї фотореакції.

### 18.3.1. Окисневий фотосинтез

Первинні процеси фотосинтезу проходять у **тилакоїдах** — плоских зм'ячених мембранних бульбашках, що містяться в клітинах ціанобактерій і хлоропластах водоростей і зелених рослин.

Тилакоїдні мембрани і світлозбирні пігменти (пігменти антен). Тилакоїдна мембрана містить пігментні молекули (хлорофіл *a*, хлорофіл *b* і каротиноїди), переносники електронів і ферменти. Переважна більшість молекул хлорофілу (понад 99 %), а також додаткові пігменти (каротиноїди, фікобіліпротеїни) є відповідальними за поглинання світла і розподіл енергії; вони утворюють *систему антен*. Лише незначна частина хлорофілу *a* виконує роль *фотохімічного реакційного центру*, в якому і проходить фотохімічна окисно-відновна реакція.

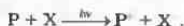
Пігменти антен (світлозбирні пігменти) уловлюють світло і передають енергію хлорофілу реакційного центру:



**Фотореакції.** Фотореакції належать до первинних процесів фотосинтезу. Вони здійснюються в реакційних центрах. Реакційний центр складається з ряду компонентів, найважливішими з яких є *первинний донор електронів* (комплекс хлорофілу та білка) і *первинний акцептор електронів*. Ці два компоненти являють собою окисно-відновні системи. Система донора (P/P') має позитивний потенціал, а система акцептора (X/X') — негативний. Під дією енергії світла відбувається перенесення електрона



Замість цього можна записати



Отже, першу фотореакцію можна записати у вигляді



Аналогічно можна навести і фотореакцію у пурпурових бактерій



У результаті фотореакції донор втрачає один електрон — виникає «дірка» (електронний ефект). Такі дірки повинні заповнюватися електронами, які можуть надходити шляхом *циклічного* або *нециклічного перенесення електронів*. У разі нециклічного

лічного перенесення електронів надходять від екзогенного зовнішнього донора, а у разі циклічного — повертаються від відновленого акцептора (X) до окисненого донора.

Циклічне перенесення електронів приводить до зміни заряду мембрани, а нециклічне — й до відновлення НАДФ.

Дві фотореакції в двох фотосистемах. У окисненому фотосинтезі працюють дві фотосистеми (ФС) — I і II (рисунк). Фотосистема I збуджується світлом з довжиною хвилі більше 730 нм, а фотосистема II — короткохвильовим світлом (менше 700 нм).

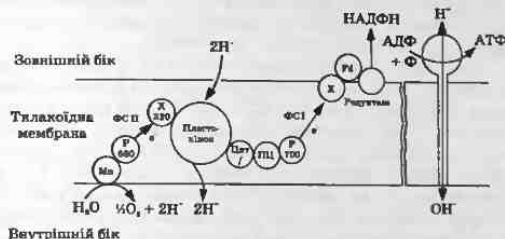


Схема просторової організації електрон-транспортної системи на тилакоїдній мембрані:

Mn — марганцевий комплекс; Пл — пластостінін; цит f — цитохром f; Fd — фередоксин; X — залізоіскриковий білок

Фотохімічно активний центр фотосистеми I містить хлорофіл *a*, (P700), який є первинним донором електронів у першій фотореакції. Окисно-відновний потенціал P700 становить близько +0,5 В. Світлова енергія, що поглинається світлозбирними пігментами першої фотосистеми, передається в реакційний центр і переводить у збуджений стан P700, який окиснюється і віддає один електрон. Акцептором відданого електрона є X — залізоіскриковий білок з окисно-відновним потенціалом близько -0,5 В. Цей акцептор у свою чергу передає електрон фередоксину, а з відновленого фередоксину — на НАДФ та інші акцептори, в тому числі і на P700 (нециклічне перенесення електронів). У разі циклічного перенесення електронів від X передається через пластостініни, цитохроми та пластостініни (Пл) знову на P700.



Реакційний центр фотосистеми II містить хлорофіл  $a$ , (P680), який є первинним донором електронів у другій фотореакції. Його окисно-відновний потенціал становить близько  $+0,9$  В. Акцептором електрона є пластохінон X320 з окисно-відновним потенціалом близько 0 В. Пластохінон при цьому відновлюється до семіхінону. Донором електронів для цієї фотосистеми є вода: дірка, що утворилася в P680 внаслідок втрати електрона, заповнюється електроном, який вивільнюється при утворенні  $O_2$  з води. Розклад води відбувається за участю марганцю.

Дві описані фотосистеми зв'язані між собою електрон-транспортним ланцюгом, важливою ланкою якого є пластохінон. Подібно до убіхінону в дихальному ланцюгу, пластохінон міститься в наближці і є своєрідним "депо" електронів.

Як видно з *рисунка*, перенесення одного електрона через дві фотосистеми супроводжується надходженням двох протонів у внутрішній простір тилакоїдів. Дві фотосистеми разом з електрон-транспортним ланцюгом забезпечують спрямований потік електронів від води (із внутрішнього боку) до НАДФ (із зовнішнього боку). Отже, фотореакції приводять до відновлення НАДФ і утворення заряду на мембрані. Тобто світлові реакції виступають у ролі *протонного насоса*, який працює за рахунок енергії світла і створює позитивний заряд всередині тилакоїда. В результаті цього мембрана акумулює енергію у формі протонного потенціалу, і ця енергія використовується для синтезу АТФ.

### 18.3.2. Аноксигенний фотосинтез

В аноксигенному фотосинтезі бере участь одна фотореакція, вона підтримує циклічний транспорт електронів. Для поповнення циклу електронами потрібні зовнішні донори електронів. Цими є сірководень, сірка, тиосульфат, органічні сполуки (малат, сукцинат та ін.), молекулярний водень. Фотореакція, хоча й аналогічна першій фотореакції у зелених рослин, приводить тільки до створення протонного потенціалу і синтезу АТФ, але не до відновлення НАД (у цьому разі відсутнє нециклічне перенесення електронів, у результаті якого відновлюється НАД). НАДН у клітинах анаеробних фототрофів утворюється за рахунок зворотного транспорту електронів, який відбувається за витратами АТФ (за аналогією з вербними хемолітовотрофитами). Такий

процес фотосинтезу є характерним для пурпурових фототрофних бактерій.

При фотореакції у зелених бактерій первинний акцептор електронів має окисно-відновний потенціал близько  $-0,5$  В (у пурпурових бактерій — всього  $-0,1$  В). За такого високого негативного потенціалу є можливим перенесення електронів від первинного акцептора для відновлення ферредоксину та відновлення НАД. Отже, відновлювальні еквіваленти у зелених фотобактерій утворюються не за рахунок зворотного транспорту електронів, який потребує витрат АТФ (як у пурпурових фотобактерій), а в результаті фотореакції. З еволюційного погляду фотосинтез зелених бактерій міг би бути ланкою, яка зв'язує фотосинтез пурпурових бактерій і фотосинтез ціанобактерій і зелених рослин.

### Висновки

1. Під дією світла перенесення електронів від донора до акцептора відбувається у термодинамічно невигідному напрямку (від позитивного окисно-відновного потенціалу до негативного).
2. Поповнення фотосистеми електронами відбувається за рахунок зовнішніх донорів (оксигенний фотосинтез — вода; аноксигенний — сульфід, елементарна сірка, молекулярний водень, органічні сполуки).
3. Електрони надходять шляхом циклічного та нециклічного перенесення. У разі циклічного перенесення електрони повертаються від відновленого акцептора до окисненого донора. У процесі оксигенного фотосинтезу у разі нециклічного перенесення електрони для другої фотореакції надходять від води, а для першої — з електрон-транспортного ланцюга, який зв'язує обидві фотосистеми. У разі нециклічного перенесення (аноксигенний фотосинтез) електрони можуть надходити від сульфіду, елементарної сірки, молекулярного водню, органічних сполук.
4. Циклічне та нециклічне перенесення електронів супроводжується спрямованим перенесенням протонів, зміною заряду мембрани та виникненням трансмембранного електростатичного градієнта протонів. Протони транспортуються через мембрану ззовні всередину. Перенесення одного електрона супроводжується надходженням у внутрішній простір двох протонів.

Апарат фотосинтезу — це протонний насос, який приводиться в дію світлом.

5. У процесі фотосинтезу енергія протонного потенціалу перетворюється на енергію АТФ за тими самими механізмами, що і в плазматичній мембрані прокариот або в мітохондріях еукаріот.

6. Нециклічне перенесення електронів приводить (крім зміни заряду на мембрані) до відновлення НАД(Ф)Н.

7. У процесі окисного фотосинтезу (ціанобактерії, зелені рослини), коли донором водню є вода, необхідним є функціонування двох фотореакцій. При цьому відбувається синтез АТФ, відновлення НАДФ і виділення молекулярного кисню (електрони для другої фотореакції вивільнюються при утворенні кисню з води).

8. У процесі авоксигенного фотосинтезу функціонує одна фотореакція, оскільки використовуються донори водню та електронів з більш негативним окисно-відновним потенціалом, ніж вода.

У пурпурових бактерій у процесі фотосинтезу лише утворюється АТФ. Відновлення НАД не відбувається (у цьому разі відсутнє нециклічне перенесення електронів, оскільки окисно-відновний потенціал акцептора електронів становить  $-0,1$  В). НАДН утворюється під час зворотного транспорту електронів.

У зелених бактерій у процесі фотосинтезу утворюється АТФ і НАДН (оскільки окисно-відновний потенціал акцептора електронів становить  $-0,5$  В).

9. Процес фотосинтезу являє собою хімічну реакцію, яка найчастіше здійснюється на нашій планеті. Фотосинтезу ми зобов'язані як безперервним утворенням органічного матеріалу, так і існуванням таких видів корисних копалин, як вугілля, нафта і природний газ.

#### 18.4. ВИКОРИСТАННЯ СВІТЛОВОЇ ЕНЕРГІЇ ГАЛОБАКТЕРІЯМИ

Галобактерії, які належать до археобактерій, існують у висококонцентрованих або насичених розчинах солей. Оптимальний ріст галобактерій відбувається у  $3,0$ – $3,5$  М розчині хлористого натрію. Можливість існування цих бактерій у таких екстремальних умовах зумовлена тим, що концентрація солі всередині клітин є такою ж високою, як і в навколишньому середовищі.

Паличкоподібні рухливі клітини *Halobacterium halobium* забарвлені у червоний, оранжевий і жовтий кольори завдяки наявності каротиноїдів. У клітинах галобактерій міститься також і *бактеріородопсин* — пігмент, який утворює в клітинах так звану *пурпурову мембрану* — темно-червоні плями діаметром  $0,5$  мкм у плазматичній мембрані. Ці пурпурові мембрани займають близько половини поверхні клітин. Завдяки бактеріородопсину на світлі створюється протонний потенціал між зовнішнім і внутрішнім боками мембрани. Отже, пурпурова мембрана виконує роль протонного насоса, який приводиться в дію світлом, що й спричиняє утворення електрхімічного мембранного потенціалу. Вирівнювання зарядів (розрядка потенціалу) може супроводжуватися синтезом АТФ: пурпурова мембрана уможлиблює функціонування особливого типу фосфорилування. Крім енергії, одержаної за допомогою світла, галобактерії можуть отримувати енергію за рахунок аеробного окиснення субстрату.

#### Контрольні запитання до розділу 18

1. Які бактерії можуть використовувати світло як джерело енергії?
2. Охарактеризуйте положення анаеробних фототрофів у дефітному виданні Кернінцтва Берга з систематики бактерій і філогенетичній систематиці.
3. Які особливості будови та метаболізму притаманні пурпуровим і зеленим фототрофним бактеріям?
4. Що таке фотосинтез? Де відбуваються першинні процеси фотосинтезу? Назвіть складові фотохімічного реакційного центру.
5. Як відбувається процес окисного фотосинтезу? Чому для його здійснення необхідним є функціонування двох фотореакцій?
6. Для чого необхідні циклічне і нециклічне перенесення електронів?
7. За яким механізмом синтезується АТФ у фотосинтетичному апараті?
8. Чим відрізняється процес авоксигенного фотосинтезу у пурпурових і зелених бактерій і чому?
9. Чим різняться між собою окисний та авоксигенний фотосинтез?
10. Як можуть використовувати світлову енергію галобактерії?

## 19. ГЕНЕТИКА БАКТЕРІЙ: ПОСТІЙНІСТЬ, ЗМІНА ТА ПЕРЕДАВАННЯ ОЗНАК

### 19.1. СИНТЕЗ БІЛКА ТА ГЕНЕТИЧНИЙ КОД

Кожна жива істота за більшістю своїх ознак подібна до своїх предків. Збереження специфічних властивостей, тобто постійність ознак у ряду поколінь, називають спадковістю. Генетика — це наука про спадковість і мінливість. Інакше кажучи, генетика — це наука, що вивчає передавання ознак і закономірності їх успадкування. Кожній ознаці як носій інформації відповідає певний ген. Тривалий час вважалося, що за своєю хімічною природою гени є білками. У 1944 р. англійські вчені О. Ейвери, К.М. Мак-Леод та М. Мак-Карті встановили, що матеріальним носієм спадкової інформації є ДНК, тобто гени складаються з ДНК.

#### 19.1.1. Визначення поняття "ген"

Відомо, що основою життя є білки. Спочатку на комахах, а потім на мікроорганізмах було доведено, що прояв тих чи інших ознак залежить від активності ферментів. У мікроорганізмів ферменти можна було пов'язати з конкретними ознаками, які піддаються точному біохімічному визначенню. Тому уже в 30-ті роки ХХ ст. було сформульовано правило: *один ген — один білок (фермент)*. Це правило означає, що один ген містить інформацію, необхідну для синтезу певного ферменту. Але коли з'ясувалося, що гени побудовані з ДНК, з'явилася нове визначення: *ген — це лінійна ділянка ДНК, в якій закодований один білок (фермент)*. Потім стало відомо, що багато які білки побудовані з декількох поліпептидних ланцюгів (субодиниць). Знову довелося модифікувати визначення гена: *ген — це лінійна ділянка ДНК, в якій закодований один поліпептидний ланцюг білка*. Проте близько 20–25 років тому з'ясувалося, що і це

визначення потрібно змінювати. Було встановлено, що кодувальні послідовності багатьох генів у еукаріот містять вставки, які до даного білка відношення не мають. Тобто ген складається з кодувальних і некодувальних ділянок. Кодувальні ділянки гена називаються *екзонами*, а некодувальні вставки — *інтронами*. Розмір інтронів може бути від кількох одиниць до кількох тисяч нуклеотидних залишків. Знову змінюється визначення гена: *ген — сукупність ділянок ДНК, які кодують один поліпептидний ланцюг білка*. Проте і цього замало: існують гени транспортних і рибосомальних РНК, які не кодують білків. У зв'язку з цим було запропоновано таке визначення: *ген — нуклеотидна послідовність, яка виконує певну функцію*. У наш час загальноприйнятим є твердження, що *кожний структурний ген кодує певний поліпептидний ланцюг*.

#### 19.1.2. Реплікація ДНК

Яким чином зберігається спадкова інформація у процесі росту та розмноження клітин? Перед поділом клітин відбувається *ідентична редуплікація*, або *реплікація* генів. У 1957 р. американські вчені М. Дельбрюк і Г.С. Стент запропонували три можливі механізми реплікації ДНК (рис. 19.1):

1) *консервативний механізм* — розкручування спіралі не відбувається, батьківська подвійна спіраль служить матрицею для

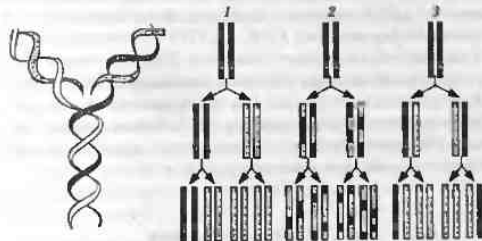


Рис. 19.1. Три теоретично можливі механізми реплікації ДНК: 1 — консервативний; 2 — дисперсний; 3 — напівконсервативний. *Морарук* — модель напівконсервативного способу реплікації ДНК

синтезу двох нових ланцюгів. Дочірня подвійна спіраль будується повністю з нового матеріалу, а батьківська як така зберігається;

2) **дисперсивний механізм** — батьківська спіраль при подвоєнні на кожному півоберті розривається на безліч фрагментів. Синтез нових ланцюгів відбувається на фрагментах, які потім хрест-навхрест зливаються з відрізками нового матеріалу. У цьому разі кожний поліпептидний ланцюг повинен складатися з відрізків старого та нового матеріалу, які чергуються;

3) **напівконсервативний механізм** — батьківська подвійна спіраль розкручується, і на кожному полінуклотидному ланцюгу утворюється новий комплементарний ланцюг. Отже, нова подвійна спіраль є "гібридом" старого та нового синтезованого ланцюга.

Подальші експериментальні дослідження з використанням радіоактивної мітки та аналітичного градієнтного центрифугування міченої ДНК у градієнті хлористого цезію підтвердили напівконсервативний механізм реплікації ДНК.

### 19.1.3. Транскрипція ДНК

Виникає ще одне закономірне запитання: яким чином інформація, що міститься в генах, визначає специфічну активність та інші властивості ферментів, і як вона перетворюється на амінокислотну послідовність білка? ДНК як носій спадкової інформації не є матрицею для синтезу поліпептидів. Біосинтез білків відбувається на рибосомах, які безпосередньо з ДНК не стикаються. Передавання записаної в ДНК інформації до місць синтезу білка здійснюють **матричні (інформаційні) РНК**. Ці РНК є одноланцюговими. мРНК синтезується на одному з ланцюгів ДНК, причому механізм цього процесу є схожим на механізм реплікації ДНК. Утворення мРНК починається на 5'-кінці і за послідовністю основ ланцюг мРНК є комплементарним ланцюгу ДНК. Таким чином, під час синтезу мРНК просто копіюється нуклеотидна послідовність ДНК. Цей процес називається *транскрипцією*.

### 19.1.4. Генетичний код

Кожний ген представлений певною ділянкою молекули ДНК. Специфічна інформація, яка міститься в гені, визначається послі-

довністю азотистих основ у ланцюгу ДНК. "Алфавіт", за допомогою якого записана ця інформація ДНК, включає чотири "букви" — основи: А — аденін, Г — гуанін, Т — тимін і Ц — цитозин. У мРНК тимін замінений на урацил — У.

Специфічність ферментних білків, синтез яких контролюють гени, визначається послідовністю амінокислот у поліпептидних ланцюгах. Для переведення нуклеотидної послідовності в амінокислотну служить специфічний **код**. Кожна амінокислота визначається групою з трьох сусідніх нуклеотидів — **триплетом (кодоном)**. Чому саме три нуклеотиди кодувають одну амінокислоту? У ДНК є чотири види основ, білки складаються з 20 амінокислот. Якби код був однобуквеним, то можна було б закодувати тільки чотири амінокислоти з 20. Двобуквеного коду також недостатньо: за його допомогою можна закодувати  $4^2 = 16$  амінокислот. А трибуквеним кодом ( $4^3 = 64$ ) можна закодувати всі 20 амінокислот, та ще й з надлишком. Трибуквеність генетичного коду була доведена в лабораторіях Ф. Кріка. Генетичний код виявився **виродженим**: один і той самий амінокислотний залишок міг кодуватися різними кодонами. Причому код вироджений нерівномірно: аргінін, наприклад, кодується шістьма кодонами, а метіонін — лише одним. У 1966 р. зусиллями вчених багатьох країн було завершено розшифрування генетичного коду (табл. 19.1). Було встановлено, що 20 амінокислотам відповідає 61 кодон. Деяким кодонам притаманні певні специфічні функції — вони означають "початок" або "кінець" поліпептидного ланцюга. Генетичний код виявився універсальним для всієї живої природи: бактерія, тигр і гвоздика використовують однакові кодони для певних амінокислотних залишків.

### 19.1.5. Трансляція мРНК: синтез білка

Амінокислоти з'єднуються в поліпептидний ланцюг за порядком, який визначається триплетами мРНК. У цьому процесі беруть участь мРНК, тРНК, рибосоми, ряд ферментів, АТФ. Спочатку амінокислоти за участю АТФ активуються з утворенням аміноацил-АМФ:



Від АМФ аміновидільна група переноситься на кінцевий нуклеотид тРНК. Активация та приєднання амінокислоти до від-

Таблиця 19.1

Генетичний код							
Триплет	АМК	Триплет	АМК	Триплет	АМК	Триплет	АМК
УУУ	Фен	УЦУ	Сер	УАУ	Тир	УГУ	Цис
УУЦ	Фен	УЦЦ	Сер	УАС	Тир	УГЦ	Цис
УУА	Лей	УЦА	Сер	УАА	"ochre"	УГА	—
УУГ	Лей	УЦГ	Сер	УАГ	"amber"	УГГ	Три
ЦУУ	Лей	ЦЦУ	Про	ЦАУ	Гіс	ЦГУ	Арг
ЦУЦ	Лей	ЦЦЦ	Про	ЦАЦ	Гіс	ЦГЦ	Арг
ЦУА	Лей	ЦЦА	Про	ЦАА	Глу	ЦГА	Арг
ЦУГ	Лей	ЦЦГ	Про	ЦАГ	Глу	ЦГГ	Арг
АУУ	Ілей	АЦУ	Тре	ААУ	Асп	АГУ	Сер
АУЦ	Ілей	АЦЦ	Тре	ААЦ	Асп	АГЦ	Сер
АУА	Ілей	АЦА	Тре	ААА	Ліз	АГА	Арг
АУГ	Мет	АЦГ	Тре	ААГ	Ліз	АГГ	Арг
ГУУ	Вал	ГЦУ	Ала	ГАУ	Аспк	ГГУ	Глук
ГУЦ	Вал	ГЦЦ	Ала	ГАЦ	Аспк	ГГЦ	Глук
ГУА	Вал	ГЦА	Ала	ГАА	Глі	ГГА	Глук
ГУГ	Вал	ГЦГ	Ала	ГАГ	Глі	ГГГ	Глук

**Примітка.** Триплети УАА ("ochre"), УАГ ("amber") та УГА визначають кінець синтезу та відділення поліпептидного ланцюга від рибосоми.

#### Умовні позначення:

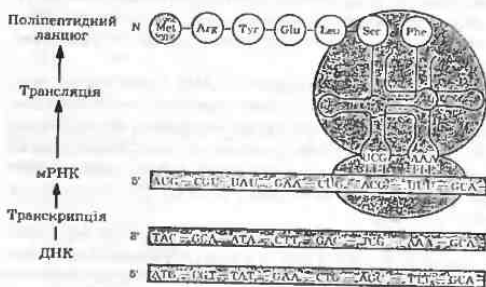
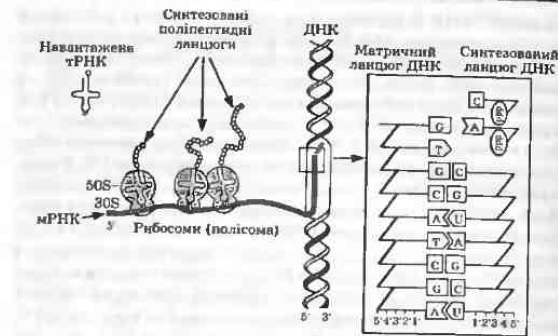
Ала — аланін  
 Арг — аргінін  
 Асп — аспаратин  
 Аспк — аспарагінова кислота  
 Вал — валін  
 Гіс — гістидин  
 Глі — гліцин  
 Глу — глутамін  
 Глук — глутамінова кислота  
 Ілей — ізолейцин

Лей — лейцин  
 Ліз — лізин  
 Мет — метіонін  
 Про — пролін  
 Сер — серин  
 Тир — тирозин  
 Тре — треонін  
 Три — триптофан  
 Фен — фенілаланін  
 Цис — цистеїн

повідної тРНК відбувається за участю фермента *аміноацил-тРНК-синтетази*. Цей фермент розпізнає і амінокислоту, і відповідну їй тРНК. Існує 20 таких синтетаз — по одній на кожну амінокислоту. Якщо для амінокислоти існує кілька кодонів, то для кожної такої амінокислоти існує і кілька тРНК. Різні тРНК, призначені для однієї й тієї ж амінокислоти, називаються *ізопарними тРНК*. Отже, відповідна синтетаза може приєднувати амінокислоту до кількох ізоацепторних тРНК. У молекулі тРНК є ланка, комплементарна кодону мРНК (*антикодон*). Амінокислоти з'єднуються на рибосомах (рис. 19.2). Рибосома переміщується вздовж мРНК, починаючи з 5'-кінця, і з кожним її переміщенням на один триплет наступна амінокислота встановлюється транспортною РНК у потрібне положення і приєднується своєю аміногрупою до карбоксильної групи попередньої амінокислоти (утворюється поліпептидний зв'язок). До мРНК прикріплюється кілька рибосом, так що на одній і тій самій матриці одночасно синтезуються кілька поліпептидних ланцюгів. Такий комплекс однієї мРНК з рибосомами називається *полісомом*. На кінці мРНК міститься кодон, від якого залежить відділення сформованого поліпептидного ланцюга від рибосоми (УАА, УАГ, УГА).

Отже, нуклеотидна послідовність ДНК являє собою "закодовану інструкцію", яка визначає (за посередництва мРНК) структуру специфічного білка. Передавання інформації від ДНК через РНК на білок називають "центральною догмою" молекулярної біології. Так відбувається перенесення інформації у всіх організмів, у яких генетичним матеріалом служить ДНК (еукаріоти, прокаріоти, ДНК-віруси).

Серед РНК-вірусів є такі, у яких РНК реплікується безпосередньо на матриці РНК. Проте у деяких РНК-онковірусів спочатку відбувається синтез ДНК, тобто РНК є матрицею для синтезу ДНК. Інформація, що міститься у вірусній РНК, передається на ДНК *зворотною транскрипцією* (за участю ферменту *зворотної транскриптази*). Цей фермент використовується в генній інженерії (якщо як носій інформації виділяють не ДНК, а відповідну мРНК, то остання повинна бути переписана в ДНК, яка і вбудовується в плазмід). У прокаріотів зворотна транскрипція не виявлена.



**Рис. 19.2. Біосинтез білка:**  
перенесення генетичної інформації здійснюється за два етапи: спочатку на матричному ланцюгу ДНК утворюється мРНК, потім під час переміщення рибосоми вздовж мРНК (на схемах — зліва направо) різні тРНК підводять до неї амінокислоти і встановлюють їх у положення, що визначається триплетами мРНК. Амінокислоти з'єднуються між собою пептидними зв'язками

## 19.2. МУТАЦІЇ ТА ЇХ ВИНИКНЕННЯ

Термін «*мутація*» був уперше введений голландським ботаником Г. де Фрізом, який вивчав мінливість і спадковість у рослин. Він визначив мутацію як **стрибокподібні зміни спадкових ознак**. Пізніше це поняття М.В. Бейерінк поширив і на бактерії. Базуючись на поняттях генотипу та фенотипу, можна дати таке визначення мутації: **мутація — це зміни генотипу, які проявляються у фенотипі**.

### 19.2.1. Спонтанні мутації

Мутації, які виникають у клітинах без будь-якого експериментального втручання, називаються **спонтанними**. Клітини, в яких виникли спонтанні мутації, називаються **спонтанними мутантами**. Численна частка спонтанних мутантів у клітинній популяції становить  $10^{-4}$ – $10^{-11}$ . **Частота виникнення мутантів** — це кількість мутацій у перерахунок на одну клітину чи на одну генерацію.

«**Мовчазні**» мутації. Якщо мутація — це зміна генотипу, яка проявляється у фенотипі, то на молекулярному рівні будь-яку стабільну спадкову зміну ДНК можна розглядати як мутацію. Проте завдяки виродженості генетичного коду не всяка мутація такого роду буде проявлятися у фенотипі. У багатьох триплетах зміна третьої основи залишається без наслідків («**мовчазні**» мутації). Навіть заміна другої чи першої основи у триpletі не завжди супроводжується серйозними наслідками. Наприклад, мутація АУЦ → ГУЦ веде до заміни ізолейцину валіном, тобто до заміни однієї ліпофільної амінокислоти на іншу. Проте мутація ЦУУ → ЦЦУ призведе до заміни лейцину проліном, і наслідком такої заміни буде відхилення від нормальної просторової конфігурації поліпептидного ланцюга, що в свою чергу може дуже змінити структуру вищого порядку.

**Зворотні мутації та реверсії.** У мутанта може відбутися і **зворотна мутація**, в результаті якої відновляться властивості дикого типу. **Істинною зворотною мутацією** називають тільки таку мутацію, в результаті якої точно відновлюється початковий генотип, тобто коли змінений у результаті першої мутації триплет буде знову кодувати ту саму амінокислоту, що й раніше. Якщо ж



відновлюється початковий фенотип, то мова йде про *реверсію* або *супресорну мутацію*. Відповідно клітини, в яких виникли реверсії, називаються *ревертантами*.

### 19.2.2. Індуковані мутації

Обробляючи клітини мутагенними речовинами, можна підвищити частоту виникнення мутацій. У цьому разі йдеться про *індуковані мутації*, а клітини, в яких вони виникли, називаються *індукованими мутантами*. Мутагенами можуть бути хімічні, фізичні та біологічні агенти.

Щодо генетичної структури розрізняють три класи мутантів з такими дефектами:

- 1) одна пара основ замінюється іншою. Наприклад, замість АТ може бути ГЦ або навпаки;
- 2) у нуклеотидну послідовність включається додаткова пара основ, або втрачається одна з існуючих пар;
- 3) група основ чи навіть генів може бути втрачена (*делеція*), переміщена в межах хромосоми (*транспозиція*) або розірвана вставкою сторонньої ДНК (*інсерція*).

Для мутацій першого класу характерною є висока частота реверсій, для мутантів другого класу реверсії зустрічаються рідко, а після мутацій третього класу ревертанти не з'являються (за деяким винятком).

Розглянемо деякі механізми індукованого мутагенезу.

**Включення аналогів основ.** Аналоги основ — це антиметаболіти. Вони дуже подібні до нормальних пуринових і піримідинових основ, тому поглинаються клітинами і включаються в ДНК. Такими антиметаболітами є бромурацил та 2-амінопурин.

Бромурацил є аналогічним за структурою тиміну, тому може включатися у ДНК замість тиміну як партнер аденіну. Бромурацил таутомеризується в енольну форму частіше, ніж тимін. В енольній формі він спарюється як цитозин, тобто спричиняє включення гуаніну замість аденіну.

2-Амінопурин включається в ДНК замість аденіну і діє так само.

**Хімічна зміна основ.** Азотиста кислота дезамінує аденін, гуанін або цитозин. У результаті заміщення аміногрупи на гідроксильну аденін перетворюється на гіпоксантин і спарюється з цито-

зином замість тиміну. Цитозин дезамінується в урацил і спарюється з аденіном замість гуаніну.

**Алкидувальні агенти.** Такими агентами є етил- та метилметансульфонат, диметил- та диетилсульфат, іприт і N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин. Це найефективніші мутагени. Наприклад, етилметансульфонат етилює атом азоту у молекулі гуаніну. Утворюється 7-алкілгуанін, який відщеплюється від ланцюга, в результаті чого утворюється "пропуск". За наступної реплікації на цьому місці часто виникає "помилкова" основа.

**Включення чи втрата окремих пар основ.** Профлавін та інші акридинові барвники діють інакше. Молекула акридину вбудовується між сусідніми основами ланцюга ДНК і збільшує відстань між ними (явище *інтеркаляції*). При цьому виникають помилки двох типів: втрата нуклеотиду або включення додаткової пари нуклеотидів.

**Ультрафіолетові промені та іонізуюче випромінювання.** Ультрафіолетові та рентгенівські промені, а також інші види іонізуючого випромінювання спричиняють як летальну, так і мутагенну дію. УФ промені діють на нуклеїнові кислоти, спричиняючи утворення димерів тиміну. Адаптивним механізмом, який дає можливість частині клітин вижити в результаті дії УФ та іншого опромінення, є механізм *репарації ДНК*. Якщо безпосередньо після УФ опромінення подіти на клітини світлом (320–550 нм), то частка клітин, які вижили, збільшується в кілька десятків разів. Це так звана *фотореактивація*. У процесі фотореактивації спеціальний фермент розщеплює димери тиміну і відновлює нормальну структуру ДНК. Існує також інший механізм репарації ДНК, який не потребує світла — *темнова реактивація*. Під час темнотової реактивації дефектні ділянки ДНК вирізуються і замінюються новими нуклеотидами.

**Мутації, які спричиняються транспозонами.** Транспозони (Tp) — короткі подвійні ланцюги ДНК, що складаються з більш як 2000 пар основ і зумовлюють стійкість до одного антибіотика (як виняток — до кількох антибіотиків). Транспозони здатні "перескакувати" з однієї ділянки геному на іншу, зокрема з бактеріальної хромосоми в плазмиду та навпаки. При вторгненні транспозону в якийсь структурний ген хромосоми нуклеотидна послідовність цього гена буде порушена — виникає *інсерційний мутант*. Транспозони не здатні до автономної реплікації, тому для перенесення їх з однієї клітини в іншу потрібен так званий *вектор* (переносник). Вектори можуть бути плазміди або бактеріофаги.

### 19.2.3. Відбір мутантіа

На звичайних агаризованих середовищах лише денкі мутанті можна виявити безпосередньо за зміною пігменту, зміною росту колоній та іншими ознаками. Деякі ознаки виявляються, якщо додати у середовище індикатори чи барвники. Для виділення аутокотрофних мутантів (наприклад, аутокотрофних за амінокислотами гістидином) порівнюють ріст клітин на двох середовищах: з гістидином і без нього. Мутанти будуть рости тільки на середовищі з гістидином.

Як правило, частота виникнення мутацій є невисокою. Тому для виявлення та відбору мутантів використовують методи **накопичення мутантів**. Отримати накопичувальну культуру мутантів, стійких до антибіотиків, отруйних речовин і фактів, досить легко: на середовищі, до якого доданий відповідний агент, будуть рости тільки мутантні штами. **Методи накопичення аутокотрофних мутантів** ґрунтуються на зворотному принципі: для клітинної суспензії створюють умови, в яких мутанти не ростуть, а прототрофні клітини відсіваються або знищуються. Існують речовини, що діють тільки на клітини, які ростуть, а клітинам, які не ростуть, вони не завдають шкоди. Після виділення антимікробного агента і додання необхідних факторів росту починають рости аутокотрофні клітини. Такою речовиною є пеніцилін. Метод накопичення аутокотрофних мутантів з використанням пеніциліну називається "**пеніциліновим збагаченням**", або "**пеніциліновим методом**". Пеніцилін вбиває тільки клітини, які ростуть. Для виділення пеніциліну застосовують фермент **пеніциліназу**. Якщо клітини є стійкими до пеніциліну, то для "збагачення" можна використовувати інші аналогічні за дією антибіотики — новобіоцин, циклосерин, колістин, канаміцин.

## 19.3. ПЕРЕДАВАННЯ ОЗНАК І ГЕНЕТИЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ

В еукаріотів під час запліднення об'єднуються гаплоїдні набори генів і утворюється диплоїдна зигота. У дочірньому диплоїдному організмі після мітотичних поділів і редукційного поділу (мейозу) відбувається перекомбінування хромосом, які нале-

жали обом батьківським наборам, і знову утворюються клітини з гаплоїдним набором генів (гамети). Такому статевому способу "перетасування" генетичного матеріалу протиставляють **пара-сексуальні процеси**, до яких належить і рекомбінація ознак у прокаріот. Бактерії майже завжди є гаплоїдними, вони мають лише один набір генів. Зиготи утворюються і у бактерій, але вони ніколи не бувають продуктом об'єднання цілих клітин. Як правило, з клітини-донора у клітину-реципієнт переносяться лише частини генетичного матеріалу, тобто утворюється неповна зигота (**мерозиота**). Хромосома реципієнта спарюється з фрагментом хромосоми донора, і вони обмінюються окремими ділянками. При наступному поділі клітини виникає клітина, яка містить тільки рекомбіновану хромосому.

У бактерій відомі три способи передавання ознак: **кон'югація**, **трансдукція**, **трансформація**. У результаті цих процесів ДНК переносяться з бактерії-донора у бактерію-реципієнт. Ці три процеси відрізняються один від одного способом транспортування ДНК. Після перенесення ДНК у клітині-реципієнті відбувається **рекомбінація**. При цьому ДНК донора вбудовується в ДНК бактерії-реципієнта. Клітину, в якій відбулася рекомбінація, називають **рекомбінантом** (**рекомбінантна клітина**).

### 19.3.1. Механізми генетичної рекомбінації

У наш час відомі три механізми рекомбінації сторонньої ДНК з бактеріальною хромосомою (або з плазмідом): загальна гомологічна, сайт-специфічна і негомологічна рекомбінації.

**Загальна гомологічна рекомбінація**. У цьому випадку партнери по рекомбінації повинні мати однакову нуклеотидну послідовність, тобто бути максимально гомологічними. Гомологічна рекомбінація перебуває під контролем *гес А* gena. Мутанти з дефектом цього gena (*гес А*) не здатні до гомологічної рекомбінації.

Існує декілька моделей даного механізму. Вважають, що спарювання основ відбувається між деспіралізованими одноланцюговими ділянками двох подвійних ланцюгів ДНК. Другий ланцюг утворюється, можливо, в результаті реплікації або репарції.

**Сайт-специфічна рекомбінація**. Цей процес здійснюється незалежно від гомологічної рекомбінації, тобто він є можливим

і у *рес А* мутантів. Суть процесу полягає в тому, що коротка дволанцюгова ДНК вбудовується в певному місці в довгу подвійну спіраль, при цьому менший партнер втрачає свою автономність. Типовим прикладом сайт-специфічної рекомбінації може бути інтеграція бактеріофага лямбда. Фаг при переході у стан профагу включається в хромосому клітини-хазяїна в певному місці — між *gal*-опероном і біотиновою областю. Включенню фага передують його присаднання до певної ділянки бактеріальної хромосоми. Раніше вважали, що таке включення зумовлене високим ступенем гомології нуклеотидних послідовностей, проте ця гомологія виявилася незначною. Очевидно, вирішальну роль у включенні фага у бактеріальну хромосому належить білку *інтегрази*, який кодується фагом. У певній ділянці фагової ДНК і у відповідній ділянці бактеріальної ДНК цей білок каталізує розрив і перехресне возз'єднання геномів фага та клітини-хазяїна.

**Негомологічна рекомбінація.** Рекомбінаційні процеси, в яких беруть участь сегменти ДНК, що не виявляють помітної генетичної гомології, називають негомологічною рекомбінацією. Як і сайт-специфічна рекомбінація, вона являє собою інтеграційну форму рекомбінації, тобто не обмін, а з'єднання ДНК.

Негомологічна рекомбінація є незалежною від *рес А* gena. До такої рекомбінації здатні: інсерційні (вставні) послідовності (IS-елементи); транспозони (Тп); бактеріофаг  $\mu$ .

**Інсерційні послідовності (IS-елементи)** зустрічаються як у бактеріальних хромосомах, так і в плазмідях. Вони складаються з 800–1400 пар нуклеотидів. Фенотипових ознак, які можна розпізнати, вони не кодують. Їх мутагенна дія зумовлена просто включенням сторонньої ДНК, яке порушує процес транскрипції.

**Транспозони** здатні "перескакувати" з однієї ділянки генома на іншу, зокрема з бактеріальної хромосоми в плазміді та навпаки. Транспозони містять гени, які кодують такі ознаки, як стійкість до антибіотиків. Тому їх легко виявити, ніж IS-елементи.

**Бактеріофаг  $\mu$**  схожий до IS-елементів і транспозонів незвичайною своєю поведінкою при включенні в бактеріальну хромосому. Йому притаманні типові властивості фага, і водночас його можна розглядати як гігантський транспозон.

### 19.3.2. Кон'югація

Перенесення генетичного матеріалу шляхом прямого контакту між двома клітинами називається *кон'югацією*. У 1946 р.

американські вчені Дж. Ледерберг і Е.Л. Татум провели вирішальний дослід і довели, що у бактерій можливе передавання генетичного матеріалу під час прямого міжклітинного контакту. Об'єктами дослідів були два мутантні штами *E. coli* K12, можна з яких був аутокотрофним за двома амінокислотами. Так, один із штамів потребував для росту амінокислоти А та В, але міг синтезувати С і D (А В С D<sup>-</sup>). Другий подвійний мутант був йому комплементарний (А<sup>-</sup> В<sup>-</sup> С D<sup>+</sup>). Ці обидва мутанти не росли на мінімальному середовищі і не утворювали колоній. Але якщо на це мінімальне середовище висівали суміш суспензій обох штамів, то колонії з'являлись. Клітини, які виростили на мінімальному середовищі, могли синтезувати всі чотири амінокислоти (А В С D<sup>+</sup>). Такі клітини виникли з частотою 10<sup>-6</sup>. Це були генетичні рекомбіанти, які об'єднували в собі генетичну інформацію двох дефектних батьківських штамів.

**Спрямоване перенесення *genis* із клітини в клітку.** Експерименти по схрещуванню двох штамів, один з яких був стрептоміциностійким, показали, що генетичний матеріал передається тільки в одному напрямку. Якщо клітини ціля схрещування висівали на середовищі зі стрептоміцином, то рекомбіанти виявлялись тільки тоді, коли один із штамів (а саме *штам реципієнта*) був стрептоміциностійким і виживав. Як поводив себе інший батьківський штам, було несуттєво: він міг бути стрептоміцинчутливим і загинути на цьому середовищі. Достатньо того, що він встиг виконати функцію *донора* генетичного матеріалу. Отже, перенесення генетичного матеріалу може відбуватися тільки в одному напрямку: від донора (чоловічий штам) до реципієнта (жіночий штам), а весь процес рекомбінації проходить у клітинах реципієнта. Рекомбіанти успадковують більшість своїх ознак від реципієнта, а від донора отримують тільки фрагменти геному.

**Фактор F і стан *Hfr*.** Дослідженнями процесу схрещування бактерій було встановлено, що здатність клітини бути донором зумовлена наявністю особливого фактора, який під час кон'югації передається з однієї клітини в іншу — *статевого фактора F* (від *англ. fertility* — плодовитість). Клітини, які не містять фактора F (клітини F<sup>-</sup>), можуть функціонувати тільки як реципієнти. Під час кон'югації, тобто за прямого контакту між клітинами, частота передачі фактора F становить близько 100 %. Отже, клітини-реципієнти в результаті кон'югації перетворюються на потенційних донорів, при цьому хромосомні ознаки ще не пере-

даються. Фактор *F* являє собою кільцеву дволанцюгову молекулу ДНК з масою  $45 \cdot 10^6$  Да. Як позахромосомний елемент, який здатний автономно реплікуватися, фактор *F* можна віднести до плазмід. Ця молекула містить гени, відповідальні за процес кон'югації, у тому числі гени, що детермінують особливі структури клітинної поверхні — *F*-пілі, необхідні для кон'югації. Їх не більше 1–2 на клітину. Пілі мають вигляд порожніх усередині білкових трубочок завдовжки від 0,5 до 10,0 мкм. За допомогою статевих пілей чоловіча клітина прикріплюється до жіночої, утворюючи кон'югаційний тунель, по якому ДНК передається від донора до реципієнта.

У популяції *F* лише небагато клітин здатні бути донорами хромосомної ДНК. Це клітини, в яких фактор *F* інтегрований у бактеріальну хромосому. Якщо такі клітини-донори використовувати в експериментах зі схрещування, то рекомбінанти утворюються в 1000 разів частіше, ніж з використанням звичайних клітин *F*. Клітини-донори, які забезпечують високу частоту рекомбінацій, мають назву *Hfr* (high frequency of recombinants).

Кон'югація є одним з найпоширеніших способів передавання генетичної інформації у бактерій. За допомогою кон'югації здійснюють картування хромосом (побудову генетичної карти). Штучно перериваючи кон'югацію у різні терміни після початку схрещування, визначають часову (у хвилинах) послідовність входження різних генів у жіночу клітину.

### 19.3.3. Трансдукція

Трансдукція — це процес передавання ДНК від клітини-донора до клітини-реципієнта за участю бактеріофагів. Як правило, фаг переносить лише невеликий фрагмент ДНК хазяїна. Є два типи трансдукції — *неспецифічна*, за якої може бути перенесений будь-який фрагмент ДНК хазяїна, та *специфічна*, за якої переносяться лише певні фрагменти ДНК. У процесі трансдукції фаги часто втрачають здатність лізувати клітини хазяїна.

**Неспецифічна трансдукція.** ДНК клітини хазяїна включається в частину фага або додатково до його власного геному, або замість нього. Перенесення ділянок бактеріальної хромосоми фагами був відкритий Дж. Ледербергом та Н.Ю. Циндером у *Salmonella typhimurium*. Штам-донор В інфікували бактеріофагом P22. Після

лізису клітини-хазяїна виділяли вільні фаги та інкубували їх разом з клітинами штам-реципієнта В. Після висівання інкубованих клітин на відповідне середовище з'являлися рекомбінанти, яким були притаманні властивості штам-донора В.

**Специфічна трансдукція.** Деякі гени фага заміщуються генами хазяїна. Найбільш відомою є трансдукція, яка здійснюється фагом лямбда, який трансдукує лише певні гени, а саме гени *gal* та *bio*. Цей фаг при переході у стан профага вкладається в певну ділянку хромосоми бактерії-хазяїна — між генами *gal* та *bio*. Відлення фагової ДНК від бактеріальної хромосоми (наприклад, при УФ опроміненні) може відбутися неточно, тобто якийсь її фрагмент залишиться у хромосомі, а близько розміщені гени клітини-хазяїна будуть захоплені фаговою ДНК. При ураженні таким трансдукуючим фагом клітин, дефектних за якимсь геном (наприклад, *gal*), може відбутися рекомбінація, яка приведе до заміни дефектного гена бактерії на інтактний трансдукуючий ген. При цьому утворюються рекомбінанти (трансдуканти) *gal*<sup>+</sup>.

Аналогічно гени переносяться бактеріофагом  $\Phi$ 80. Його ДНК вкладається в хромосому поблизу генів, які кодують ферменти, відповідальні за синтез триптофану. З цієї причини бактеріофаг  $\Phi$ 80 особливо придатний для перенесення генів *trp*.

Передумовою успішного перенесення генів за специфічної трансдукції (на відміну від неспецифічної) є інтеграція фага в геном клітини-хазяїна.

### 19.3.4. Трансформація

Гени можуть також передаватися з клітини в клітину без будь-якого міжклітинного контакту і без будь-яких переносників. Таке передавання генів за допомогою вільної розчинної ДНК, виділеної з клітин донора, називають *трансформацією*. У бактерій цей спосіб передавання ознак став відомим раніше за інші, і це відкриття відіграло важливу роль в історії науки.

Відкриття ролі ДНК як генетичного матеріалу. У 1928 р. Ф. Гриффіт описав перетворення безкапсульного *R*-штаму *Streptococcus pneumoniae* у штам, який утворює капсулу (*S*-штам). Гриффіт одночасно ввів мишам невелику кількість вірулентного *R*-штаму і вбиті нагріванням клітини *S*-штаму. З крові загинувих мишей були виділені вірулентні бактерії з капсулою *S*-типу. Отже,

вбиті S-клітини передали спадкову здатність до утворення капсул клітинам R-штаму, які в свою чергу передали її своїм нащадкам. Природу цього "трансформувального фактора" вдалося встановити у 1944 р. О. Ейвері. К.М. Мак-Леод та М. Мак-Карті. Виявилося, що це ДНК. Відкриття стало вирішальним аргументом на користь того, що генетична інформація міститься в ДНК, а не в білку.

**Компетентність.** Пізніше можливість передавання генетичної інформації шляхом трансформації була встановлена для багатьох бактерій. Цим способом можуть передаватися такі ознаки, як стійкість до різних отрут і прототрофічність щодо окремих амінокислот. Проте трансформувати можна тільки ті бактерії, у клітині яких може проникати високомолекулярна двокільцева інтактна ДНК. Такі клітини називаються *компетентними*. Отже, *компетентією* називається здатність клітин поглинати ДНК. Компетентність залежить від фізіологічного стану клітин: вона є найвищою в середині експоненційної фази росту. Компетентність клітин можна підвищити, обробляючи їх хлоридом кальцію або циклічним аденозинмонофосфатом (цАМФ).

Хоча в компетентні клітини може проникати будь-яка ДНК, рекомбінація відбувається лише в тому разі, якщо це ДНК близько спорідненого виду: тоді є можливим обмін між гомологічними ділянками власної та сторонньої ДНК.

### 19.3.5. Рестрикція та модифікація

Бактеріофаги проявляють специфічність щодо хазяїна: вони інфікують лише один штам бактерій або обмежену кількість споріднених штамів, видів чи родів. Основою цієї специфічності є насамперед рецепторні властивості поверхні бактеріальних клітин.

Крім того, у бактерій є й інші системи, які зумовлюють специфічність взаємовідносин з фагами. Одна з них — *система рестрикцій-модифікації*.

Встановлено, що бактеріофаг лямбда, здатний паразитувати в клітинах штаму К кишкової палички і виділений після лізису цих клітин, може лише з дуже низькою ефективністю уражувати клітини іншого штаму цієї бактерії — штаму В. І тільки деякі фагові частини, які вижили в штамі В, очолює паразитувати в клітинах цього штаму, але втрачали здатність уражува-

ти штаму К. Ці обидва штами являють собою дуже близькі варіанти кишкової палички. Намагаючись вникнути в причини цієї дивно поведінки фага лямбда, вчені і відкрили явище рестрикцій-модифікації у бактерій. Сузь цього явища полягає ось у чому.

У клітинах кишкової палички постійно утворюються ферменти *ендонуклеази* (*ендонуклеази рестрикції*, *рестриктази*), які пізнають у молекулах ДНК точні певні послідовності і розрізають її подвійну спіраль у цих місцях. Ендонуклеази і руйнували фазу ДНК у клітинах штаму В. Але тоді виникають закономірні запитання: а що, у штамі К взагалі немає рестриктаз? Чому рестриктази у штамі В не руйнують свою власну ДНК разом з фаговою?

Виявилось, що у штамі К рестриктази є, але інші: вони розщеплюють ДНК в інших ділянках. А в клітинах штаму В фермент *метилаза*, який *модифікує* (метилує, приєднує метильну групу) основу в ділянці ДНК, яка пізнається рестриктазою цього штаму. Модифікована ділянка ДНК стає недоступною для рестриктази, тобто модифікація захищає ДНК від "власних" рестриктаз. Вся ДНК, яка синтезується в бактеріальній клітині, модифікується уже в момент синтезу. Коли ж у клітину потрапляє стороння немодифікована метилюванням ДНК, вона руйнується рестриктазами. І лише окремі молекули сторонньої ДНК, які встигли модифікуватися, можуть функціонувати в клітинах. Ось чому лише деякі частини ДНК фага лямбда вдається врятувати у штамі В. Їх врятовують метилази хазяйської клітини.

Нині відомо кілька сотень різних рестриктаз, які синтезуються багатьма бактеріями. У табл. 19.2 наведена характеристика деяких рестриктаз, що використовуються в генетичних дослідженнях. Назви рестриктаз даються за скороченими латин-

Таблиця 19.2

Деякі ендонуклеази рестрикції

Ендонуклеаза	Походження	Сайт-пізнавання
EcoR I	<i>Escherichia coli</i> RY13	5'-G/AATTC-3'
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius</i>	5'-GG/CC-3'
Hae II	<i>Haemophilus aphrophilus</i>	5'-C/XGG-3'
Bam HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5'-G/GATCC-3'
Msp I	<i>Moraxella species</i>	5'-C/CATG-3'
Sma I	<i>Serratia marcescens</i>	5'-CCC/GGG-3'
Hha I	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'-GCG/CC-3'

ськими назвами мікроорганізмів, з яких вони виділені. Так, *EcoRI* означає: рестриктаза виділена з кишкової палички (*Escherichia coli*) штаму R першою числом.

Рестриктази є незамішними ферментами, що використовуються в генній інженерії. За їх допомогою стало можливим здійснення рекомбінації молекул ДНК *in vitro* (у пробірці).

### 19.3.6. Плазмід

Багато бактерій (якщо не всі) можуть містити позахромосомні елементи ДНК. Ці малі у порівнянні з бактеріальною хромосомою замкнені в кільце дволанцюгові ДНК називаються *плазмід*ами. При вирощуванні в звичайних умовах бактерії можуть обходитися без плазмід: клітини, позбавлені плазмід в результаті дії УФ опромінення, мітоміцину С або акридинового барвника, добре ростуть на звичайних поживних середовищах. Плазмід розпізнаються за властивостями, яких набуває клітина, що містить плазмід.

**Фактор фертильності (F-фактори).** Деякі плазмід роблять клітину здатною кон'югувати з іншими клітинами. З такими плазмід ми ознайомились при вивченні кон'югації. Ці плазмід можуть включатися у бактеріальну хромосому, мобілізуючи генетичну інформацію цієї хромосоми і здійснюючи перенесення її в іншу клітину.

**Фактори резистентності (R-фактори).** Бактерії, стійкі до деяких антибіотиків, були вперше відкриті в 50-х роках ХХ ст. в Японії. Це штами збудника дизентерії *Shigella*, виділені від хворих, яких лікували антибіотиками. Характерним було те, що бактерії виявляли множину стійкості, яка могла передаватися іншим бактеріям. Як стало відомо, фактори резистентності містять гени, які роблять клітину стійкою до сульфонамідів, стрептоміцину, канаміцину, тетрацикліну та ін. Так, плазмід R68.45 кодує стійкість до трьох антибіотиків: ампіциліну (300 мкг/мл), канаміцину (100 мкг/мл) та тетрацикліну (40 мкг/мл). Деякі R-фактори зумовлюють стійкість відразу до восьми антибіотиків, інші — до важких токсичних металів. R-плазмід несе дві групи генів: 1) гени, відповідальні за передавання плазмід шляхом кон'югації (гени *tra*). Вони утворюють так званий "фактор перенесення стійкості" (*RTF* — resistance transfer factor); 2) гени, які зумовлюють власне стійкість (вони становлять невелику частину плазмід).

**Фактор перенесення стійкості (RTF-фактор)** об'єднує всі гени, відповідальні за перенесення R-фактора з клітини в клітину, яке відбувається шляхом кон'югації. Таким чином, R-фактор, як і F-фактор, є інфекційним. Для деяких R-факторів характерним є широке коло хазяїв — вони можуть переноситися між кількома родами бактерій, що сприяє їх значному поширенню.

**Механізм стійкості до антибіотиків.** який визначається R-факторами, може бути не таким, як у разі хромосомного успадкування. Якщо стійкість до стрептоміцину залежить від хромосомного гена, то вона пов'язана із зміною субодиниці 30S рибосоми, а отже, бактерія не має мішені для дії антибіотика. На відміну від цього, стійкість, зумовлена R-фактором, ґрунтується на інактивності антибіотика в результаті його аденілювання під дією фермента. Ферментативна хімічна модифікація антибіотиків часто буває причиною стійкості до них, яка кодується плазмідом. За наявності R-факторів може виникати генетична рекомбінація, у результаті якої може виникнути нове сполучення генів, здатне зумовлювати додаткову стійкість до антибіотиків. Тому існування R-факторів є зливим доказом проти безконтрольного застосування антибіотиків, оскільки R-фактори можуть поширюватися у популяціях бактерій так само, як і інфекційні агенти.

**Бактеріодіни.** Багато які бактерії синтезують білки, здатні вбивати чи пригнічувати ріст близько споріднених штамів і видів. Ці білки — бактеріодіни — кодується особливими плазмідом — *бактеріодіногенними плазмідом*. Бактеріодіни виділені з *Escherichia coli* (колідини), *Pseudomonas aeruginosa* (шюдини), *Bacillus megaterium* (мегадини).

**Інші ознаки, що кодується плазмідом.** Гени ферментів, необхідних для розщеплення незвичайних субстратів (нафталіні, камфора, саліцилова кислота, октан та ін.), можуть міститися у плазмідіх. Азотфіксація, утворення бульбюль, синтез ідолілоцтової кислоти, гідрогенази — це далеко не повний перелік властивостей, які кодується плазмідом.

**Несумісність.** Багато які бактерії містять плазмід різної величини. Співіснування різних плазмід в одній клітині вказує на те, що ці плазмід є сумісними. Проте деякі споріднені плазмід не можуть співіснувати в одній клітині — вони є несумісними. Всі плазмід поділяються на групи несумісності. Плазмід, які належать до однієї групи, несумісні одна з одною.



### 19.3.7. Загальні принципи клонування генів (конструювання гібридних молекул ДНК *in vitro*)

Генетична інженерія є відносно новою методичною галуззю молекулярної біології та біотехнології. Об'єднання на початку 70-х років ХХ ст. незалежно розроблених методів дало можливість створити сучасну стратегію генетичної інженерії, суть якої полягає ось у чому: 1) у молекулу ДНК, здатну реплікуватися в клітині автономно від хромосоми (плазміді або вірусу ДНК), *in vitro* (у пробірці) ферментативно вбудовують фрагменти ДНК з будь-якого джерела; 2) одержані гібридні молекули вводять у чутливі клітини; 3) у клітинах гібридні молекули ДНК реплікуються, розмножуючи у своєму складі клонований фрагмент ДНК; 4) певними методами селекціонують клони клітин або вірусів, які містять індивідуальні молекули гібридних ДНК; 5) виявлені гібридні ДНК піддають різнобічному структурно-функціональному вивченню.

Найпростішим і найпопулярнішим методом отримання гібридних молекул ДНК є **рестриктазно-ліганий метод** (рис. 19.3).

Перші гібридні молекули були одержані таким методом у 1973 р. американцями С.Н. Коеном та Г.В. Бойсром. Гібридні молекули називаються також рекомбінантними.

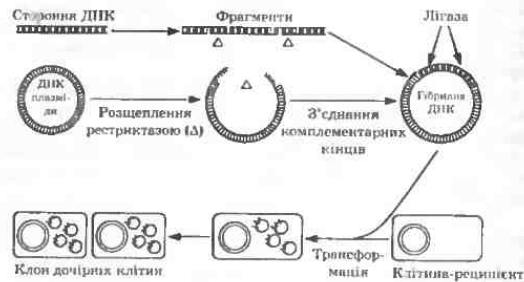


Рис. 19.3. Одержання гібридної ДНК введенням еукаріотичної ДНК у бактеріальну плазмиду (спрощена схема)

Плазміда розрізається однією з рестриктаз, здатних утворювати у фрагмента ДНК одноланцюгові "липкі" (тобто комплементарні) кінці. Такою рестриктазою є, наприклад, рестриктаза *EcoRI*. Цією ж рестриктазою розрізається нв фрагменти ДНК, в якій міститься ген, що цікавить дослідника. Якщо змішати ці фрагменти ДНК з розрізаною плазмідною, то з певною вірогідністю вони з'єднаються завдяки "липким" кінцям. Далі сторонню ДНК ковалентно пришивають до плазміді (вектора) за допомогою фермента **ДНК-лігازی**. Гібриду (рекомбінантну) молекулу ДНК шляхом трансформації вводять у клітину, де вона реплікується разом з плазмідною. Потомство клітини, яке містить гібридну ДНК, є генетично однорідним — воно утворює клон.

Генна інженерія відкрила небувалі раніше можливості для створення принципів нових продуцентів біологічно активних речовин.

### 19.3.8. Злиття протопластів

Уперше метод злиття протопластів з метою одержання рекомбінантних ДНК був застосований на клітинних культурах близько 30 років тому. Пізніше цей метод генетичної рекомбінації було впроваджено і на бактеріях, в основному грамположитивних (*Streptococcus*, *Bacillus*). Суть методу полягає у тому, що з батьківських клітин отримують протопласти, індують їх злиття обробленням поліетиленгліколем. Із протопластів, які залишились, у певних експериментальних умовах регенерували морфологічно повноцінні клітини (з клітинною стінкою), з яких одержувались стабільні рекомбінанти, що мали деякі ознаки обох батьківських клітин.

На відміну від таких механізмів перенесення ДНК, як кон'югація, трансдукція та трансформація, за яких ДНК передається тільки односпрямовано (від донора до реципієнта), перенесення генетичної інформації за злиття протопластів не має одностороннього характеру.

#### Контрольні запитання до розділу 19

1. Що впливає генетика?
2. Якої трансформації зазнало визначення поняття "ген" у зору розвитку молекулярно-біологічних досліджень?

3. Як відбувається реплікація ДНК? Які можливі механізми реплікації були запропоновані для пояснення цього процесу?
4. Для чого необхідний генетичний код? Які властивості притаманні генетичному коду?
5. Як відбувається синтез білка?
6. Як відбувається перенесення генетичної інформації у РНК-вірусів?
7. Які бувають мутації?
8. Наведіть приклади деяких механізмів мутагенезу.
9. Як здійснюється відбір мутантів?
10. У чому полягає суть методу "пеніцилінового збагачення"?
11. Які є механізми генетичної рекомбінації у прокаріот?
12. Які є способи передачі генетичної інформації у бактерій?
13. Які особливості притаманні таким способам передачі генетичної інформації, як кон'югація, трансдукція і трансформація?
14. Які ознаки можуть кодуватись плазмідами?
15. Які функції виконує система рестрикції-модифікації?
16. У чому полягає суть технології рекомбінантних ДНК?

## 20. РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЗМУ

У розділах, де розглядався обмін речовин у мікроорганізмів, неодноразово йшла мова про регуляцію метаболізму і росту факторами середовища. Так, ефект Л. Пастера (пригнічення бродиння атмосферним киснем) є чудовим прикладом такої регуляції. Відомо також, що деякі ферменти, які беруть участь у катаболізмі того чи іншого субстрату, синтезуються тільки у його присутності (індуцибельні ферменти). У денітрифікуючих бактерій нітратне дихання може початись лише за відсутності кисню, оскільки кисень пригнічує як утворення нітратредукуючої системи, так і її функцію. Зміна рН у культурах ентеробактерій чи клостридій може змінити хід бродиння і нахилити на природу утворюваних продуктів. У фототрофних бактерій кисень і світло впливають на синтез пігментів. Основою всіх цих та інших змін, зумовлених зовнішніми факторами середовища, є спеціальні регуляторні механізми.

Регуляція клітинного метаболізму може здійснюватись на двох рівнях: *синтезу ферментів і зміни активності ферментів.*

### 20.1. РЕГУЛЯЦІЯ СИНТЕЗУ ФЕРМЕНТІВ

Цей тип регуляції властивий багатьом метаболічним шляхам. Як правило, одночасно регулюється синтез багатьох ферментів, які належать до одного й того самого шляху. Мета цієї регуляції — забезпечити потрібне співвідношення між швидкістю синтезу певних ферментів і швидкістю синтезу сумарного клітинного білка. Регуляція синтезу ферментів охоплює регуляцію шляхом *індукції та репресії.*

#### 20.1.1. Індукція синтезу ферментів

Багато які ферменти синтезуються клітиною незалежно від умов середовища. Такі ферменти називаються *конститутив-*

ни ми (відповідно йдеться про конститутивні гени та конститутивний синтез ферментів). Проте ряд ферментів є **індуцибельними** — вони утворюються в клітині тільки у присутності певного субстрату. Для синтезу більшості ферментів, які беруть участь у катаболізмі субстратів, необхідна індукція. **Отже, шляхом індукції регулюється утворення катаболічних ферментів.**

Синтез ферментів може індукуватись субстратом або проміжним продуктом реакції.

**Індукція субстратом.** Прикладом такої індукції може бути індукція  $\beta$ -галактозидази — ферменту, необхідного для використання лактози клітинами *E. coli*. Цей фермент розщеплює лактозу на глюкозу та галактозу. Клітини, які ростуть на глюкозі, містять лише слідові кількості цього ферменту. При вирощуванні на лактозі (субстраті)  $\beta$ -галактозидазна активність збільшується у 1000 разів.

Якщо в результаті розщеплення субстрату утворюється ряд проміжних продуктів (А, В, С, D) і в цьому процесі беруть участь ферменти а, б, с, d, то індукція субстратом може бути **координованою** (субстрат індуктує одночасне утворення всіх ферментів від а до d) та **послідовною** (синтез ферментів здійснюється послідовно: спочатку а, потім б і т.д.) (рис. 20.1).

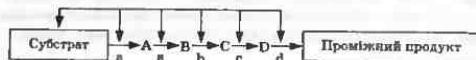


Рис. 20.1. Координована та послідовна індукція синтезу ферментів субстратом (схематичне зображення)

Координований синтез ферментів дає клітині ту перевагу, що вона може швидко реагувати на появу субстрату. За послідовної індукції швидкість перетворення субстрату, а отже, і швидкість росту клітин збільшуються повільно, оскільки концентрація першого продукту реакції повинна досягти певного порогового рівня, перш ніж вона буде стимулювати утворення другого ферменту.

**Індукція продуктами реакції.** За такого типу індукції синтез ферментів катаболізму індуктується продуктом першої або наступної реакції даного катаболічного шляху. Така індукція відбувається, наприклад, в результаті розщеплення триптофану (рис. 20.2). Катаболізм триптофану здійснюється через фор-



Рис. 20.2. Індукція синтезу ферментів продуктами реакції (схематичне зображення). Індуктором для групи ферментів, які беруть участь у розкладі триптофану, є проміжний продукт кінуренін

мил-кінуренін, кінуренін, антрацилінг до пірокатехіну. Індуктором для відповідної групи ферментів є кінуренін.

## 20.1.2. Репресія синтезу ферментів

Є два типи репресії синтезу ферментів: 1) репресія кінцевим продуктом; 2) катаболітна репресія.

**Репресія кінцевим продуктом.** За допомогою такого типу репресії регулюється синтез анаболічних ферментів (тобто ферментів, які беруть участь у процесах конструктивного метаболізму — процесах біосинтезу). З погляду економії вигідно, щоб ферменти певного біосинтетичного шляху не синтезувались, якщо його кінцевий продукт є в середовищі. Тому у присутності такого кінцевого продукту або за його накопичення знижується швидкість синтезу всіх ферментів, специфічних для даного біосинтетичного шляху (рис. 20.3).

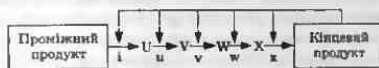


Рис. 20.3. Репресія синтезу ферментів кінцевим продуктом (схематичне зображення)

У розгалужених шляхах біосинтезу регуляція є більш складною. Прикладами можуть бути системи синтезу амінокислот ("родина ароматичних амінокислот", "родина аспарагінової кислоти") (див. рис. 13.2). Ферменти, які містяться перед розгалуженням, піддані репресії всіма кінцевими продуктами, що діють одночасно (**мультивалентна репресія**). Синтез цих ферментів пригнічується тільки тоді, коли в середовищі присутні всі кінцеві продукти; якщо ж добавляти їх окремо, ніякого ефекту не спостерігається.

**Катаболітна репресія.** У той час, як репресія кінцевим продуктом діє на шляхах біосинтезу, за допомогою катаболітної репресії регулюються катаболітні реакції. Якщо у поживному середовищі містяться два різних субстрати, то, як правило, бактерії віддають перевагу тому субстрату, який забезпечує більш швидкий ріст. Цей субстрат спричиняє репресію синтезу тих ферментів, які необхідні для використання другого субстрату. Катаболітна репресія є основою явища *диауксії* (последовного використання декількох субстратів) (див. рис. 6.6). Явище диауксії було виявлено у 1942 р. французьким ученим Ж. Моно. Він встановив, що культура *Bacillus subtilis*, яка росте на середовищі з глюкозою та арабінозою, спочатку використовує тільки глюкозу, а потім, після вичерпання глюкози, починається асиміляція арабінози. Це явище Б. Магасанік назвав "катаболітною репресією".

## 20.2. РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

Регуляція на рівні активності ферментів властива, як правило, тільки ключовим ферментам клітинного метаболізму. Каталітична активність ферментів, які беруть участь у тому чи іншому біосинтетичному шляху, може змінюватись: підвищуватись під дією *позитивного ефектора* або знижуватись під дією *негативного ефектора*. У разі *інгібування кінцевим продуктом* (*ретроінгібування*) останній пригнічує активність першого ферменту, який бере участь у даному ланцюгу реакцій. Такий тип регуляції називається також *інгібуванням за типом зворотного зв'язку* (рис. 20.4).

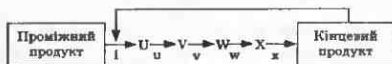


Рис. 20.4. Регуляція активності ферментів за типом зворотного зв'язку (схематичне зображення)

Якщо піримідинові нуклеотиди накопичуються в клітині, ЦТФ пригнічує активність *аспартаткарбамоїлтрансферази* — ферменту, який каталізує першу стадію їх синтезу (рис. 20.6).

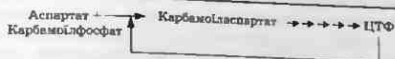


Рис. 20.6. Схема регуляції активності аспартаткарбамоїлтрансферази

Слід зазначити, що у процесі регуляції синтезу ферментів (індукція та репресія) клітини можуть лише повільно адаптуватись до змінених умов росту. Ці механізми можна розглядати як механізми грубої регуляції. Швидше пристосовували клітини до зміни умов середовища досягається регуляцією активності ферментів. Зміна активності ключового ферменту проявляється відразу ж — це вже тонка регуляція.

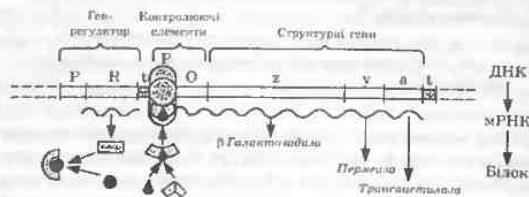
## 20.3. МЕХАНІЗМИ СИНТЕЗУ ФЕРМЕНТІВ (ІНДУКЦІЯ ТА РЕПРЕСІЯ)

Регуляція синтезу ферментів здійснюється на рівні *транскрипції*. Для такої регуляції необхідно, щоб до ДНК з інших частин клітини надходили певні сигнали. Сигнальні речовини (*молекули-ефектори*) являють собою низькомолекулярні сполуки (цукри та їх похідні, амінокислоти, нуклеотиди). Оскільки такі ефектори не можуть вступати у пряму взаємодію з ДНК, посередником для кожного з них служить певний *регуляторний білок*. Регуляторний білок, який зв'язується з ДНК за відсутності ефектора (*індуктора*), називають *репресором*. Регуляторний білок, який зв'язується з ДНК у присутності ефектора (*корепресора*), називають *апорепресором*.

### 20.3.1. Індукція лактозного оперону

Найдетальніше механізми індукції та репресії досліджені у процесі синтезу ферментів катаболізму лактози у *E. coli* (рис. 20.6). Три гени, які кодують  $\beta$ -галактозидазу, пермеазу та транс ацетилазу (*структурні гени*) локалізовані у хромосомі поряд один з одним. Ділянки ДНК, до яких приєднуються регуляторні білки, безпосередньо прилягають до структурних генів. Ці області називаються *промотором* (Р) та *оператором* (О). Про-

## А. З субстратом-індуктором



## Б. Без субстрату-індуктора

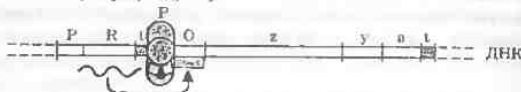
В. З субстратом-індуктором (лактозою)  
та субстратом-репресором (глюкозою)

Рис. 20.6. Модель регуляції лактозного оперону

мотор являє собою послідовність основ, яка розпізнається ДНК-залежною РНК-полімеразою. Промотор є місцем зв'язування РНК-полімерази, з нього починається транскрипція. Оператор являє собою нуклеотидну послідовність, яка розміщується між промотором і структурними генами. Оператор взаємодіє з регуляторним білком-репресором, від якого залежить, чи буде подавлена транскрипція, чи ні. Промотор, оператор і структурні гени утворюють *оперон*. Опероном називають групу функціонально зв'язаних між собою генів.

За синтез регуляторних білків відповідають *регуляторні гени* (Р та R; на рис. 20.6 розміщені ліворуч від промотора). Вони

не обов'язково можуть розміщуватися поряд з відповідним опероном. Гени-регулятори, як правило, є конститутивними. За припинення (термінації) синтезу мРНК відповідальним є *термінатор* (t) — спеціальна область ДНК, яка розміщується біля кінця оперону. Вся описана структура називається *лактозним опероном*. Розглянемо, як функціонує лактозний оперон. На рис. 20.6 наведено три можливі варіанти: без індуктора (лактози); з індуктором (лактозою); кatabолітна репресія (присутні два субстрати — лактоза та глюкоза).

У першому випадку (рис. 20.6, Б) (за відсутності лактози) репресор зв'язується з оператором і перешкоджає транскрипції, тобто операторна область блокується репресором.

Коли в клітину потрапляє лактоза, з неї за участю  $\beta$ -галактозидази утворюється алолактоза, яка служить внутрішнім індуктором. Цей внутрішній індуктор зв'язується з репресором, внаслідок чого репресор піддається конформаційним змінам так, що не може зв'язуватися з оператором (рис. 20.6, А). У результаті цього оперон залишається вільним, транскрипція стає можливою. Це так звана *негативна регуляція*. За негативної регуляції для ініціювання транскрипції репресор повинен бути витіснений індуктором.

Існує і *позитивна регуляція*, за якої необхідною умовою транскрипції є взаємодія оперона з активатором — другим регуляторним білком CAP або CRP (рис. 20.6, А). CAP (catabolite activator protein) і CRP (cyclic AMP receptor protein) є синонімами. Транскрипція можлива тільки тоді, коли білок CAP зв'язаний з промотором. Таке зв'язування CAP з промотором є необхідною умовою для приєднання РНК-полімерази до ДНК. Проте у свою чергу CAP може зв'язуватися з промотором тільки у тому разі, якщо в клітині в достатньо високій концентрації присутній циклічний АМФ (сАМФ).

У третьому випадку (кatabолітна репресія лактозного оперона; рис. 20.6, В), коли у середовищі присутні лактоза та глюкоза, синтез ферментів лактозного оперону пригнічується. Така дія глюкози зумовлена тим, що в її присутності концентрація циклічного АМФ є дуже низькою. У таких умовах CAP не може зв'язуватися з промотором, не відбувається приєднання РНК-полімерази до ДНК і процесу транскрипції. Відповідно до цього механізму кatabолітна репресія синтезу ферментів лактозного оперону у присутності глюкози може бути знята, якщо додати у середовище циклічний АМФ у високих концентраціях.

### 20.3.2. Репресія триптофанового оперону кінцевим продуктом

Механізм репресії кінцевим продуктом зображений на рис. 20.7. Триптофановий оперон *E. coli* містить структурні гени для синтезу п'яти ферментів, які беруть участь у перетворенні хоризмату у триптофан. На початку оперону міститься оператор і промотор. Модель репресибельного оперону була запропонована у 1961 р. французькими вченими Ф. Жакобом і Ж. Моно. Розміщений далеко від оперону ген-регулятор кодує ефекторний білок — апорепресор. У присутності кінцевого продукту триптофану (корепресора), який характеризується високою спорідненістю з апорепресором, утворюється репресор. Репресор зв'язується з оператором і таким чином блокує транскрипцію. Зниження концентрації триптофану знову супроводжується звільненням оператора і синтезом мРНК. За відсутності кінцевого продукту відбувається синтез ферменту. Ефективний репресор, який блокує оператор ("активованний" репресор), утворюється тільки за умови зв'язування кінцевого продукту або корепресора з апорепресором.

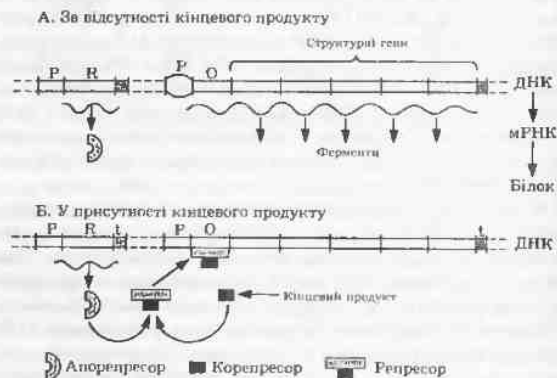


Рис. 20.7. Модель регуляції утворення біосинтетичних ферментів, що здійснюється шляхом репресії кінцевим продуктом

## 20.4. МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТІВ

### 20.4.1. Алостерична регуляція

З розглянутого в підрозділі 20.2 процесу ретроінгібування видно, що інгібітори за своєю хімічною природою здебільшого суттєво відрізняються від субстратів відповідних ферментів. Так, карбамойлфосфат і аспартат, субстрати *аспартаткарбамойлтрансферази*, дуже відрізняються від інгібітора цього ферменту — ЦТФ. Тому малоймовірно, що ЦТФ конкурує з субстратами аспартаткарбамойлтрансферази за активний центр ферменту. Фермент повинен містити спеціальні ділянки для зв'язування інгібіторів. Ж. Моно, Ж.П. Шьяге та Ф. Жакоб ввели термін "**алостеричні центри**" для позначення таких ділянок ферментів. Сполуки, які зв'язуються з цими центрами і змінюють активність ферментів, називаються **алостеричними ефекторами**, а ферменти, активність яких ці ефектори контролюють, — **алостеричними ферментами**.

Алостеричні ферменти являють собою олігомери, що складаються з двох, чотирьох, шести чи більше рівних субодиниць. Однією з найхарактерніших особливостей алостеричних ферментів є їх незвичайні кінетичні характеристики. Для алостеричних ферментів графік залежності швидкості реакції від концентрації субстрату являє собою сигмоїдну криву, а не гіперболу, як для простих ферментів.

Сигмоїдна залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату пояснюється **кооперативною взаємодією** субстрата і(або) ефекторів з ферментом. За зв'язування негативного ефектора з алостеричним центром ферменту його конформація змінюється так, що зменшується спорідненість активного центру ферменту з субстратом (фермент стає каталітично неактивним). У разі позитивного ефектора конформація ферменту змінюється таким чином, що спорідненість активного центру ферменту з субстратом підвищується (фермент стає каталітично активним).

**Алостерична регуляція центральних метаболічних шляхів.** Основне призначення каталітичних і центральних метаболічних шляхів — забезпечити клітину енергією та вихідним матеріалом для біосинтезу молекул. Тому цілком закономірно, що для регуляції метаболізму використовуються кінцеві продукти енер-



гетичного обміну та сполуки, які відіграють роль попередників у різних процесах біосинтезу. У таблиці наведені деякі алостеричні ферменти, що каталізують реакції центральних метаболічних шляхів у *E. coli*, а також їх активатори та інгібітори. Так, збільшення концентрації НАДН у клітинах свідчить про насичення дихального ланцюга відновлювальними еквівалентами і можливості зниження швидкості реакцій циклу трикарбонових кислот. Тому *цитратсинтаза* і *малатдегідрогеназа*, а також *піруватдегідрогеназа* інгібуються НАДН. *Фосфоенолпіруваткарбоксилаза* — один з аналостеричних ферментів, що забезпечує клітину  $C_4$ -дикарбоновими кислотами під час росту на вуглеводах, інгібуються аспаратом і малатом. Високий вміст цих кислот свідчить про те, що немає потреб в синтезі  $C_4$ -дикарбонових кислот. З другого боку, ацетил-CoA є активатором цього ферменту.

Алостеричні ферменти центральних метаболічних шляхів у *Escherichia coli*

Фермент	Інгібітор	Активатор
АДФ-глюкозо-пірофосфориллаза	АМФ	Глицеральдегід-3-фосфат, фруктозо-1,6-дифосфат, фосфоенолпіруват
Фруктозо-дифосфатаза	АМФ	—
Фосфоглюкокіназа	Фосфоенолпіруват	АДФ, ГДФ
Піруваткіназа	—	Фруктозо-1,6-дифосфат
Піруватдегідрогеназа	НАДН, ацетил-CoA	Фосфоенолпіруват, АМФ, ГДФ
Фосфоенолпіруваткарбоксилаза	Аспартат, малат	Ацетил-CoA, фруктозо-1,6-дифосфат, ЦТФ
Цитратсинтаза	НАДН, 2-оксоглутарат	—
Малатдегідрогеназа	НАДН	—

Фруктозо-1,6-дифосфат є стратегічно важливим продуктом, на рівні якого перетинаються шляхи гліколізу та синтезу глікогену. З підвищенням концентрації АМФ відбувається інгібування АДФ-глюкозо-пірофосфориллази та фруктозо-дифосфатази — двох ферментів, які беруть участь у синтезі глікогену. Підвищення концентрації фруктозо-1,6-дифосфату позитивно позначається на перебігу гліколізу, оскільки і *піруваткіназа*, і *фосфоенолпіруваткарбоксилаза* активуються фруктозо-1,6-дифосфатом. Якщо немає потреби в подальшому збільшенні гліколітичної активності, ФЕП інгібуює *фосфоглюкокіназу*, що сприяє утворенню глікогену.

**Енергетичний заряд клітини.** Слід зазначити, що аденин-нуклеотиди належать до числа важливих ефекторів. АМФ, як і АДФ, утворюється з АТФ у багатьох реакціях. Будь-яке збільшення концентрації цих аденилатів приводить до стимуляції синтезу АТФ. У результаті регуляції процесів синтезу та розпаду АТФ у клітинах живих організмів підтримується стаціонарний енергетичний стан. Згідно з Д. Аткинсоном, цей енергетичний статус може бути охарактеризований за допомогою *енергетичного заряду* (ЕЗ), який визначається так:

$$EZ = \frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Для систем, що містять тільки АТФ, енергетичний заряд дорівнює 1, а якщо тільки АМФ, — 0. Вимірювання показали, що енергетичний заряд клітин, які ростуть, дорівнює 0,8. Клітини *E. coli* гинуть, якщо енергетичний заряд стає меншим за 0,5.

Результати досліджень дають змогу вважати, що алостеричні ферменти активуються або інгібуються тим чи іншим аденилатом і що саме це забезпечує узгоджену регуляцію всього метаболізму клітини. Якщо, наприклад, енергетичний заряд клітини збільшується, то активність катаболічних ферментів знижується, а активність ферментів, які беруть участь у процесах синтезу, збільшується. При зникненні енергетичного заряду спостерігається зворотна картина.

## 20.4.2. Ковалентна модифікація ферментів

Останніми роками вчені частіше й частіше приходять до висновку про важливу роль ще одного механізму в регуляції активності ферментів — зміни активності ферментів у результаті ковалентної модифікації їх структури. Така ковалентна модифікація структури ферменту відбувається під дією інших ферментів, так званих модифікуювальних. Під впливом модифікуювальних ферментів ферменти переходять з активної форми в неактивну та навпаки. Ці дві форми відрізняються тим, що в одному випадку фермент несе ковалентно-зв'язану з ним групу, а в іншому — ні. Перший фермент, який існує в таких двох формах, виявив американський біохімік К.Ф. Корі зі співробітниками. Це була м'язова *глікогенфосфорилаза*, яка модифікувалась шля-

хом **фосфорилування**—**дефосфорилування**. Слід зазначити, що у прокаріот цей фермент не регулюється ковалентною модифікацією і взагалі модифікація ферментних систем шляхом фосфорилування-дефосфорилування є більш поширеною в еукаріот. У прокаріот виявлені дві системи ковалентної модифікації: активність **глутамінсинтети** регулюється шляхом **аденилювання**—**деаденилювання** і активність **цитратліази** — шляхом **ацетилювання**—**деацетилювання**.

### Контрольні запитання до розділу 20

1. На яких двох рівнях може здійснюватися регуляція клітинного метаболізму?
2. Які типи регуляції синтезу та активності ферментів Ви знаєте?
3. Як здійснюється регуляція синтезу каталітичних ферментів? Які особливості притаманні індукції субстратом та індукції проміжним продуктом?
4. Чим відрізняються між собою координувана та послідовна індукція?
5. Як здійснюється регуляція синтезу ацидичних ферментів? У чому полягає суть репресії кінцевим продуктом?
6. Який тип регуляції синтезу ферментів є основою явища дивакції? Як здійснюється каталітична репресія?
7. Як здійснюється інгібування за типом зворотного зв'язку? Яким ферментам клітинного метаболізму притаманна така регуляція активності ферментів?
8. Які механізми є основою регуляції синтезу ферментів (індукції та репресії)?
9. Що являє собою лактозний оперон *E. coli*?
10. Як здійснюється негативний і позитивний контроль лактозного оперону?
11. Охарактеризуйте триптофановий оперон *E. coli*.
12. Як здійснюється репресія триптофанного оперону кінцевим продуктом?
13. Які механізми є основою регуляції активності ферментів? Охарактеризуйте їх.
14. Як регулюється активність ферментів центральних метаболічних шляхів?
15. Що таке енергетичний заряд клітини?

## 21. МІКРООРГАНІЗМИ І НАВКОЛИШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ

### 21.1. УЧАСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ У КРУГООБІГУ РЕЧОВИН У ПРИРОДІ

За своєю роллю та функцією у балансі природи живі організми поділяються на три групи. Зелені рослини синтезують органічні речовини, використовуючи енергію сонця та вуглекислоту, тому їх називають **продуцентами**. Тварини є **споживачами** (консументами); вони витрачають значну частину первинної біомаси для побудови свого тіла. Рештки рослин і тварин кінець кінцем піддаються розкладанню, в результаті якого органічні речовини перетворюються на мінеральні, неорганічні сполуки. Цей процес називається **мінералізацією**. Його здійснюють у першу чергу гриби та бактерії, у балансі природи вони служать **деструкторами**.

**Кругообіг вуглецю.** У кругообігу вуглецю мікроорганізми забезпечують мінералізацію вуглецю, перетвореного зеленими рослинами в органічні сполуки, підтримуючи тим самим досить нестійку рівновагу. Атмосферне повітря містить трохи більше 0,03 % вуглецю. Фотосинтетична продуктивність зелених рослин є настільки великою, що запаси  $\text{CO}_2$  в атмосфері були б вичерпані приблизно за 20 років. Зеленим рослинам довелося б припинити фіксацію  $\text{CO}_2$ , якби нижчі тварини та мікроорганізми не забезпечували повернення цього газу в атмосферу завдяки безперервній **мінералізації органічного матеріалу**. У загальному балансі речовин у природі ґрунтові бактерії і гриби відіграють не менш значущу роль, ніж фотосинтезуювальні зелені рослини. Взаємозв'язок усіх живих істот на Землі найчіткіше відображається у кругообігу вуглецю.

Ще однією особливістю процесу мінералізації є надходження невеликої частини мінералізованого вуглецю (1,0–1,5 %) в атмосферу не у вигляді  $\text{CO}_2$ , а в формі метану ( $\text{CH}_4$ ). Цей газ утворю-

ється з органічних речовин у місцях, недоступних для кисню (у ґрунтах тундр, на рисових полях, у рубці жуйних тварин). В утворенні метану беруть участь метаногенні бактерії.

Моря на перший погляд здаються великим резервом вуглекислоти. Проте слід враховувати, що швидкість обміну  $\text{CO}_2$  атмосфери з  $\text{CO}_2$  морів, де більш як 90 % цієї сполуки перебуває у формі  $\text{HCO}_3^-$ , є досить низькою: за рік таким чином обмінюється лише десята частина атмосферного двоокису вуглецю. До того ж у газообміні моря з атмосферою бере участь лише тонкий поверхневий шар води. Виродожж багатьох останніх років вміст двоокису вуглецю в повітрі постійно зростає. Це можна пояснити двома причинами: спалюванням нафти та газу і зниженням фотосинтетичної фіксації  $\text{CO}_2$  в результаті вирубування великих лісових масивів і деградації ґрунтів. Слід зазначити, що Світовий океан являє собою потужну буферну систему, яка намагається підтримувати вміст  $\text{CO}_2$  в атмосфері на певному рівні.

У результаті фотосинтетичної фіксації  $\text{CO}_2$  зеленими рослинами утворюються в першу чергу цукри та споріднені з ними сполуки. Основна маса фіксованого вуглецю як у деревних, так і у трав'янистих рослин відкладається у формі полімерних вуглеводів. Оскільки серед продуктів асиміляції зелених рослин переважають полісахариди, то цукри відіграють велику роль у житті всіх живих організмів, яким потрібна органічна їжа. Глюкоза та інші цукри у формі полімерів є кількісно переважаючим субстратом для процесів мінералізації в природі; у вигляді мономерів вони є найкращими поживними речовинами для гетеротрофних мікроорганізмів.

**Кругообіг азоту.** Центральне місце у Кругообігу азоту займає амоній. Він є продуктом розкладання білків та амінокислот, які разом із рештками тваринного та рослинного походження потрапляють у ґрунт. У ґрунтах з високим рівнем перації амоній піддається нітрифікації: бактерії родів *Nitrosomonas* та *Nitrobacter* окиснюють його до нітриту та нітрату. Як джерело азоту рослини можуть використовувати як амоній, так і нітрат. За відсутності кисню з нітрату утворюється молекулярний азот (процес денітрифікації). Бактерії, які беруть участь у денітрифікації, використовують нітрат як термінальний акцептор електронів у анаеробному дихальному ланцюгу (анаеробне "нітратне" дихання). Денітрифікація супроводжується втратами азоту з ґрунтів. Разом з цим бактерії здатні і до фіксації молекулярного азоту. Азотфіксу-

вальні бактерії є вільно існуючими та симбіотичними (перебувають у симбіозі з вищими рослинами).

**Кругообіг фосфору.** У біосфері фосфор представлений майже виключно у вигляді фосфатів. У живих організмів фосфорна кислота існує у формі ефірів. Після відмирання клітин ці ефіри швидко розкладаються, що супроводжується вивільненням іонів фосфornoї кислоти. Для рослин доступною формою фосфору в ґрунтах є вільні іони ортофосфornoї кислоти ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Їх концентрація часто буває низькою; ріст рослин, як правило, лімітується не загальною недостатністю фосфатів, а утворенням малорозчинних його сполук (апатити, комплекси з важкими металами). У багатьох місцях фосфат з добрив потрапляє у проточні водойми. Оскільки концентрація іонів заліза, кальцію та алюмінію у водоймах є невисокою, фосфат залишається у розчинній формі, що супроводжується евтрофізацією водойм, особливо сприятливою для розвитку азотфіксуювальних ціанобактерій. У ґрунтах же внаслідок утворення нерозчинних солей фосфати найчастіше швидко стають недоступними для рослин.

**Кругообіг сірки.** У живих клітинах сірка представлена сульфогідрильними групами у складі сірковмісних амінокислот (метіонін, цистеїн, гомоцистеїн). У сухій речовині організмів частка сірки становить 1 %. У процесі анаеробного розкладання органічних речовин сульфогідрильні групи відщеплюються десульфуразами; утворення сірководню під час мінералізації в анаеробних умовах називають також десульфуруванням. Проте найбільша кількість сірководню утворюється у процесі дисимільційного відновлення сульфатів, яке здійснюється сульфатредукуючими бактеріями. Ці бактерії використовують сульфат як термінальний акцептор електронів у анаеробному дихальному ланцюгу ("сульфатне" дихання).

Сірководень, що утворився за відсутності кисню в осадах водойм, може бути окиснений анаеробними фототрофними бактеріями (Chromatiaceae) до сірки та сульфату. Коли сірководень проникає в зони, що містять кисень, він окиснюється або абіотично, або веробними сіркобактеріями до сульфату. Сірку, необхідну для синтезу сірковмісних амінокислот, рослини та частина мікроорганізмів отримують шляхом асиміляційної сульфатредукції; тварини ж отримують відновлені сполуки сірки з їжею.

**Фосфор та азот як фактори, що лімітують продукцію біомаси.** Елементами, що обмежують ріст рослин і тим самим про-

дукцію біомаси як на суші, так і в океанах, є фосфор та азот. За даними таблиці можна розраховувати, скільки біомаси може бути синтезовано з елементів, які містяться в 1 м<sup>3</sup> морської води. Із 28 г вуглецю може утворитися 60–100 г біомаси, з 0,3 г азоту — 6, а з 0,03 г фосфору — лише 5 г. Отже, продукцію біомаси лімітують в основному фосфати. У морській воді навіть азотфіксувальні організми — ціанобактерії — не мають селективної переваги над іншими.

Розподіл біоелементів у морській воді

Елемент	Вміст у сухій речовині організмів (N), г/100 г	Вміст у морській воді (A), г/м <sup>3</sup>	Відношення A/N
Калій	1	390	390
Вуглець	30	28	-1
Кремій	0,5	0,5	1
Азот	5	0,3	0,06
Фосфор	0,6	0,03	0,05
Сірка	1	900	900
Залізо	1	0,05	0,05
Ванадій	0,003	0,0003	0,1

## 21.2. ЕКОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ (ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ)

Вивченням зв'язку організмів між собою і з навколишнім середовищем займається екологія. Екологія мікроорганізмів досліджує лише окремі частини цілісних екологічних систем. Основною одиницею в екології є *екосистема*. До її складу входять як біотичні, так і абіотичні компоненти. Біотичні компоненти становлять спільність організмів, або *біоценоз*. При цьому йдеться, як правило, про популяції мікроорганізмів, причому популяції можуть складатися з одного чи кількох видів. Абіотичні компоненти — це фізико-хімічні умови екосистеми, в якій живуть організми. Приклади екосистем: озеро, коралова система рослин, рубець жуйної тварини, ротова порожнина людини та ін. Весь життєвий простір нашої планети — біосферу — можна розглядати як гігантську екосистему. З тією чи іншою еко-

системою часто пов'язують поняття *"навоколишнє середовище"*. Це середовище підтримує взаємозв'язок певного організму (або популяції) з біотичними та абіотичними компонентами екосистеми, які його (її) оточують.

У межах екосистеми для кожного виду можна описати *місцезіснування*. Це та ділянка або життєвий простір, в якій (якому) живе даний організм (індивідуум або популяція). На відміну від терміну "місцезіснування" поняття *"екологічна ніша"* відображає не місце у просторі, а функцію певного виду або популяції у спільності організмів.

Всі мікроорганізми екосистеми можна поділити на дві категорії: автохтонні та алохтонні. *Автохтонні* мікроорганізми є типовими мешканцями даної екосистеми; вони присутні в ній завжди. Наявність *алохтонних* (зимогенних) мікроорганізмів залежить від випадкового підвищення концентрації поживних речовин або добавлення певних сполук.

## 21.3. ТИПИ ВЗАЄМОВІДНОСИН МІЖ ОРГАНІЗМАМИ В ПРИРОДІ

Організми в природі існують у тісній взаємодії один з одним. Форми їх взаємовідносин можна умовно поділити на дві категорії: *симбіотичні* та *антагоністичні*.

### 21.3.1. Симбіотичні взаємовідносини

*Симбіотичні*, або *асоціативні* взаємовідносини характеризуються взаємною вигодою. Вони розглядаються як позитивні впливи організмів один на одного, якщо навіть тільки один партнер вииграє від співжиття з іншим.

*Симбіоз* — форма співіснування організмів, у результаті якого обидва симбіоти мають вигоду від спільного існування. Класична форма симбіозу являє собою таку форму співіснування, коли симбіоти в певних умовах не можуть існувати окремо один від одного. Прикладом служить співжиття гриба аскоміцета з певним видом водоростей, асоціації яких утворюють новий організм — лишайники. Ця асоціація отримує взаємну вигоду тільки в дуже специфічних екологічних умовах — за дефіциту

поживних речовин і в умовах засухи. Гриб є постачальником для водоростів мінеральних речовин і води з навколишнього середовища, а також захищає клітини водоростів від несприятливих факторів. Водорість як організм, здатний асимілювати  $\text{CO}_2$ , постачає грибу продукти фотосинтезу і продукти фіксації молекулярного азоту з повітря. Інші приклади симбіозу грибів з різними організмами були також наведені у розділі "Гриби".

У симбіозі бульбочкових бактерій з бобовими рослинами обидва асоціанти отримують користь від співжиття, проте зв'язки між ними є менш міцними, ніж у організмів, які утворюють лишайники. Різновид такого симбіозу називається *мутагізмом*, або *кооперацією*. І бактерії, і рослина-хазяїн можуть рости та розвиватись самостійно. У співіснуванні бульбочкові бактерії фіксують азот, продукти азотфіксації надходять до рослини, в результаті чого вона отримує доступні сполуки азоту, а бактерії — продукти асиміляції  $\text{CO}_2$ , що утворюються в рослині.

Існує форма симбіозу мікроорганізмів з мікроорганізмами, що називається *комєнсальїзмом*, у якій симбіонти користуються захистом або поживними речовинами за рахунок макроорганізму, не приносячи йому користі, але й не завдаючи шкоди. Прикладом є взаємовідносини організму людини з нормальною мікрофлорою тіла, наприклад, з сапрофітною мікрофлорою верхніх дихальних шляхів, шкіри, травного тракту. Представники нормальної мікрофлори перешкоджають розвитку хвороботворних мікроорганізмів, синтезують фактори росту, розщеплюють складні вуглеводи.

Симбіотичні взаємовідносини в спільнотах мікроорганізмів можуть проявлятися як *синтрофія*. Синтрофія — це явище спільного росту двох чи більше видів мікроорганізмів на середовищі, недоступному кожному виду окремо. Найпоширенішим типом синтрофії є обмін факторами росту або субстратами. Так, симбіоз у молочнокислих бактерій здійснюється внаслідок того, що кожен з симбіонтів синтезує і виділяє в середовище речовини, необхідні для інших партнерів.

Якщо стимуляція проявляється в результаті односторонньої дії, такий вид взаємовідносин називається *саєлітіїзмом*. Наприклад, за спільного росту на агаризованому середовищі довкола колоній мікроорганізмів, що синтезують цінкові солі, розмножуються мікроорганізми, які цей вітамін не продукують.

Синтрофна взаємодія може проявлятися також у тому, що один вид мікроорганізмів готує підґрунтя для розвитку іншого.

Такий тип синтрофії називається *метабіозом*. Метабіоз — форма взаємозв'язку, у якій продукти метаболізму одного мікроорганізму є субстратом (поживним чи енергетичним) для іншого. Так, нітрифікуючі бактерії роду *Nitrosomonas*, окиснюючи аміак до нітриту, забезпечують енергетичним субстратом бактерії роду *Nitrobacter*.

*Синєрїзм* — форма співіснування мікроорганізмів, у якій у асоціантів взаємно посилюються фізіологічні функції і виникають нові властивості. Прикладом є співіснування оцтовокислих бактерій і дріжджів ("чайний грибок"). Оцтовокислі бактерії перетворюють сахарозу на глюкозу і фруктозу, окиснюють моноукри до глюконової та оксоглутарової кислот, які використовуються дріжджами. Дріжджі синтезують вітаміни і забезпечують ними оцтовокислі бактерії.

### 21.3.2. Антагоністичні взаємовідносини

*Антагоністичні* взаємовідносини проявляються у пригніченні одного або кількох членів мікробної спільноти іншими.

*Пасивний (конкурентний) антагонізм* — взаємодія, за якої різні мікроорганізми використовують одні й ті самі поживні речовини. Пасивний антагонізм — це конкуренція у боротьбі за поживу та життєвий простір. У цій боротьбі перевагу мають мікроорганізми, яким притаманна висока швидкість росту та невизначливість до джерел живлення.

*Активний антагонізм* зумовлений виділенням бактеріцидних речовин. Ними можуть бути неспецифічні продукти обміну (органічні кислоти, спирти, аміак, феноли та ін.), які спричиняють коагуляцію білків цитоплазми. Так, молочнокислі бактерії, підкислюючи середовище, пригнічують розвиток гнильних бактерій. Причиною активного антагонізму може бути утворення специфічних бактеріостатичних або бактеріцидних речовин — антибіотиків, які вибірково діють на інші мікроорганізми. Форма антагонізму, зумовлена синтезом антибіотиків, розглядається як *антибіоз*. У 1928–1929 рр. А. Флемінг спостерігав різке пригнічення грибом *Penicillium notatum* патогенних стафілококів. У 1941–1942 рр. Е. Чейн та Г.В. Флорі з культуральної рідини гриба виділили антибіотик пеніцилін. За це відкриття, яке ознаменувало початок нової ери в розвитку меди-

цини — ери антибіотиків, А. Флемінг, Е. Чейн та Г.В. Флорі були удостоєні Нобелівської премії.

Явище мікробного антагонізму широко використовується в медицині та сільському господарстві. Живі мікроорганізми застосовуються для боротьби з дисбактеріозами, для лікування і профілактики інфекційних хвороб, для попередження розвитку токсинотворювальних грибів у кормах тварин, а також для боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами.

Найвиразніше антагоністичні взаємовідносини проявляються у формі **паразитизму та хижацтва**. Між цими формами взаємовідносин важко провести чітку грань, оскільки і хижаки, і паразити задовольняють свої потреби у поживі за рахунок жертви. Різниця між ними полягає в тому, що хижаки умертвляють свою жертву відразу ж, тоді як паразити живляться за рахунок живого організму, який залишається живим упродовж тривалішого часу. Наприклад, бактеріофаги (віруси бактерій) є облигатними паразитами, вони втратили здатність до сапрофітного способу життя, оскільки не здатні розмножуватися поза організмом хазяїна. Бактерії *Bdellovibrio* є паразитами грамнегативних бактерій. Факультативні паразити можуть розвиватися поза організмом хазяїна і навіть рости на поживних середовищах.

Отже, між мікроорганізмами у природних асоціаціях встановлюються певні взаємовідносини, які можуть змінюватися і не мають чітких меж між собою. Причини, від яких залежить прояв тих чи інших форм взаємовідносин, зумовлені конкретними умовами існування, а також характерними особливостями обміну речовин самих організмів.

## 21.4. ЕВОЛЮЦІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Всі організми, які живуть на Землі, пройшли разом довгий шлях розвитку. З простіших форм поступово розвивалися складніші і спеціалізовані, а потім і такі, що населили нашу планету нині. Ця еволюція організмів є однією із центральних проблем у біології.

Первинна атмосфера Землі, найвірогідніше, містила багато водню, метану, азоту та вуглекислого газу, але в ній не було кисню.

**Хімічна еволюція.** Ця еволюція могла відбуватися тільки в безкисневій атмосфері. Вважається, що в такій атмосфері під дією сонячної радіації та в результаті електричних розрядів утворюва-

лись органічні речовини, які потім потрапляли в воду і в ній накопичувалися. Коли вміст органічних речовин став досить високим, виникли умови, в яких міг здійснитися перехід від хімічної еволюції до виникнення перших живих істот, здатних до самовідтворення.

**Біологічна еволюція.** Перехід від неживої органічної матерії до живої клітини потребував тривалого часу (від 3 до 4,5 млрд років). Клітинні організми, які з'явилися, мали настільки велику селективну перевагу, що всі попередні форми організації були витіснені. Оскільки доквітінні форми життя (якщо вони існували), не збереглися, можна припустити, що перехід від неживого до живого відбувся досить швидко.

**Еволюція прокаріот.** Першими прокаріотами, які могли з'явитися в анаеробних умовах у водоймах, багатих на органічні речовини, були організми, здатні до броїння. Янцю припустити, що у водоймах містилися і сульфати, то наступним досягненням органічної еволюції міг бути ефективний транспорт електронів з утворенням протонного потенціалу як джерела енергії для синтезу АТФ. На цьому етапі еволюції виникли, очевидно, похідні тетрапіролу, які містять залізо або нікель, а також автотрофний спосіб асиміляції вуглецю (актиліл-КоА-шлях). Як релікти тих часів можуть розглядатися метаногенні та цистогенні бактерії, а також сульфатовідновлювальні бактерії, які, за окремими винятками, можуть використовувати  $H_2$ ,  $CO_2$  і деякі продукти броїння.

Після "винайдення" фосфорилування, спряженого з переїсенням електронів, могла виникнути фотосистема I, що уможливила використання світла як джерела енергії. З набуттям здатності до фіксації вуглекислоти у циклі Кальвіна і до використання неорганічних донорів електронів виник тип метаболізму, характерний для пурпурових сіркових бактерій. Наступним етапом була поява фотосистеми II: стало можливим нециклічне переїсення електронів з використанням води як їх донора. Цей процес був неминуче пов'язаний з виділенням кисню. Представниками перших мікроорганізмів, які здійснюють фотосинтез з виділенням кисню, є ціанобактерії.

Перехід від відновлювальної до окиснювальної атмосфери був великою подією як у еволюції живих істот, так і в петровітні мінералів. Виникає новий тип метаболізму — аеробне дихання. Існує думка, що 2,1 млрд років тому уже існували всі відомі нині фототрофні дихаючі прокаріоти. Упродовж наступних років усе життя на Землі залежало від біологічного фотосинтезу і кис-



ню, який виділяли рослини. Накопичення кисню в атмосфері вплинуло і на неживу природу (через окиснення металів і мінералів) — утворились відкладення вуглецю у формі кам'яного вугілля, нафти, природного газу та вуглецевмісних осадових порід.

**Еволюція еукаріот.** Еукаріотичні клітини виникли, очевидно, лише з появою в атмосфері кисню. Всі еукаріоти (за деяким винятком) є аеробними організмами. На шляху подальшої еволюції прокаріот стояли нездоланні перешкоди, пов'язані насамперед з малими розмірами геному, його гаплотидним станом і малою величиною клітин. Нове навколишнє середовище з аеробними умовами давало змогу одержувати більше енергії, проте для її використання потрібні були більші клітини, широкі можливості структурної диференціації і значно більший геном, здатний забезпечувати зберігання більшого масиву інформації. Для подальшої еволюції потрібне було створення нової моделі. Передбачається, що на ранніх етапах еволюції еукаріотичної клітини виникали різні проміжні моделі її організації до появи багатоклітинних організмів.

Слід зазначити, що еукаріоти спеціалізувались в основному на фотосинтезі та існуванні в аеробних умовах, а багато інших екологічних функцій залишилось за прокаріотами. До них належать фіксація молекулярного азоту, нітрифікація, денітрифікація, сульфатне і сіркове дихання, окиснення сірки та металів, утворення та використання метану. Крутообіг азоту та сірки є у повному "розпорядженні" прокаріот. Прокаріоти могли б підтримувати крутообіг речовин і зберегти біосферу, тоді як еукаріоти не справились би з таким завданням.

Упродовж еволюції еукаріоти завжди протистояли прокаріотам. Багатоклітинні організми своїми високорозвинутими захисними та іншими пристосуваннями зобов'язані агресивності прокаріот. Разом з тим еукаріоти набули здатності мати і користь від тісної асоціації з прокаріотами і навіть поставили їх собі на службу як екто- та ендосимбіонтів.

Еволюція живих організмів пропонує для вирішення безліч проблем. Їх дослідження тільки розпочинається.

#### Контрольні запитання до розділу 21

1. Яку роль відіграють мікроорганізми у крутообігу вуглецю, азоту, фосфору та сірки в природі?
2. Дайте визначення понять "екосистема", "біосфера", "навколишнє середовище", "еконіша".

3. Які мікроорганізми називаються автохтонними та аллохтонними?
4. Які особливості притаманні симбіотичним та антагоністичним відносинам між організмами?
5. Які існують різновиди симбіозу?
6. Що таке синтрофія?
7. Які є форми антагонізму?
8. Чим різняться хижацтво та паразитизм?
9. Охарактеризуйте основні етапи еволюції мікроорганізмів.
10. Як відбувалась еволюція прокаріот і еукаріот?

## 22. МІКРООРГАНІЗМИ ЯК ОБ'ЄКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

Характеристика світового ринку біотехнологічної продукції. За визначенням Європейської біотехнологічної федерації (ЄБФ), біотехнологія є такою інтеграцією природничих та інженерних наук, за допомогою якої використання клітин, клітинних структур та окремих біомолекул дає можливість одержувати якісніші і дешевші продукти медичного та промислового призначення або проводити інші корисні маніпуляції. У своїй основі біотехнологія є синтезом таких наук, як мікробіологія, біохімія, молекулярна біологія, генетика, органічна, аналітична та неорганічна хімія, процеси і апарати та ін.

У 70-і роки ХХ ст., коли була показана можливість введення змін до генофонду організмів, що зробило біотехнологію однією з найбільш економічно вигідних галузей, ЄБФ поставила за мету:

поглибити співробітництво між біотехнологією та спорідненими галузями;

створити у всіх країнах урядові організації, що вивчають можливості біотехнології;

широко вивчати біотехнологію (серед її спеціальні школи, університети), систематично пропагувати перспективи і досягнення галузі.

Інтенсивно біотехнологія почала розвиватися з середини ХХ століття. Завдяки розвитку медичної промисловості виникли процеси промислового одержання амінокислот, вітамінів, ферментів та ін. Біотехнологічні процеси значно розширили сферу виробництва у харчовій промисловості. Ферментативний каталіз замінив собою деякі реакції в синтезі органічних сполук. Численні технології захисту рослин, що ґрунтуються на використанні мікроорганізмів і рослин, яляють собою класичні приклади екобіотехнологій. Пова всім сумнівом у ХХІ ст. біотехнологія є одним з домінуючих напрямів як у науці, так і в промисловості.

За оцінками більшості експертів світовий ринок біотехнологічної продукції (станом на 2003 р.) може бути охарактеризований так:

препарати для харчової промисловості і сільського господарства з річним обсягом продажу близько 45 млрд доларів;  
насінний матеріал генно-модифікованих рослин — 30 млрд доларів;

фармацевтичні препарати — 26 млрд доларів;

ферменти для виробництва мийних засобів — 21 млрд доларів;  
лікувально-косметичні засоби, одержані з рослинної і тваринної сировини, — близько 40 млрд доларів;

всього — понад 160 млрд доларів.

Передбачається, що до 2010 р. обсяг цього ринку перевищить 2 трлн доларів. Упродовж 10 років прогнозується значне розширення сфер використання біотехнології у таких важливих галузях, як тонка хімія (біокатализатори, продукти органічного синтезу), видобувна промисловість (біогеотехнології, біоре mediaція ґрунтів), виробництво напівпровідників (нові матеріали), інформаційні технології (мікроелектронні системи, засоби біоінформатики, біокомп'ютери). В окремих галузях впроваджено біотехнологічних методів приведе до якісних змін виробничої бази. Продукція, що одержується з використанням біотехнологічних процесів, становитиме у 2010 р. близько 30 % ринку хімікатів, який оцінюється у 1,5 трлн доларів, а серед засобів агрохімії (46 млрд доларів) на частку біотехнології рослинництва припаде не менше 20 млрд доларів.

З високорозвинутих країн США одні з перших оцінили перспективу розвитку біотехнології. Так, у 1997 р. у США було зареєстровано близько 1000 великих і середніх біотехнологічних компаній. На виробництво біофармацевтичних препаратів було витрчено 7 млрд, а прибуток становив 16 млрд доларів. У 2000 р. кількість біотехнологічних компаній збільшилась до 1300, а їх прибуток — до 19,6 млрд доларів.

Вартість біотехнологічної продукції, виробленої у США за 1985–1996 рр.

Продукція	Вартість у доларах
Фармацевтичні засоби	20 млрд.
Діагностичні засоби	10 млрд.
Вакцини	5,5 млрд.
Ферменти	700 млн.
Засоби біобезпечки	400 млн.
Кормові добавки	300 млн.

Японія посідає друге місце після США за рівнем розвитку біотехнологій. Якщо в традиційних галузях біотехнологій (виробництво ферментів, антибіотиків, амінокислот) позиції Японії досить сильні, то у використанні методів новітньої біотехнології спостерігалось значне відставання від США. Для його подолання Японія зробила ставку на революційний розвиток біотехнології. На здійснення 10-річної програми розвитку біотехнології (1981–1990 рр.) було асигновано 517,2 млн доларів, а на період з 1991 по 2000 р. — понад 2 млрд доларів. Для проведення біотехнологічних досліджень на період з 2000 по 2004 р. уряд Японії виділив (у перерахунку) близько 20 млрд євро. За оцінками експертів обсяг японського ринку біотехнологічної продукції у 2010 р. становитиме 230 млрд доларів. Республіка Корея проголосила 2002 рік "роком біотехнології": її урядом асигновано 259 млн доларів на підготовку молодих учених у цій галузі.

У 2002 р. обсяг російського ринку біопрепаратів становив 1,2–1,4 млрд доларів, з яких на частку російських біотехнологічних виробництв припадало 300–360 млн доларів (близько 30 %), решта — імпорт.

За прогнозами експертів до 2005 р. обсяг європейського ринку біотехнологій досягне 100 млрд євро. Намагаючись ліквідувати відставання від США, країни Західної Європи постійно збільшують державну допомогу компаніям, що займаються розробкою біотехнологій. Так, з 1994 по 1998 р. цим компаніям було виділено 10 млрд євро, з яких 75 % припадало на три країни: Німеччина — 3 млрд, Великобританія — 2,5 і Франція — 2 млрд. У 1999 р. державна підтримка біотехнологічної галузі у західноєвропейських країнах становила 2 млрд євро.

Порівняльні дані розвитку біотехнологічної галузі в США і Західній Європі наведено у табл. 22.1.

**Шляхи використання мікроорганізмів у біотехнології.** Незважаючи на велику різноманітність агентів, що здійснюють біотехнологічні маніпуляції, основними об'єктами біотехнології в наш час є мікроорганізми.

Шляхи використання мікроорганізмів у біотехнології наведені в табл. 22.2. Мікроорганізми використовуються для біосинтезу практично важливих метаболітів (амінокислот, органічних кислот, ферментів, екзополісахаридів, лєсїтинів, поверхнево-активних речовин, вітамінів, стимуляторів росту, гормонів); одержання білкових продуктів, пробіотиків і добрив (препарати на основі біо-

Таблиця 22.1  
Основні показники біотехнологічної галузі у 1999 р.

Показники	США	Західна Європа
Кількість фірм	1283	1351
Кількість виданих патентів	660	350
Ринкова вартість акціонерного капіталу	280 000	40 000
Кількість працівників	153000	53511
Оборот	15811	5368
Збитки	4335	1189
Витрати на науково-дослідні роботи	8416	3164

Дані по США за 1998 р.

\* млн євро

Мікроорганізми як об'єкти біотехнології

Таблиця 22.2

Шляхи використання мікроорганізмів	Характеристика мікроорганізмів		
	Тип метаболізму	Тип живих	Представники
Біосинтез практично важливих метаболітів			
Амінокислоти, органічні кислоти, антибіотики, ферменти, екзополісахариди, лєсїтини, поверхнево-активні речовини, вітаміни, стимулятори росту, гормони	Окиснювальний (O <sub>2</sub> — парціальний акцептор електронів)	Хеморганогетеротрофи	Аеробні бактерії, гриби, дріжджі
Органічні кислоти, спирти, кетони	Бродильний	Те саме	Анаеробні бактерії, дріжджі
Препарати на основі біомаси			
Пробіотики	Окиснювальний		Бактерії роду <i>Bacillus</i>
	Бродильний		Молочнокислі бактерії
Добрива	Окиснювальний		Азотфіксуючі бактерії
Білкові продукти	Окиснювальний	Фотоліто-автотрофія	Цянобактерії
		Хеморганогетеротрофія	Аеробні еубактерії
		Те саме	Дріжджі

\* Для синтезу вітамінів використовуються також анаеробні бактерії, здатні до бродіння та анаеробного дихання

Закінчення табл. 22.2

Шляхи використання мікроорганізмів	Характеристика мікроорганізмів		
	Тип метаболізму	Тип живлення	Представники
<b>Отримання енергії</b> Біогаз (метан)	Анаеробне дихання ( $\text{CO}_2$ — термінальний акцептор електронів)	Хемолітопатотрофія	Анаеробні метаногенні бактерії
<b>Біотехнологія металів</b> Вилуговування металів із руд	Окиснювальний (O — термінальний акцептор електронів)	Те саме	Аеробні бактерії, які окиснюють сірку та залізо
<b>Трансформація речовин мікроорганізмами</b> Використання мікроорганізмів для синтезу стероїдів, ефедрину, виробництва напівсинтетичних пеніцилінів	Окиснювальний	Хемоорганогетеротрофія	Аеробні бактерії, гриби
	Бродильний	Те саме	Дріжджі

маси); одержання енергії (біогазу); вилуговування металів із руд; трансформації речовин (синтез стероїдів, ефедрину, виробництво напівсинтетичних пеніцилінів). У табл. 22.2 наводиться також характеристика мікроорганізмів — об'єктів біотехнології.

Як видно з наведених даних, у біотехнології використовуються досить велика і різноманітна група мікроорганізмів: мікроміцети, дріжджі, бактерії — представники різних фізіологічних і таксономічних груп, які різняться як за типом метаболізму, так і за типом живлення.

## 22.1. БІОСИНТЕЗ ПРАКТИЧНО ВАЖЛИВИХ МЕТАБОЛІТІВ

Відомості про утворення мікроорганізмами біологічно активних сполук наведені в попередніх розділах (розділ “Гриби” — біологічно активні речовини грибів та розділ “Метаболічна активність аеробних гетеротрофів” — неповні окиснення).

Підсумкові дані про використання мікроорганізмів для синтезу практично важливих метаболітів, а також характерис-

тика деяких таких сполук наведені в табл. 22.3–22.8. Для одержання амінокислот, антибіотиків, ферментів, полісахаридів, лектинів, сурфактантів, деяких органічних кислот використовуються вероїми хемоорганотрофні бактерії, гриби та дріжджі. Біосинтез вітамінів може здійснюватись також і анаеробними бактеріями (клостриді, пропіоновокислі та метаногенні), які реалізують бродильний тип метаболізму або здатні до анаеробного дихання. За допомогою анаеробних бактерій і дріжджів, для яких характерним є бродильний тип метаболізму, одержують спирт, кетони, органічні кислоти.

За даними 1990 р. на світовому ринку комерційний оборот від реалізації технічних ферментних препаратів становив 800 млн доларів. 80 % усіх ферментів технічного призначення використовувались у таких трьох галузях, як гідроліз крохмалю — 40 %, виробництво детергентів — 30, виробництво сирів — 10 %. Як показує аналіз реалізації ферментів за останні 10 років,

Таблиця 22.3

Класифікація антибіотиків (за механізмом біологічної дії)

Номер групи	Біологічна дія антибіотиків	Представники
1	Пригнічення синтезу клітинної стінки	Пеніциліни, бензотриазини, ванкомицини, цефалоспорины
2	Порушення функцій мембрани	Поліети, амліноміцини, грамїцидини, трихоспін
8	Пригнічення синтезу (обміну) РНК	Алізаміцини, гризеофульвіл, камазіди, неомицини, новобіони, олівоміцини
	Пригнічення синтезу (обміну) ДНК	Актиноміцини D, мітоміцини, новобіони, саркоміцини, брувомицини
4	Пригнічення синтезу пуринів і піримідинів	Азасерин, левоміцин, саркоміцини
5	Пригнічення синтезу білка	Бензотриазини, аміноглікозици, макроліди, тетрацикліни, хлорамфенікол
8	Інгібітори дихання	Олігоміцини, патулі, пісолівін
7	Інгібітори окиснювального фосфорилювання	Валіноміцини, грамїцидини, коліцили, олігоміцини
8	Антиметаболіти амінокислот, вітамінів, нуклеїнових кислот	Циклосерин
9	Конкурентна дія в процесі метаболізму	Пуроміцини, циклосерин, актильнова кислота

Таблиця 22.4

## Антибіотики мікробного походження

Мікро-організм	Продукт	Антибіотик	Хімічна природа антибіотиків
Бактерії	<i>Bacillus brevis</i>	Грамцикліни (A, B, C, D)	Поліпептиди та низькомолекулярні білки
	<i>Bacillus polymyxa</i> , <i>Bacillus circulans</i>	Поліліксини (A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , C, D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub> , E <sub>1</sub> , (колестин A), E <sub>2</sub> (колестин B), M, P, R)	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Ванцикліни (A, A <sub>1</sub> , B, C, D, E, F, F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub> , G)	
	<i>Streptococcus lactis</i>	Нізин	
Бактерії (актино-міцети)	<i>Streptomyces griseus</i>	Стрептоміцин	Аміноглікозиди
	<i>Streptomyces fradiae</i> , <i>Streptomyces albobacillus</i>	Неоміцини	
	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Канаміцини	
	<i>Micromonospora purpurea</i> (echinospora)	Гентаміцини	Тетрацикліни
	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Хлортетрациклін	
	<i>Streptomyces rimosus</i>	Оксететрациклін	
	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Тетрациклін	Хромопептиди
	<i>Streptomyces antibioticus</i> , <i>Streptomyces chrysomallus</i> , <i>Streptomyces flavus</i>	Актиноміцини	
	<i>Streptomyces erythraeus</i>	Еритроміцин	
	<i>Streptomyces antibioticus</i>	Олеандоміцин	Макроліди
	<i>Streptomyces filipensis</i>	Фліпіні	
	<i>Streptomyces notalensis</i>	Пімаріцини	
	<i>Nocardia mediterranea</i> (представники роду <i>Micromonospora</i> )	Рифаміцини (рифаміцин, рифамід)	Аноліцини
	<i>Streptomyces spectabilis</i>	Стрептоваріцини	
	<i>Streptomyces tilyoripharus</i>	Толіоміцини	
Міцеліальні гриби	<i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium nigricans</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i>	Пеніциліни	β-лактамі антибіотики
	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Цефалоспорицини	
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Фузігарілі	Полісеновий антибіотик
	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Гризеофульвін	Гетероцикліні антибіотики
	<i>Trichotecium roseum</i>	Трихотетсин	

Таблиця 22.5

## Мікроорганізми — продуценти промислових ферментів

Фермент	Гриби	Бактерії
α-Амілаза	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкоамілаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Rhizopus niveus</i> <i>Endomycopsis</i> sp.	—
Пульвераз	—	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Декстраназа	<i>Penicillium</i> sp.	—
β-Глюконаза	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Глюкозоізомераза	—	<i>Actinoplanes missouriensis</i>
Інвертаза	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—
Целюлази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma roseum</i> <i>Trichoderma viride</i>	—
Пектинази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus awamori</i>	—
Протеїнази	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Mucor mihel</i> <i>Mucor rouxi</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i>
Ліпази	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Candida cylindrica</i> <i>Mucor mihel</i> <i>Rhizopus</i> sp.	—
Глюкозооксидаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium vitale</i> <i>Penicillium notatum</i>	—
Каталаза	<i>Aspergillus</i> sp.	—
Лактатидеаза	<i>Aspergillus</i> sp.	—
Аспартаза	—	<i>Escherichia coli</i>
Фузартаза	—	<i>Escherichia coli</i>
Пеніцилінамідаза	—	<i>Escherichia coli</i>

Таблиця 22.6

## Класифікація промислових мікробних екзополісахаридів

Група ЕПС	Назва ЕПС і продуцента	Характеристика ЕПС	Галузь використання
№ 1 — гомополісахариди, синтез яких здійснюється на середовищах, що містять специфічний вуглецевий субстрат	Декстран — <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus boula</i> , <i>Streptococcus viridans</i>	$\alpha$ -D-глюкан	Заміняє плазми крові, в також для аналітичних досліджень у хімії та біології
№ 2 — для синтезу необхідна наявність специфічного вуглецевого субстрату, проте ЕПС є гетерополісахаридом	Продуцент — жовтоздобарелка бактерія роду <i>Pseudomonas</i>	—	—
№ 3 — гомополісахариди, які синтезуються на різних вуглецевих субстратах	Пулулан — <i>Aureobasidium pullulans</i>	Лінійний полімер D-глюкози, який складається з $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-малтопірозидів і певної кількості малтотетраозидних одиниць	У харчовій промисловості — виготовлення пивних для пакування харчових продуктів, для приготування низькокалорійних продуктів замість крохмалю
	Курдлан — <i>Alcaligenes faecalis</i> і <i>Agrobacterium radiobacter</i>	$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-глюкан, при нагріванні до 54 °C утворює гель, який, на відміну від агару, зберігає свою структуру в широкому діапазоні температур (від 18 до 60 °C)	У харчовій промисловості, а також для приготування мікробіологічних середовищ
	Склероглюкан — <i>Sclerotium rolfii</i> , <i>Sclerotium glucanum</i> , <i>Sclerotium</i> sp.	Нейтральний гомополісахарид, в якому залишки глюкопіранозиди з'єднані $\beta$ -(1,3)-з'єднаннями. До кожного третього залишку глюкози основного ланцюга в положенні C <sub>6</sub> приєднується ще один залишок глюкози	У нафтодобуванні для інтенсифікації нафтодобутку

Закінчення табл. 22.6

Група ЕПС	Назва ЕПС і продуцента	Характеристика ЕПС	Галузь використання
№ 4 — гетерополісахариди, які складаються із структур з повторюваними блоками	Ксантан — <i>Xanthomonas campestris</i>	Залишки D-глюкози, D-манози, D-глюкуронової кислоти у співвідношенні 2,6:2,0:4,0; 4,7 % O-ацетильних груп і близько 3 % піровиноградної кислоти	У нафтодобуванні, а також у виготовленні харчових продуктів
	Гелан — <i>Pseudomonas elodea</i>	Залишки глюкози, манози, глюкуронової кислоти і O-ацетильні групи	У харчовій промисловості і для приготування мікробіологічних середовищ
	Етаполан — <i>Acinetobacter</i> sp.	Залишки D-глюкози, D-манози, D-галактози, L-рамнози, D-глюкуронової і піровиноградної кислот (3,2:1:1:1) та жирні кислоти (C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> )	У нафтодобуванні, харчовій, хімічній промисловості як загущувальний, стабілізуючий, емульгуючий та суспензуючий агент
	Емульсан — <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	N- і O-ацильовані залишки D-галактозину, D-глюкози і глюкуронової кислоти. O-ацильна частина вміщує 5–19 % жирних кислот	У нафтової промисловості для підвищення нафтодобутку
№ 5 — гетерополісахариди, у складі яких немає повторюваних одиниць	Альгінат — <i>Pseudomonas aeruginosa</i> і <i>Azotobacter vinelandii</i>	Залишки D-манураної і L-гукуронової кислот, O-ацетильні групи	У харчовій промисловості як загущувальні закрислені альгінати

виробництво ферментів мікробного походження має тенденцію до зростання — в середньому 5–7 % на рік. У табл. 22.9 наведені дані про країни-виробники ферментних препаратів.

За даними 1996 р. щорічне виробництво амінокислот перевищило 700 000 т. Лідером у цій галузі є Японія, яка виробляє як індивідуальні амінокислоти, так і їх суміші на 1,8 млрд доларів (1998 р.).



Таблиця 22.7

Сурфактанти мікробного походження

Сурфактант	Продукент	Характеристика до-ПАР
<b>Низькомолекулярні</b>		
Рамноліпіди	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	ККМ ~ 10–30 мг/л
Трегалозоліпіди	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp.	ККМ = 2 мг/л
Софороліпіди	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Candida borgeiensis</i>	Гліколіпіди
Віскозин	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$\sigma$ = 27 мН/м, ліпопептид
Сурфактан	<i>Bacillus subtilis</i>	Ліпопептид, антибіотик
Грамцидин B	<i>Bacillus brevis</i>	ККМ = 25 мг/л, $\sigma$ = 27 мН/м, ліпопептид, антибіотик
Поліміксин	<i>Bacillus polymyxa</i>	Ліпопептид, антибіотик
Серваєтин	<i>Serratia marcescens</i>	—
Ліпопептид	<i>Bacillus licheniformis</i>	—
Коріноміколові кислоти	<i>Nocardia erythropolis</i>	—
Фосфоліпіди	<i>Acinetobacter</i> spp. <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	ККМ = 30 мг/л
<b>Високомолекулярні (емульгатори)</b>		
Емульсан RAG-1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1	Комплекс полісахариду та білка
Емульсан BD4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> BD413	Те саме
Алазан	<i>Acinetobacter radiobacillans</i> KAS3	—
Біодисперсан	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	—
Ліпосан	<i>Candida lipolytica</i>	Комплекс (83 % вуглеводів і 17 % білка)
Емульсан 378	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	—
Інсектицидний емульгатор	<i>Pseudomonas putida</i>	Ацетилований полісахарид
Термофільний емульгатор	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Протеїнополісахаридно-ліпідний комплекс
Ацетилгетерополісахарид	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	—
Харчовий емульгатор	<i>Candida utilis</i>	—
Сульфатований полісахарид	<i>Halomonas eurihalina</i>	—

Таблиця 22.8

Вітаміни та гібереліни мікробного походження

Вітаміни	Хімічна природа	Продукенти
<b>B<sub>12</sub></b> (ціанкобаламін)	$\alpha$ -(5,6-диметилбензи-мідзоль)-кобамідацид	<i>Propionibacterium shermanii</i> <i>Eubacterium limosum</i> ( <i>Butyrivibrio ritteri</i> ) <i>Nocardia rugosa</i> <i>Micromonospora purpurea</i> <i>Methanococcoides burtonii</i> <i>Clostridium thermoaceticum</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Bacillus circulans</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
<b>B<sub>6</sub></b> (рибофлавін)	7,8-диметил-10-(1'-D-рибітил)-ізоалоксазин	<i>Eremothecium ashbyi</i> <i>Ashbya gossypii</i> <i>Candida flaveri</i> <i>Mycocandida riboflavina</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Clostridium acetobutylicum</i>
Ергостерин (викладений продукт для одержання вітаміну D <sub>2</sub> )	Ергост-6,7,22-трикс-3 $\beta$ -ол	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> <i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida tropicalis</i>
$\beta$ -каротин (попередник вітаміну A)	Полієнові похідні	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Choanephora conjuncta</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
Гібереліни	Лігнени (тетранікфні карбонові кислоти)	<i>Gibberella fujikuri</i> <i>Fusarium moniliforme</i>

Таблиця 22.9

Виробництво ферментних препаратів промислового призначення (дані за 1994 р.)

Країна	Вироблено ферментних препаратів, т/рік	Питокий відсоток	Країна	Вироблено ферментних препаратів, т/рік	Питокий відсоток
Данія	28,00	47	Франція	1,59	3
Голландія	10,10	19	Швейцарія	1,06	2
США	6,86	12	Великобританія	1,06	2
Японія	4,24	8	Всі решта	1,00	1
Німеччина	3,18	6	Всього...	33,00	100

## 22.2. ПРЕПАРАТИ НА ОСНОВІ БІОМАСИ

### 22.2.1. Пробиотики

У наш час набули поширення поняття *пробиотики*, *пребіотики*, *пробиотичні продукти*, *еубіотики*.

Термін "пробиотики" в буквальному перекладі означає "для життя". Пробиотики (синонім поняття еубіотики) — це живі мікроорганізми, які у разі введення у корми тварин або до складу харчових продуктів людині позитивно діють на організм, оздоровлюючи мікрофлору кишечника. На відміну від пробиотиків, пребіотики — це речовини або дієтичні інгредієнти, які вибірково стимулюють ріст і біологічну активність мікроорганізмів у кишечнику, що в свою чергу позитивно впливає на склад мікробіоценозу.

Еубіотики поділяють на дві великі групи:

еубіотики на основі чистих культур мікроорганізмів — пробіотики, симбіотики (від слова "симбіоз") або мультибіотики (препарати, що складаються з 6–8 пробиотиків);

еубіотики змішаного складу (з додаванням амінокислот, мікроелементів, моно- та дисахаридів і т.ін.) — симбіотики з різними пребіотичними речовинами.

Більшість спеціалістів і дослідників до пробиотиків-еубіотиків відносять представників нормальної мікрофлори кишечника — біфідобактерії та лактобацили. Їх називають класичними пробіотиками.

Мікроорганізми, що використовуються як основа пробиотиків, повинні відповідати таким вимогам:

мають бути виділені з організму тих видів тварин і людини, для яких вони і будуть призначені;

повинні позитивно впливати на організм хазяїна, що має бути підтверджено лабораторними дослідженнями і клінічними спостереженнями;

за тривалого використання не повинні спричиняти побічних ефектів;

повинні мати високий колонізаційний потенціал, тобто зберігатися в травному тракті до досягнення максимальної позитивної дії (бути стійкими до низьких значень рН, жовчних кислот, антимікробних субстанцій, що продукуються ендогенною мікрофлорою; добре адгезуватися до епітелію відповідних слизових оболонок);

повинні мати стабільні клінічні й технологічні характеристики; повинні мати високу швидкість росту і розмноження в умовах, близьких до тих у кишковому тракті, у разі їхнього культивування *in vitro*.

Пробиотики для корекції мікрофлори організму людини. Більшість пробиотиків, які є в наш час на фармацевтичному ринку, використовуються для лікування та профілактики дисбактеріозів шлунково-кишкового тракту. Основні з них такі:

**біфідубактерин сухий** — містить ліофільно висушені живі клітини штамі *Bifidobacterium bifidum* № 1 і 791. В одній дозі препарату не менше  $10^8$  живих клітин. Випускається в таблетках, капсулах, пакетах, флаконах;

**біфідубактерин форте** — ліофільно висушені живі клітини біфідобактерій, іммобілізовані на сорбенті (активне вугілля). Водній дозі препарату не менше  $10^7$  клітин. Випускається в пакетах по 5 доз;

**біфілонг** — містить фізіологічні для дітей і дорослих види — *Bifidobacterium bifidum* і *Bifidobacterium longum*;

**біфікол сухий** — комплексний препарат, що складається з *Bifidobacterium bifidum* № 1 та *Escherichia coli* № M-17. Випускається у флаконах;

**лінекс** — багатокомпонентний пробіотик. Випускається в капсулах. Одна капсула (1 г) містить не менше  $1,2 \cdot 10^7$  живих ліофілізованих клітин *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis* var. *liferorum*, *Bifidobacterium bifidum* та *Enterococcus faecium*;

**лактобактерин сухий** — висушена мікробна біомаса живих лактобактерій *Lactobacillus fermenti* і *Lactobacillus plantarum*;

**колібактерин сухий** — містить ліофільно висушені живі клітини *Escherichia coli* № M-17. Випускається в випулах і таблетках;

**біоспорин** — складається з двох штамів споруутворювальних бактерій *Bacillus subtilis* № 3 і *Bacillus licheniformis* № 31, що мають вегетативну і спорову форми. З використанням рекомбінантного штаму *Bacillus subtilis* 2335/105 був створений пробіотик нового покоління — субалі, який характеризується високою антибактеріальною та антивірусною активністю. Пробиотики на основі бацил розроблені в Інституті мікробіології і вірусології НАН України.

Серед пробиотиків, що використовуються у ветеринарній практиці, слід відзначити ряд біопрепаратів на основі бактерій-симбіонтів шлунково-кишкового тракту, розроблених в Росії,

наприклад, лактовіт. Цей препарат містить молочнокислі бактерії та вітамін В<sub>12</sub>. В Інституті мікробіології і вірусології НАН України створено три пробіотичних препаратів на основі лактобактерій та ентерококів — бовілакт, лактосан, лактин-К, а також препарати на основі живих бактерій — бактерин SL та ендоспорія для сільськогосподарських тварин.

### 22.2.2. Добрива

Препарати бульбочкових бактерій: ризобін, ризоторфін (nitragin). Ризобін (сухий препарат) і ризоторфін (торфовий препарат) являють собою бактеріальні добрива, виготовлені на основі активних життєздатних бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* і використовуються для підвищення врожаю бобових культур: гороху, квасолі, сої, бобів, люцерни, люпину та ін. Ці препарати відомі також за назвою "нітрагін".

Препарати бульбочкових бактерій є ефективними тільки в активному стані. Для цього культура повинна бути забезпечена вологою, поживними речовинами, газообміном, рости при оптимальній температурі. Всі ці умови можуть бути легко виконані, якщо підібрати відповідний субстрат-носіє. Таким вимогам відповідає торф. Основним його недоліком є нестандартність, оскільки торф часто може містити токсичні речовини, які пригнічують ріст бульбочкових бактерій.

У колишньому СРСР торфовий препарат бульбочкових бактерій був уперше виготовлений у 30-х роках ХХ ст., проте його промислове виробництво було налагоджено значно пізніше. Технологія виробництва торфового препарату за назвою "ризоторфін" була розроблена у ВДІ сільськогосподарської мікробіології ВАСГНІЛ.

Найпоширенішим способом використання ризоторфіну є передпосівна обробка насіння бобових рослин. Для цього насіння зволожують 2,0–2,5 % води, додавають ризоторфін і перемішують у машинах для протравлювання насіння. Витрати ризоторфіну становлять 200 г на гектарну норму будь-якого насіння бобових. Обробку проводять у день посіву. Урожайність підвищується на 1–10 ц з одного гектара.

Для одержання ризобіну культуральну рідину після вирощування ризобій піддають сепарації, в результаті одержують

біомасу у вигляді пасту з вологістю 70–80 %. Пасту змішують із захисним середовищем (вміщує мелюся та тістечовину у співвідношенні 20:1) і висушують у вакуум-сушильних шафах при 30–35 °С і за надлишкового тиску 10–13 кПа.

Препарати вільно існуючих азотфіксаторів (азотобактерин). Азотобактерин — бактеріальне добриво, виготовлене на основі культури вільно існуючого ґрунтового азотфіксатора *Azotobacter chroococcum*. Випускають азотобактерин сухий і торфовий (ґрунтовий).

Фосфобактерин. Це бактеріальне добриво, яке містить спори *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Бактерії здатні перетворювати складні фосфорорганічні сполуки (нуклеїнові кислоти, нуклеопротейди та ін.) та важкорозчинні мінеральні фосфати (пірофосфати, поліфосфати) в доступну для рослин форму. Крім того, бактерії синтезують біологічно активні речовини (зокрема вітаміни), які стимулюють ріст рослин. Фосфобактерин не є замінником фосфорних добрив і не діє без них. Це препарат зі стимулювальним ефектом.

### 22.2.3. Білкові продукти

За даними відділення харчових продуктів і сільського господарства Організації Об'єднаних Націй (1996 р.) дефіцит харчового білка в світі становить приблизно 10 млн т на рік, а загальний дефіцит інших харчових компонентів перевищує 80 млн т. Загальнови́знано, що для поповнення дефіциту білка перспективними є технології мікробного синтезу. Слід зазначити, що в США та інших країнах дозволено використовувати як харчові добавки 10 різних дріжджових біомас.

Пекарські дріжджі та одержання біомаси. Основна мета виробництва пекарських дріжджів — одержання дріжджів, які з високою швидкістю виробляють у тісті вуглекислий газ. Але цей процес можна розглядати і як особливий процес накопичення біомаси. Оскільки пекарські дріжджі додають до борошна в концентрації 1 %, то вони є важливим джерелом мікробної біомаси у харчуванні людини. У Західній Європі кожна людина споживає з їжею близько 2 г дріжджового білка на тиждень. Незважаючи на те що дріжджам не властивий ніякий токсичний ефект, вони все ж містять відносно велику кількість нуклеїнових кислот. Високий вміст нуклеїнових кислот може спри-

чинити підвищення рівня сечової кислоти в організмі людини, що призводить до подагри.

**Біомаса спіруліни.** Останнім часом особливу увагу приділяють новим нетрадиційним джерелам біологічно активних речовин, які використовуються як харчова добавка. Особливе місце серед продуцентів таких речовин посідають мікроводорості і в першу чергу *Spirulina platensis*, яка належить до ціанобактерій. Крім комплексу цінних біологічно активних сполук, спіруліна здатна синтезувати йодовмісні сполуки гормональної природи — тироксин і трийодтиронін, які швидко та ефективно засвоюються організмом людини. Тому спіруліна може бути використана як додаткове джерело легкозасвоюваного йоду.

**Білково-вітамінні концентрати.** При вирощуванні тварин і птиці нестача білка призводить до перевитрат кормів, погіршення здоров'я тварин. Головною характеристикою біологічної (харчової) цінності білка є збалансованість його за амінокислотним складом. Всесвітня організація охорони здоров'я у 1966 р. рекомендувала взяти за еталон амінокислотний склад білків курячих яєць або жіночого молока. Харчова цінність багатьох білків тваринного походження наближається до еталона, а рослинних — значно нижча. Білки зернових характеризуються низьким вмістом лізину. У білках різних штамів дріжджів вміст лізину становить від 3 до 10 %. Добавка в раціон тварин (додатково до зернових) кормових дріжджів компенсує неповноцінність білка зернових і наближує його до еталонного. Крім того, дріжджова біомаса характеризується високим вмістом вітамінів (особливо групи В). Біомаса кормових дріжджів (наприклад, *Candida utilis*), яка використовується в сільському господарстві, називається БВК (білково-вітамінні концентрати).

Виробництво кормових дріжджів було налагоджено у світі після першої світової війни. У 30-х роках ХХ ст. як субстрати для вирощування дріжджів почали використовувати гідролізати відходів сільського господарства та деревообробної промисловості. У 60-ті роки "популярними" субстратами стали вуглеводні (парафіни нафти, дизельне паливо), трохи пізніше — спирт (етанол, метанол). У колишньому СРСР було налагоджено виробництво едріну — дріжджі на основі етанолу (Благовещенськ, Башкирія), папріну — дріжджі на парафінах (Кременчук, Полтавська обл., Новополісць, Вілорусь) та ін.

## 22.3. ОДЕРЖАННЯ ЕНЕРГІЇ (БІОГАЗ)

Біогаз — це метан, який утворюється в результаті життєдіяльності метаногенних бактерій. Біогаз містить 50–85 % метану та 15–50 %  $\text{CO}_2$ . Технологія його одержання має два етапи: дозрівання метанового біоценозу та ферментація. Впровадження першого етапу розвиваються бактерії, які беруть участь в анаеробному розкладанні вихідних органічних речовин і продуктів їх розкладу. В результаті діяльності цих мікроорганізмів створюються оптимальні умови для активного біосинтезу метану.

Зброджування рідких органічних речовин відбувається в строго анаеробних умовах при температурі 30–40 °С (мезофільний процес) або при 52–60 °С (термофільний процес) у реакторах — метантенках. Метантенки першого покоління — це реактори, в яких усі процеси проходять в одній місткості без розділення на стадії та фази, бактеріальні клітини у міру накопичення виділяються разом із збродженою масою. Циклічність процесу становить, як правило, 5–14 дбб.

Метантенки другого покоління — реактори, в яких бактерії перебувають в іммобілізованому стані. Це дає змогу підвищити ефективність процесу метаноутворення.

Останнім часом у практику впроваджуються технології, в яких процес утворення метану поділений на дві стадії — кислотну та метанову. Двофазний процес здійснюється в двох реакторах з'єднаних послідовно. У першому реакторі проходить фаза зброджування і утворення кислот, рН такої "бражки" не повинно бути вищим як 6,5. Така бражка подається у другий реактор, де утворюється метан. На практиці для підвищення виходу метану процес бродіння у першому реакторі здійснюють при температурі 35–37 °С, а в другому — при 55 °С. За нормальних умов ферментації з кожної тонни збродженого органічного субстрату утворюється до 300–600 м<sup>3</sup> метану. Процент розкладання органічних речовин до метану, як правило, становить 30–60 %.

Метаногенез — процес ендотермічний, він потребує постійного підігріву для підтримання оптимальної температури. Як правило, метантенки і сировина підігріваються за рахунок спалювання утворюваного біогазу. У середньому на це витрачається від 15 до 50 % біогазу.

Шлам, що утворюється у процесі одержання біогазу (рідкий чи твердий, залежно від використання рідкого чи твердого субстрату і відповідно від реалізації рідинно- чи твердодфазного

пропесу) є чудовим органіо-мінеральним добривом. Він може також використовуватись для одержання практично важливих біологічно активних сполук.

За даними 1990 р. в Європі кількість великих (1000 м<sup>3</sup> і більше) біогазових установок становила понад 500 одиниць, у США їх кількість була у два рази вищою. У деяких країнах Азії (Китай, Індія, Непал та ін.) із-за дефіциту електроенергії біогаз одержують досить простим способом: викопують яму, в якій в анаеробних умовах переробляють біомасу, а виділений газ накопичують у примітивних установках малого об'єму або одразу ж використовують. Про ефективність виробництва біогазу таким способом свідчать те, що в Китаї кількість подібних установок перевищує 50 млн, а в Індії досягає декількох мільярдів. Виробництво біогазу та біодобрив у невеликих масштабах є особливо доцільним для фермерських господарств, у високогірних районах, селах і місцях, віддалених від "великої цивілізації".

## 22.4. БІОГЕОТЕХНОЛОГІЯ МЕТАЛІВ

Біогеотехнологія металів — це наука про вилучення металів із руд, концентратів, гірських порід і розчинів під дією мікроорганізмів або їх метаболітів за нормального тиску і при температурі від 5 до 80–90 °С. Одним із складових біогеотехнології металів є **бактеріальне вищолування металів**. Його основою є процес окиснення сульфідних мінералів і переведення металів з нерозчинного стану в розчинний. У цьому процесі беруть участь бактерії, які окиснюють сірку та її сполуки і залізо. У переробі марганцевих та алюмосилікатних матеріалів беруть участь нітрифікуючі бактерії. Всі ці бактерії належать до фізіологічної групи мікроорганізмів, яку називають "аеробними хемолітотрофами".

Другою складовою біогеотехнології металів є біосорбція їх із розчинів. У цьому процесі беруть участь денітрифікуючі та сульфатовідновлювальні бактерії, які об'єднуються у фізіологічну групу мікроорганізмів, здатних до анаеробного дихання (використання нітрату та сульфату як термінальних акцепторів в анаеробному дихальному ланцюгу).

Слід зазначити, що до біосорбції металів із розчинів здатні також інші бактерії, гриби та дріжджі; вкмуляція металів від-

бувається як біомасою мікроорганізмів, так і їх позаклітинними метаболітами (білки, полісахариди та ін.).

## 22.5. ТРАНСФОРМАЦІЯ РЕЧОВИНИ МІКРООРГАНІЗМАМИ

Класифікація мікробіологічних трансформацій і деякі приклади таких процесів наведено у параграфі 12.6 "Неповні окиснення". Розглянемо детальніше використання мікроорганізмів для синтезу стероїдів, вуглеводів і гетероциклічних сполук.

### 22.5.1. Мікробіологічні трансформації стероїдів

У 1948 р. вперше введено гідроксильну групу в молекулу стероїда мікробіологічним шляхом. Але тільки після одержання 11α-гідроксипрогестерону з прогестерону у процесі ферментації останнього з культурою *Rhizopus nigricans* мікробіологічні трансформації стероїдів привернули до себе велику увагу. Така трансформація продемонструвала переваги мікробіологічних методів над хімічними: введення кисневої функції в певне положення молекули стероїда (C-11) хімічним синтезом потребувало численних хімічних операцій, що досить ускладнювало завдання, у разі ж використання мікроорганізмів воно було замінено однією-двома стадією. Відкриття у ці ж роки терапевтичної цінності кортизону разом з успіхами мікробіологічного процесу гідрокслювання зацікавило мікробіологів, хіміків і лікарів. Впровадження мікробіологічного синтезу в процеси одержання стероїдних гормональних препаратів у фармацевтичній промисловості дало можливість відразу значно здешевити виробництво цінних препаратів.

Деякі мікробіологічні трансформації стероїдів, які мають промислове значення, наведені у табл. 22.10.

Методи проведення процесів мікробіологічних трансформацій стеринів. Незважаючи на різноманітність біотрансформацій стероїдів, методи проведення мікробіологічних реакцій досить прості. У пошукових роботах (у лабораторіях) обмежуються проведенням реакцій в колбах на качалках, при цьому у колбу вносять 100–200 мг стероїда. Для трансформації 1–2 г стероїдів використовують ферментатори.

Таблиця 22.10

Мікробіологічні трансформації стероїдів, які мають промислове значення

Реакція	Субстрат	Продукт	Мікроорганізм-трансформатор
11 $\alpha$ -Гідроксилювання	Прогестерон	11 $\alpha$ -Гідрокси-прогестерон	<i>Rhizopus nigricans</i>
11 $\beta$ -Гідроксилювання	Речовина S	Гідрокортизон	<i>Curvularia lunata</i>
16 $\alpha$ -Гідроксилювання	Вк-Фторкортизол	Вк-Фтор-16 $\alpha$ -гідроксикортизол	<i>Streptomyces roseochromogenus</i>
1,2-Дегідратування	Гідрокортизон	Преднізолон	<i>Arthro bacter simplex</i>
Розщеплення бокового ланцюга	$\beta$ -Ситостерин	Андростадіондін і (або) відростендін	<i>Mycobacterium spp.</i>

Розчинність стерина у воді дуже низька. Тому стерини в концентрації приблизно 1 г/л вносять у ферментатор розчиненнями у малотоксичних розчинниках (віцетон, спирт, диметилформамід), які змішуються з водою. У більш високих концентраціях (вище 1 г/л) стерини вносять у середовище у вигляді пудри. Другий спосіб введення стеринів у середовище полягає в тому, що стерин, наприклад,  $\beta$ -ситостерин, розчиняють у суміші гептан/етиленхлорид, додають під час перемішування воду і відганяють розчинник нагріванням суміші до 95 °C. За такого методу концентрація ситостерину у водній суспензії може досягати 140 г/л.

Після завершення трансформації культуральні рідини, звільнені від біомаси, екстрагуються органічними розчинниками, які не змішуються з водою, але в яких розчиняються відповідні стероїди (етилацетат, метиленхлорид, хлороформ). Екстракт відділяють від водної фази, очищують (забавлені домішки відділяють обробкою активним вугіллям, після чого вугілля відфільтровують); далі його концентрують у вакуумі, осад стероїду перекристалізують з відповідного розчинника.

**Шляхи інтенсифікації мікробіологічних трансформацій.** Одним із шляхів інтенсифікації процесів трансформації є попередня індукція культурно-трансформатора відповідним субстратом чи його аналогом. Найперспективнішим є використання **імобілізованих живих клітин мікроорганізмів**. Переваги використання імобілізованих клітин очевидні: відсутність витрат на виділення та очищення ферментів, більш висока активність і стабільність

у порівнянні з імобілізованими ферментами і вільними клітинами, зниження витрат на виділення та очищення продуктів реакції, можливість автоматизації. Методи імобілізації клітин-трансформаторів такі: адсорбція, ковалентне та поперечне зв'язування, включення в різні полімери, мікрокапсулювання. Стероїди були першими субстратами, які вдалося трансформувати за допомогою імобілізованих клітин. Такими процесами були: 1,2-дегідратування, 1,2-відновлення, 20-відновлення (*Arthro bacter globiforme*), стереоспецифічне 17 $\beta$ -відновлення (*Saccharomycetes cerevisiae*), 20 $\alpha$ - і 20 $\beta$ -відновлення (*Bacillus megaterium*).

## 22.5.2. Мікробіологічні трансформації вуглеводів

Перетворення вуглеводів, які здійснюються мікроорганізмами, можна поділити на кілька основних типів: **окиснювальні трансформації** (окиснення поліолів, одержання альдонових кислот), **відновлення, ізомеризації**.

Окиснення поліолів уперше описано в класичних роботах Т. Бертрама (1896 р.): так було проведено окиснення маніту до фруктози і сорбіту до сорбози за допомогою бактерій *Acetobacter aceti* і *Acetobacter xylinum*. Пізніше були виявлені культури, які здійснюють цей процес інтенсивніше (*Acetobacter suboxydans*).

Перетворення гліцерину на діоксинацетон. Діоксинацетон є цінною органічною сполукою, яка використовується у медицині, парфумерії, фармацевтичній промисловостях. Його одержують із гліцерину методом мікробіологічного окиснення за допомогою клітин *Acetobacter suboxydans*. Для одержання цього продукту розроблено метод багаторазового використання імобілізованих клітин, які не розмножуються. Середовище містить гліцерин, монокалійфосфат, 10 % дріжджової води, дріжджовий автолізат, кукурудзяний екстракт і CaCO<sub>3</sub> для нейтралізації. Температура — 28 °C, тривалість процесу — 36 год. Головною умовою є високий вміст кисню в середовищі.

Встановлена також здатність імобілізованих клітин *Gluco bacter oxydans* окиснювати гліцерин до діоксинацетону.

**Окиснення D-сорбіту до L-сорбози.** Окиснення сорбіту до сорбози є ключовою стадією синтезу L-аскорбінової кислоти. Для цього перетворення використовується глибинне культивування



*Acetobacter suboxydans*. Інокулянт вирощується на середовищі, що містить сорбіт, глюкозу, дріжджовий екстракт і  $\text{CaCO}_3$ . У 15–20 % розчин сорбіту, які містять штам-трансформатор і необхідні для його росту вітаміни, пропускають повітря через розподільну систему. Через добу при температурі 30 °C одержують сорбозу з виходом 93 %.

Культуральна рідина, яка містить сорбозу, знебарвлюється активним вугіллям, фільтрується, фільтрат концентрується у вакуумі до сиропоподібної маси, що кристалізується при 15 °C. Кристали відділяють центрифугуванням, промивають льодяною водою і сушать.

Відновлення ксилози до ксиліту. Ксиліт використовується у харчовій промисловості як замінник цукру (у діабетичних продуктах). Для перетворення ксилози на ксиліт використовують дріжджі *Candida utilis*. Одержання ксиліту може здійснюватися двома способами: 1) дріжджі вирощують на мінеральному середовищі, що містить ксилозу як джерело вуглецю та енергії; в процесі росту ксилоза відновлюється до ксиліту, який накопичується в культуральній рідині; 2) ксилозу відновлюють відмиті клітини дріжджів, попередньо вирощені на середовищі з ксилозою і інкубовані у фосфатному буфері (рН 7,0). Максимальний вихід ксиліту становить 60 %.

### 22.5.3. Мікробіологічні трансформації гетероциклічних сполук

Біохімічна активність мікроорганізмів використовується також для перетворення деяких гетероциклічних сполук.

**Трансформація похідних індолу.** Серед індолічних сполук особливий інтерес становлять продукти метаболізму триптофану: триптамін, серотонін, їх заміщені аналоги, триптофол та індоліл-3-оцтова кислота. Ці сполуки відіграють важливу роль у процесах обміну речовин та інтенсивно досліджуються з біохімічної та медичної точок зору.

Мікробіологічні трансформації похідних індолу представлені в основному гідроксилуванням. Так, основним продуктом окиснення індоліл-3-оцтової кислоти грибами *Claviceps purpurea* є 5-оксидіндоліл-3-оцтова кислота. Аналогічну реакцію може здійснювати *Aspergillus niger* і *Aspergillus awamori*.

**Трансформація похідних піридину.** Нікотинову кислоту та її амід (вітамін РР), як правило, одержують хімічним синтезом, проте уже розроблено шляхи мікробних трансформацій відповідних субстратів:

3-Метилпіридин → Нікотинова кислота  
(*Arthrobacter aureus* 11, *Nocardia corallina* 77A);

3-Піридилкарбінол → Нікотинова кислота  
(*Mycobacterium bovis*);

Нікотинамід → Нікотинова кислота  
(*Flavobacterium peregrinum*).

### Контрольні запитання до розділу 22

1. Які завдання стоять перед біотехнологічною галуззю?
2. Які шляхи використання мікроорганізмів у біотехнології Ви знаєте?
3. Як класифікуються антибіотики за механізмом біологічної дії, і які мікроорганізми їх синтезують?
4. Які ферменти одержують мікробним синтезом?
5. Дайте характеристику основних промислових мікробних полісахаридів.
6. Які поверхнево-активні речовини синтезуються мікроорганізмами? Як біо-ПАР поділяються за хімічною природою?
7. Які вітаміни одержують мікробним синтезом?
8. Охарактеризуйте препарати на основі біомаси мікроорганізмів.
9. Які пробіотики використовуються для корекції мікрофлори організму людини?
10. Які добрива одержують за допомогою мікроорганізмів?
11. Біомаса яких мікроорганізмів використовується як харчова добавка і чому?
12. Чим зумовлена необхідність виробництва кормових білково-вітамінних концентратів? Які мікроорганізми і субстрати для цього використовуються?
13. Що таке біогас і яка роль мікроорганізмів у його одержанні? Охарактеризуйте ці мікроорганізми.
14. Які мікроорганізми і для здійснення яких процесів використовуються у біогеотехнології металів?
15. Як здійснюються мікробіологічні трансформації стероїдів?
16. Які трансформації вуглеводів і гетероциклічних сполук можна здійснити за допомогою мікроорганізмів?

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асонов Н.Р. Микробиология. — М.: Колос, Колос-Пресс, 2002. — 352 с.
2. Безбородов А.М. Биохимические основы микробиологического синтеза. — М.: Лег. и пищ. пром-сть, 1984. — 394 с.
3. Берри Д. Биология дрожжей. — М.: Мир, 1985. — 96 с.
4. Билай В.И. Основы общей микологии. — К.: Вища шк., 1988. — 392 с.
5. Биология метанообразующих и метакисляющих бактерий / Ю.Р. Малашенко, Ю. Хайер, У. Бергер и др. — К.: Наук. думка, 1993. — 256 с.
6. Богданов А.А., Медников Б.М. Власть над геном. — М.: Просвещение, 1989. — 206 с.
7. Готтшальк Г. Метаболизм бактерий. — М.: Мир, 1982. — 310 с.
8. Гринберг Т.А., Пирог Т.П., Малашенко Ю.Р., Пинчук Г.Э. Микробный синтез акциполизосахаридов на  $C_1-C_2$ -соединениях. — К.: Наук. думка, 1992. — 212 с.
9. Грозов Б.В., Павленко Г.В. Экология бактерий. — Л.: Изд-во Ленингр. гос. ун-та, 1989. — 248 с.
10. Дмитриева В.А., Дмитриев В.В. Русско-английский словарь терминов по микробиологии. — М.: Наука, 1991. — 248 с.
11. Дьяков Ю.Т. Введение в альгологию и микологию. — М.: Изд-во Моск. гос. ун-та, 2000. — 192 с.
12. Елисеев С.А., Кучер Р.В. Поверхностно-активные вещества и биотехнология. — К.: Наук. думка, 1991. — 116 с.
13. Заварзин Г.А., Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. — М.: Кн. дом "Университет", 2001. — 256 с.
14. Ивановский Р.Н. Биознергетика и транспорт субстратов у бактерий. — М.: МАКСПресс, 2001. — 46 с.
15. Каратыгин И.В. Проблемы макросистематики грибов // Микология и фитопатология. — 1999. — Т. 33. — Вып. 3. — С. 150-165.
16. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. — К.: Наук. думка, 1991. — 326 с.
17. Кеситадзе Г.И., Безбородов А.Н. Введение в биотехнологию. — М.: Наука, 2002. — 284 с.
18. Красильников А.П., Романовская Т.Р. Микробиологический словарь-справочник. — Минск: Асар, 1999. — 400 с.
19. Малашенко Ю.Р., Соколов И.Г., Романовская В.А. Микробный метаболизм неростовых субстратов. — К.: Наук. думка, 1987. — 192 с.
20. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов / В.А. Быков, И.А. Крылов, М.Н. Манаков и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 144 с.
21. Общая микробиология / Под ред. А.Е. Вершигоры. — К.: Вища шк., 1988. — 343 с.
22. Определитель бактерий Берги. — 9-е изд. / Пер. под ред. Г.А. Заварзина. — М.: Мир, 1997. — Т. 1, 2. — 800 с.
23. Павлович С.А. Основы вирусологии. — Минск: Вышш. шк., 2001. — 192 с.
24. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий. — К.: Наук. думка, 1992. — 204 с.
25. Промышленная микробиология и успехи генетической инженерии / Пер. под ред. Г.К. Скрыбина. — М.: Мир, 1984. — 172 с.
26. Промышленная микробиология / Под ред. Н.С. Егорова. — М.: Высш. шк., 1989. — 688 с.
27. Рик Э., Стернберг М. От клеток к атомам: Иллюстративное введение в молекулярную биологию. — М.: Мир, 1988. — 144 с.
28. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.Р. Систематика метилотрофных бактерий. — К.: Наук. думка, 1991. — 212 с.
29. Романовская В.А., Ромитко П.В., Шилин С.О., Малашенко Ю.Р. Актуальные проблемы филогенетической классификации бактерий // Микробиол. журн. — 2003. — Т. 65. — № 5. — С. 46-65.
30. Смирнов В.В., Коваленко Н.К., Подгорский В.С., Сорокулова И.Б. Пробиотики на основе живых культур микроорганизмов // Микробиол. журн. — 2002. — Т. 64. — № 4. — С. 62-80.
31. Шендеров Б.А. Пробиотики и функциональное питание. — М.: Грант, 2001. — 287 с.
32. Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1987. — 586 с.

33. Kurtzman C.P., Fell J.W. The Yeasts: a taxonomic study. — 4<sup>th</sup> ed. — Amsterdam etc.: Elsevier, 1998. — 1056 p.

34. Kurtzman C.P. Systematics and Taxonomy of Yeasts. In: Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts / Ed. E.J.F. Schmidt. — Contrib. Microbiol. Basel. Karger. — 2000. — Vol. 5. — P. 1–14.

35. Rosenberg E., Ron E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 1999. — 52. — P. 154–162.

36. The Prokaryotes. An evolving electronic resource for the microbiological community / Eds.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. — 3<sup>rd</sup> ed. — Online version. Springer Link, 1999.

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	3
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ .....	6
1. СТАНОВЛЕННЯ ТА РОЗВИТОК МІКРОБІОЛОГІЇ .....	7
1.1. Морфологічний період розвитку мікробіології .....	7
1.2. Еколого-фізіологічний період розвитку мікробіології. Відкриття Луї Пастера .....	8
1.3. Відкриття Роберта Коха. Розробка методів досліджень .....	11
1.4. Внесок у розвиток мікробіології вітчизняних учених .....	12
1.5. Розвиток мікробіології у XX ст. .....	14
Контрольні запитання до розділу 1 .....	15
2. ПОЛОЖЕННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ У ПРИРОДІ .....	16
2.1. Класифікація живих організмів .....	16
2.2. Прокаріоти та еукаріоти .....	18
2.3. Загальні властивості мікроорганізмів .....	19
Контрольні запитання до розділу 2 .....	21
3. МОРФОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ .....	22
3.1. Бактерії .....	22
3.2. Мікроскопічні міцеліальні гриби .....	26
3.3. Дріжджі .....	30
Контрольні запитання до розділу 3 .....	32
4. ХІМІЧНИЙ СКЛАД БАКТЕРІАЛЬНОЇ КЛІТИНИ .....	33
4.1. Клітинна вода .....	33
4.2. Елементарний склад клітини .....	34
4.3. Органічні сполуки .....	34
4.4. Фізико-хімічні властивості бактеріальної клітини .....	41
Контрольні запитання до розділу 4 .....	43
5. БУДОВА МІКРОБНОЇ КЛІТИНИ .....	44
5.1. Клітинні стінки мікроорганізмів .....	44
5.1.1. Поверхневі структури клітинної стінки бактерій .....	44
5.1.2. Будова і хімічний склад клітинних стінок прокаріот .....	48
5.1.3. Клітинні стінки еукаріот .....	56
5.2. Мембрани мікробних клітин .....	57
5.2.1. Цитоплазматична мембрана .....	57

5.2.2. Мембранні утворення у прокариот .....	62
5.2.3. Мембрани еукариот .....	64
5.3. Внутрішньоклітинні структури .....	66
5.4. Ендоспори та інші форми спокою у бактерій .....	71
5.4.1. Характеристика спорутовувальних бактерій .....	72
5.4.2. Спорувтворення (споруляція) .....	74
5.4.3. Інші форми спокою (цисти, екзоспори, мікроспори) ..	77
5.5. Відмінності прокариот та еукариот .....	79
Контрольні запитання до розділу 5 .....	83
6. РІСТ МІКРООРГАНІЗМІВ .....	86
6.1. Дія на мікроорганізми зовнішніх факторів .....	85
6.1.1. Фізичні фактори .....	85
6.1.2. Хімічні фактори .....	92
6.1.3. Методи стерилізації .....	96
6.2. Адаптивні реакції мікроорганізмів на стресові дії .....	99
6.2.1. Зміни в ліпідному складі мембран .....	101
6.2.2. Утворення протекторних сполук .....	102
6.2.3. Антирадикальний захист .....	107
6.2.4. Роль міжклітинних хімічних комунікацій в адаптації мікроорганізмів до стресу .....	108
6.2.5. Регуляторні системи відповіді на стресові дії .....	109
6.3. Живлення мікроорганізмів .....	112
6.3.1. Головні та мінерні біоселементи .....	112
6.3.2. Два основні механізми синтезу АТФ .....	114
6.3.3. Типи живлення (трофії) .....	115
6.3.4. Рости та нерости субстрати .....	117
6.3.5. Трансформація мікроорганізмами суміші ростових і неростових субстратів .....	117
6.3.6. Потреби мікроорганізмів у факторах росту .....	118
6.3.7. Типи поживних середовищ для вирощування мікроорганізмів .....	119
6.3.8. Ефективні методи культивування (накопичувальні та чисті культури) .....	121
6.4. Фізіологія росту .....	122
6.4.1. Визначення поняття "ріст" .....	122
6.4.2. Розмноження бактерій .....	123
6.4.3. Ріст бактерій у бактеріальній популяції .....	124
6.4.4. Експоненціальний ріст .....	126
6.4.5. Ріст бактерій у періодичній культурі .....	129
6.4.6. Параметри кривої росту .....	132
6.4.7. Ріст у безперервній культурі .....	134
6.4.8. Синхронні культури .....	136

Контрольні запитання до розділу 6 .....	136
7. СИСТЕМАТИКА ПРОКАРИОТ .....	138
7.1. Підходи (принципи) класифікації бактерій .....	138
7.2. Термінологія, що використовується в систематиці .....	140
7.3. Концепція явища в бактеріології .....	144
7.4. Історичні аспекти систематики бактерій .....	147
7.5. Характеристика таксонів за дев'ятьма виданням Керівництва Бергі з систематики бактерій .....	148
7.5.1. Відділ Gracilicutes .....	149
7.5.2. Відділ Firmicutes .....	161
7.5.3. Відділ Tenericutes .....	168
7.5.4. Відділ Mendocinutes .....	170
7.6. Сучасні напрями в систематиці бактерій .....	175
7.6.1. Фенотипова систематика .....	175
7.6.2. Геносистематика бактерій .....	176
7.6.3. Філогенетична класифікація .....	179
Контрольні запитання до розділу 7 .....	186
8. ГРИБИ .....	187
8.1. Загальна характеристика грибів .....	187
8.2. Розвиток мікології, положення грибів серед живих організмів .....	187
8.3. Будова грибів .....	189
8.4. Розмноження грибів .....	193
8.5. Систематика грибів .....	196
8.6. Проблеми сучасної систематики грибів .....	197
8.7. Біологічно активні речовини грибів .....	200
8.7.1. Ферменти .....	201
8.7.2. Антибіотики .....	204
8.7.3. Екзополісахариди .....	205
8.7.4. Токсини грибів .....	206
8.7.5. Стимулятори росту рослин і вітамінів .....	207
8.7.6. Органічні кислоти .....	208
8.8. Вплив зовнішніх факторів на ріст і фізіологічну активність грибів .....	209
8.9. Поширення грибів і характеристика екологічних груп .....	211
Контрольні запитання до розділу 8 .....	220
9. ДРІЖДЖІ .....	222
9.1. Основні етапи дослідження дріжджів .....	222
9.2. Будова дріжджової клітини .....	223
9.3. Хімічний склад дріжджів .....	226
9.4. Розмноження дріжджів .....	226
9.4.1. Взаємне розмноження .....	226

9.4.2. Статеве розмноження дріжджів .....	230
9.5. Таксономія та систематика дріжджів .....	231
9.6. Практичне використання дріжджів .....	233
Дріжджі <i>Saccharomyces</i> у промисловості .....	234
Контрольні запитання до розділу 9 .....	237
10. ВІРУСИ: ПОШИРЕННЯ ТА СТРУКТУРА .....	238
10.1. Загальна характеристика .....	238
10.2. Вудові віруси .....	240
10.3. Віруси бактерій (бактеріофаги) .....	244
10.3.1. Розмноження вірусного фага: літичний цикл .....	245
10.3.2. Розвиток помірних фагів: лізогенія .....	247
10.4. Роль вірусів і плазмід у утворенні пухлин (онкогенезу) .....	249
10.5. Класифікація вірусів .....	251
Контрольні запитання до розділу 10 .....	253
11. ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ОБМІНУ РЕЧОВИН І ПЕРЕТВОРЕННЯ ЕНЕРГІЇ У МІКРООРГАНІЗМІВ .....	254
11.1. Конструктивний метаболізм .....	254
11.2. Енергетичний метаболізм .....	255
11.3. Принцип "біохімічної єдності" .....	258
11.4. Роль ферментів у метаболізмі. Ферменти мікроорганізмів .....	259
11.5. Шляхи катаболізму глюкози та інших вуглеводів .....	261
11.5.1. Фруктозо-1,6-дифосфатний шлях (гліколіз) .....	262
11.5.2. Шлях Еммера—Дудорова .....	263
11.5.3. Розщеплення глюкози через глюкозат .....	265
11.5.4. Пентозофосфатний цикл .....	266
11.5.5. Поняття "ключові ферменти" .....	267
11.5.6. Катаболізм вуглеводів, відомих від глюкози .....	268
11.5.7. Окиснення пірватату .....	269
11.5.8. Цикл трикарбонових кислот .....	270
11.5.9. Анаеробні реакції у процесі вирощування мікроорганізмів на вуглеводах .....	271
11.6. Дихальний ланцюг і фосфорильовання (синтез АТФ) при перенесенні електронів .....	272
11.6.1. Компоненти дихального ланцюга .....	273
11.6.2. Окисно-відновний потенціал .....	275
11.6.3. Розміщення та функції окисно-відновних систем у дихальному ланцюгу .....	277
11.6.4. Коефіцієнт Р/О та енергетичний баланс .....	279
11.6.5. Механізм синтезу АТФ при перенесенні електронів .....	280
11.6.6. Зворотне перенесення електронів за рахунок енергії АТФ .....	282
11.6.7. Токсична дія молекулярного кисню на аеробні	

та анаеробні мікроорганізми .....	282
11.6.8. Електро-транспортні процеси у анаеробних бактеріях .....	283
11.6.9. Інгібітори дихального ланцюга .....	284
11.7. Механізми поглинання субстратів .....	284
11.7.1. Пасивна дифузія .....	285
11.7.2. Полегшена дифузія .....	285
11.7.3. Активний транспорт .....	285
11.7.4. Перенесення (транслокація) груп .....	288
11.7.5. Транспорт заліза .....	288
Контрольні запитання до розділу 11 .....	289
12. МЕТАБОЛІЧНА АКТИВНІСТЬ АЕРОБНИХ ГЕТЕРОТРОФІВ .....	290
12.1. Метаболізм $C_2$ -сполук .....	290
12.1.1. Етапол та ацетат як субстрати .....	290
12.1.2. Гліоксилат і оксалат як субстрати. Гліперативний шлях .....	293
12.2. Ріст на відновлених $C_1$ -сполуках (метан, метанол) .....	295
12.2.1. Енергетичний метаболізм метанотрофів .....	295
12.2.2. Конструктивний метаболізм .....	296
12.2.3. Факультативні метилотрофи .....	299
12.3. Катаболізм вищих $n$ -алканів і жирних кислот .....	299
12.4. Катаболізм білків та амінокислот .....	300
12.5. Катаболізм ароматичних сполук .....	302
12.6. Неповні окиснення .....	304
12.6.1. Утворення оцтової кислоти та оцтовокислі бактерії .....	308
12.6.2. Утворення кислот грибами .....	309
12.6.3. Утворення амінокислот бактеріями .....	310
12.6.4. Трансформація речовин мікроорганізмами .....	312
12.6.5. Утворення вторинних метаболітів .....	313
12.6.5.1. Синтез антибіотиків .....	313
12.6.5.2. Мікотоксини .....	315
12.6.5.3. Мікробні екзополісахариди .....	315
12.6.5.4. Лектини мікробного походження .....	318
12.6.5.5. Поверхнево-активні речовини мікробного походження .....	320
Контрольні запитання до розділу 12 .....	321
13. БІОСИНТЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ У МІКРООРГАНІЗМІВ .....	323
13.1. Потреби в АТФ для утворення бактеріальних клітин з глюкози .....	323
13.2. Біосинтез амінокислот .....	324
13.3. Біосинтез нуклеотидів .....	327

13.4. Біосинтез жирних кислот .....	329
13.5. Утворення вуглеводів — компонентів клітинної стінки .....	330
Контрольні запитання до розділу 13 .....	332
<b>14. ТИПИ БРОДІННЯ .....</b>	<b>333</b>
14.1. Загальна характеристика процесу бродиння .....	333
14.1.1. Регенерація АТФ у процесі бродиння .....	334
14.1.2. Роль процесів бродиння у біоцисі природи .....	336
14.2. Спиртове бродиння .....	337
14.2.1. Утворення етанолу дріжджами .....	337
14.2.2. Утворення етанолу бактеріями .....	339
14.3. Молочнокисле бродиння і родина <i>Lactobacillaceae</i> .....	339
14.3.1. Характеристика молочнокислих бактерій .....	339
14.3.2. Гомоферментація молочнокисле бродиння .....	341
14.3.3. Гетероферментація молочнокисле бродиння .....	341
14.3.4. Використання молочнокислих бактерій .....	342
14.4. Пропіоновокисле бродиння та родина <i>Enterobacteriaceae</i> .....	343
14.4.1. Характеристика пропіоновокислих бактерій .....	343
14.4.2. Утворення пропіонової кислоти .....	344
14.5. Мурашинокисле бродиння та родина <i>Enterobacteriaceae</i> .....	345
14.5.1. Характеристика ентеробактерій .....	345
14.5.2. Продукти бродиння та метаболічні шляхи .....	346
14.6. Маслянокисле та шкетоно-бутилове бродиння, Клостридії .....	348
14.6.1. Характеристика бактерій роду <i>Clostridium</i> .....	348
14.6.2. Зброджування глюкози клостридіями .....	346
14.6.3. Зброджування клостридіями субстратів, відмінних від глюкози .....	350
14.6.4. Клостридії — збудники захворювань .....	351
14.7. Гомоацетатне бродиння, $\text{CO}_2$ як акцептор водню .....	362
14.8. Зброджування та незброджування природні сполуки .....	352
Контрольні запитання до розділу 14 .....	354
<b>15. ПЕРЕНОСИМІСТЬ ЕЛЕКТРОНІВ В АНАЕРОБНИХ УМОВАХ (АНАЕРОБНЕ ДИХАННЯ) .....</b>	<b>355</b>
15.1. Денітрифікація та відновлення нітрату .....	355
15.2. Утворення сірководню у процесі відновлення сульфату .....	357
15.3. Утворення метану у процесі відновлення карбонату .....	360
15.4. Утворення ацетату у процесі відновлення карбонату .....	362
15.5. Утворення сукциніату у процесі відновлення фумарату .....	362
15.6. Відновлення $\text{Ions Fe (III)}$ до $\text{Fe (II)}$ .....	363
Контрольні запитання до розділу 15 .....	364
<b>16. ВИКОРИСТАННЯ НЕОРГАНІЧНИХ ДОНОРІВ ВОДНІКА: АЕРОБНІ ХЕМОЛІТОТРОФНІ БАКТЕРІЇ .....</b>	<b>365</b>
16.1. Окиснення аміаку та нітриту (нітрифікація) .....	366

16.2. Окиснення відновлення сполук сірня .....	367
16.3. Окиснення двоцінного заліза .....	369
16.4. Окиснення молекулярного водню .....	370
16.5. Фіксація $\text{CO}_2$ .....	372
Контрольні запитання до розділу 16 .....	373
<b>17. ФІКСАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТУ .....</b>	<b>374</b>
17.1. Фіксація азоту симбіотичними (бульбочковими) бактеріями .....	374
17.2. Фіксація азоту вільно існуючими бактеріями .....	376
17.3. Біохімія азотфіксації .....	377
Контрольні запитання до розділу 17 .....	377
<b>18. ФОТОТРОФНІ БАКТЕРІЇ ТА ФОТОСИНТЕЗ .....</b>	<b>378</b>
18.1. Характеристика пурпурових і зелених бактерій .....	378
18.2. Ціанобактерії .....	382
18.3. Процеси фотосинтезу .....	383
18.3.1. Окиснений фотосинтез .....	383
18.3.2. Аноксигенний фотосинтез .....	386
18.4. Використання світлової енергії галобактеріями .....	388
Контрольні запитання до розділу 18 .....	389
<b>19. ГЕНЕТИКА БАКТЕРІЙ: ПОСТІЙНІСТЬ, ЗМІНА ТА ПЕРЕДАВАННЯ ОЗНАК .....</b>	<b>390</b>
19.1. Синтез білка та генетичний код .....	390
19.1.1. Визначення поняття "ген" .....	390
19.1.2. Реплікація ДНК .....	391
19.1.3. Транскрипція ДНК .....	392
19.1.4. Генетичний код .....	392
19.1.5. Трансляція мРНК: синтез білка .....	393
19.2. Мутації та їх виникнення .....	397
19.2.1. Спонтанні мутації .....	397
19.2.2. Індуковані мутації .....	398
19.2.3. Відбір мутантів .....	400
19.3. Передавання ознак і генетична рекомбінація .....	400
19.3.1. Механізми генетичної рекомбінації .....	401
19.3.2. Кон'югація .....	402
19.3.3. Трансдукція .....	404
19.3.4. Трансформація .....	405
19.3.5. Рестрикція та модифікація .....	406
19.3.6. Палазмиди .....	408
19.3.7. Загальні принципи клоонування генів (конструювання гібридних молекул ДНК <i>in vitro</i> ) .....	410
19.3.8. Злиття протопластів .....	411

Контрольні запитання до розділу 19 .....	411
20. РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЗМУ .....	413
20.1. Регуляція синтезу ферментів .....	413
20.1.1. Індукція синтезу ферментів .....	413
20.1.2. Репресія синтезу ферментів .....	415
20.2. Регуляція активності ферментів .....	416
20.3. Механізми синтезу ферментів (індукції та репресії) .....	417
20.3.1. Індукція лактозного оперону .....	417
20.3.2. Репресія триптофанового оперону кінцевим продуктом .....	420
20.4. Механізми регуляції активності ферментів .....	421
20.4.1. Аlostерична регуляція .....	421
20.4.2. Ковалентна модифікація ферментів .....	423
Контрольні запитання до розділу 20 .....	424
21. МІКРООРГАНІЗМИ І НАВКОЛИШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ .....	425
21.1. Участь мікроорганізмів у кругообігу речовин у природі ..	425
21.2. Екологія мікроорганізмів (основні поняття) .....	428
21.3. Типи взаємовідносин між організмами в природі .....	429
21.3.1. Симбіотичні взаємовідносини .....	429
21.3.2. Антагоністичні взаємовідносини .....	431
21.4. Еволюція мікроорганізмів .....	432
Контрольні запитання до розділу 21 .....	434
22. МІКРООРГАНІЗМИ ЯК ОБ'ЄКТИ БІОТЕХНОЛОГІЇ .....	436
22.1. Біосинтез практично важливих метаболітів .....	440
22.2. Препарати на основі біомаси .....	448
22.2.1. Пробиотики .....	448
22.2.2. Добрива .....	450
22.2.3. Білкові продукти .....	451
22.3. Одержання енергії (біогаз) .....	453
22.4. Біогеотехнологія металів .....	454
22.5. Трансформація речовин мікроорганізмами .....	455
22.5.1. Мікробіологічні трансформації стероїдів .....	455
22.5.2. Мікробіологічні трансформації вуглеводів .....	457
22.5.3. Мікробіологічні трансформації гетероциклічних сполук .....	458
Контрольні запитання до розділу 22 .....	459
ЛІТЕРАТУРА .....	460

Навчальне видання

Пирог Тетяна Павлівна

Загальна мікробіологія



Редактор Т.П. Хоменко  
Комп'ютерна верстка А.І. Бойко

Підп. до друку 16.07.04р. Обл.-вид. арк. 26,12. Наклад 1500 пр.  
Вид. № 151/03. Зам. № 4-292.

РВЦ НУХТ, 01033 Київ-38, вул. Володимирська, 68  
[www.book.nuft.edu.ua](http://www.book.nuft.edu.ua)

Свідчення про расстрацію серія ДК № 1786 від 18.03.04 р.

Віддруковано у друкарні концерну "ВД "Ін Юре"  
Україна, 04107, м. Київ, вул. Багговутівська, 17-21