Володимир Іваниця

МІКРОБІОЛОГІЯ

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

В. О. Іваниця

МІКРОБІОЛОГІЯ

ПІДРУЧНИК

ОДЕСА
ОНУ
2025

УДК 579(075.8)
І-193

Автор:

В. О. Іваниця, доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України.

Рецензенти:

М. Я. Співак, доктор біологічних наук, професор, академік НАН України, Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України;

А. І. Вінніков, доктор біологічних наук, професор, Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара;

Л. В. Капрельянц, доктор технічних наук, професор, Одеський національний технологічний університет.

Рекомендовано до видання вченою радою ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 7 від 25 лютого 2025 року.

Іваниця В. О.

І-193 Мікробіологія [Електронний ресурс] : підручник / В. О. Іваниця. – Електронні текстові дані (1 файл : 34,6 МБ). – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2025. – 532 с.

ISBN 978-966-186-343-8

Викладено основні питання положення мікроорганізмів у системі живої природи, біологічної різноманітності та систематики прокаріотичних і еукаріотичних мікроорганізмів, їхню будову, закономірності росту та культивування, різноманітність енергетичних та конструктивних процесів, шляхи метаболізму та механізми їхнього регулювання, механізми горизонтального перенесення генетичної інформації, фенотипової та генотипової мінливості, еволюції мікроорганізмів. Значну увагу приділено екології та біогеохімічній діяльності мікроорганізмів, взаємовідносинам між ними та макроорганізмами, шляхам практичного їх застосування, мікробіому людини та патогенним мікроорганізмам.

Для студентів спеціальностей Біологія та біохімія, Біотехнології та біоінженерія, Середня освіта (Біологія та здоров'я людини) закладів вищої освіти та може бути корисним для аспірантів, науковців та практичних мікробіологів.

УДК 579(075.8)

ISBN 978-966-186-343-8

© Іваниця В. О., 2025

© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2025

ПЕРЕДМОВА

Мікроорганізми всюдисущі, та хоч вони невеликі за розмірами, але діяльність їх має величезний вплив на всі процеси на нашій планеті. Вони є основою усіх екосистем і біосфери в цілому, в процесі еволюції сформували зовнішній вигляд і хімічний склад нашої планети. Мікроорганізми слугують своєрідною «імунною» системою природи від антропогенного забруднення та невичерпним джерелом генів для біотехнології. Мікроорганізми, наші постійні супутники.

Коли ви дізнаєтесь про них більше, зрозумієте, що наше життя та діяльність повністю знаходяться під впливом мікроорганізмів. Дійсно, сотні трильйонів бактерій працюють у нашому тілі саме зараз, перетравлюючи спожиту їжу, синтезують вітаміни, важливі для нашого здоров'я. Загальний набір мікробних клітин у тілі людини та на ньому містить тисячі видів, кожен з яких найкраще розвивається в певній частині тіла. Наш мікробіом є абсолютно необхідним для нашого здоров'я та благополуччя, але ми тільки починаємо це розуміти. У подальших розділах вам розкриється захоплююча наука мікробіологія, ви побачите, що ще багато чого потрібно дізнатися про життя мікробного світу.

Мікробіологія – значною мірою прикладна наука, оскільки мікроорганізми, з одного боку, є негативними чинниками захворювань людини, тварин і рослин, біологічних пошкоджень різних матеріалів і конструкцій, а з іншого боку, вони є основою та забезпечують функціонування екосистеми, в якій ми живемо, об'єктами, що використовуються в біотехнології для виробництва різноманітних практично корисних продуктів.

Курс Мікробіологія цікавий тим, що в ньому студент може знайти за своїм інтересом практично всі традиційні розділи біології: систематику, біологічну різноманітність, цитологію, біохімію, фізіологію, молекулярну біологію, генетику, екологію, об'єктами яких є мікроорганізми. Наведена актуальна інформація в розділах підручника заснована на аналізі результатів сучасних досліджень, отриманих з використанням методів молекулярної біології, біохімії та генетики.

Ця книга призначена для студентів рівня бакалавра, які навчаються в університеті. Маю надію, що вона буде корисною для студентів, які в майбутньому планують займатися проблемами біологічної різноманітності, екології, охорони та оздоровлення навколишнього середовища, біохімії, молекулярної біології, біотехнології, біомедицини та сільського господарства.

Автор намагався зробити підручник таким, що може задовольнити всі потенційні аудиторії та надати сучасні загальні відомості про багатогранний світ мікроорганізмів у найбільш стислій формі, яка дозволяє швидше і краще зрозуміти суть понять і процесів, що розглядаються.

Підручник базується на головних концептуальних поняттях біології: еволюція; будова та функції; шляхи і перетворення енергії та речовини; потік, обмін та зберігання інформації; мікробні системи та вплив мікроорганізмів, над якими повинен працювати студент, щоб мати фундаментальне розуміння біології в цілому та бути науково обізнаним.

Загальні концепції сучасної мікробіології включають фундаментальні ключові твердження, а саме:

– Усі клітини, органели та основні метаболічні шляхи еволюціонували з ранніх прокаріотичних клітин. Мутації та горизонтальне перенесення генів з часом сформували величезну різноманітність мікроорганізмів. Традиційне визначення виду не завжди можна застосувати до мікроорганізмів через нестатеве розмноження та часте горизонтальне перенесення генів. Еволюційна спорідненість організмів найкраще визначається порівнянням нуклеотидних послідовностей та побудовою філогенетичного дерева.

– Клітини еукаріотичних мікроорганізмів на відміну від прокаріотичних містять спеціалізовані мембранні структури. Бактерії та археї мають спеціалізовані утворення, які часто надають їм унікальні можливості. Мікроорганізми мають унікальні клітинні структури і процеси, які можуть бути мішенями для антибіотиків, імунної системи та фагової інфекції.

– Бактерії та археї використовують різні типи метаболізму, їх комбінації та демонструють велику і часто унікальну метаболічну різноманітність, наприклад, фіксацію азоту, виробництво метану, аноксигенний фотосинтез. Основні енергетичні процеси клітини протікають в мембранах і пов’язані з транспортом електронів, викачуванням з клітини протонів та формуванням трансмембранного градієнту протонів або натрію у деяких бактерій. Законсервована енергія різниці потенціалу протонів на мембрані трансформується АТФ-синтетазою в енергію АТФ.

– Виживання та ріст в певному середовищі будь-якого мікроорганізму залежить від його метаболічних характеристик. Ріст мікроорганізмів можна контролювати фізичними, хімічними, механічними чи біологічними засобами.

– Хоча центральна догма є універсальною для всіх клітин, процеси реплікації, транскрипції та трансляції відрізняються у бактерій, архей та еукаріотів. Механізми регуляції експресії генів та механізми зміни активності ферментів забезпечують адаптацію мікроорганізмів до змін умов середовища. Клітинними геномами можна управляти, щоб змінити функцію клітин.

– Мікроорганізми всюдисущі та забезпечують функціонування різноманітних та динамічних екосистем і біосфери в цілому (біогеохімічні цикли). Більшість їх у природі живуть у спільнотах біоплівок. Мікроорганізми взаємодіють з їх середовищем, біологічними (людина, тварини,

рослини, інші мікроорганізми) та небіологічними об’єктами у корисний, нейтральний або шкідливий спосіб та змінюють один одного.

– Мікроорганізми є основними моделями, які дають нам фундаментальні знання про життєві процеси та об’єктами, що використовуються в біотехнології для виробництва різноманітних практично корисних для людини продуктів. Оскільки існуюче різноманіття мікробного життя в основному невідоме, його потенційні переваги ще чекають на подальше вивчення.

Сподіваюсь, що ця книга наблизить читача до таємниць життя невидимих істот, буде корисною студентам, які ще тільки обирають свій шлях у науці та житті, а отримані знання про мікроорганізми, що знаходяться в нас і оточують нас, будуть у нагоді також кожному у повсякденному житті.

Це перше видання підручника, тому в ньому можуть мати місце недоліки, які автор намагатиметься виправити у наступному виданні, та буде вдячний за надіслані зауваження та побажання для його покращення. Особливо важливо отримати коментарі від студентів та викладачів.

РОЗДІЛ 1
МІКРОБІОЛОГІЯ ЯК НАУКА

1.1. Світ мікроорганізмів

Мікробіологія – це наука, яка вивчає мікроорганізми, хто вони, які вони, як облаштовані, що споживають, як функціонують і що вони роблять. Визначення терміну **мікроорганізми** просте та зрозуміле – це одноклітинні організми, які мають мікроскопічні розміри. Отже мікробіологи вивчають одноклітинні організми, які є занадто малими, щоб бути добре поміченими неозброєним оком, при цьому роздільна здатність ока людини становить приблизно 0,1 мм. Однак діапазон їх розмірів досить широкий і складає близько 0,001–1,0 мм. Деякі мікроорганізми є достатньо великими, щоб бачити їх, не використовуючи мікроскоп.

Під наведене визначення попадають усі мікроскопічні організми, які мають клітинну будову, тобто бактерії, археї, гриби, мікроскопічні водорості та найпростіші. За своїми розмірами віруси також можна віднести до мікроорганізмів, однак треба враховувати, що вони не мають клітинної будови і власного метаболізму.

З використанням молекулярно-біологічних методів, біоінформатичного аналізу та відповідних комп'ютерних програм побудовано філогенетичне дерево, в якому всі представники живого світу розділені на три великі групи – домени (надцарства): *Bacteria, Archaea* та *Eukarya*. Домени *Bacteria* та *Archaea* містять лише прокаріотичні мікроорганізми, а домен *Eukarya* поєднує як одноклітинні мікроорганізми (гриби, мікроскопічні водорості та найпростіші), так і всі багатоклітинні (рослини та тварини) організми. Мікроорганізми складають переважну більшість таксономічної різноманітності існуючих на нашій планеті відомих організмів. В той же час вважається, що мікробіологам вдається культивувати лише близько одного відсотка від усього мікробіому прокаріотичних мікроорганізмів.

Так історично склалося, що основними об'єктами мікробіології є бактерії, археї та гриби, хоча дослідження окремих представників кожної з цих груп – спеціалізована область. В той же час мікроскопічні водорості є переважно об'єктами досліджень ботаніки, гриби – мікології, найпростіші – зоології, а віруси – вірусології.

Основна відмінність еукаріот від прокаріот полягає в поділі їх клітин ендомембранами на комірки, названі компартментами, що мають спеціалізовані функції і називаються органелами. Завдяки своїм малим розмірам прокаріотичні мікроорганізми мають більш високі значення співвідношення поверхні до об'єму, що забезпечує їм набагато вищу метаболічну активність, ніж у більших за розмірами еукаріотичних багатоклітинних організмів.

З іншого боку, прокаріоти мають у своєму арсеналі всі відомі в природі типи метаболізму, які поділяються в першу чергу за джерелами та способами отримання енергії, джерелами електронів та вуглецю. До того ж

багато мікроорганізмів є міксотрофами, що, завдяки складним механізмам регуляції метаболізму, здатні перемикатися з одного способу живлення та отримання енергії на інший (з фототрофного на хемотрофний, з літотрофного на органотрофний, з автотрофного на гетеротрофний, з дихання на бродіння), що, як правило, не притаманно тваринам і рослинам. Це дає їм можливість швидко адаптуватися до змін навколишнього середовища, використовуючи потенціал наявного набору генів, та займати екологічні ніші з критичними умовами для інших живих організмів.

Особливістю мікроорганізмів є наявність механізмів горизонтального переносу генетичної інформації (кон'югація, трансдукція, трансформація та мобільні генетичні елементи) між віддаленими представниками з різних таксономічних груп, що значно прискорює темпи еволюції та дає їм можливість формувати набори генів, необхідні для існування в умовах зміни навколишнього середовища. Цей процес зокрема забезпечує бактеріям швидке переміщення генів резистентності до антибіотиків та поширення їх у популяції.

Більшість аспектів мікробіології стосується вивчення активності або молекулярних властивостей не окремих клітин, а мікробних спільнот. Мікроорганізми, як правило, в природі живуть у складних мікробних спільнотах, так званих біоплівках, а їх діяльність регулюється взаємодією одного з одним, з середовищем та іншими організмами. Біоплівка захищає клітини та збільшує їх резистентність до антибіотиків і полегшує комунікацію між ними через біохімічні сигнали.

Мікроорганізми кишіли в морях та на суші за мільярди років до появи рослин і тварин, а їх різноманітність вражає. Мікроорганізми першими з'явилися на Землі біля 4,0 мільярдів років тому і в процесі еволюції завдяки своїй активній біогеохімічній діяльності визначили подальший розвиток життя на нашій планеті. Мікробне життя і Земля розвивалися разом, і дії мікроорганізмів призвели до змін фізичних та геохімічних властивостей планети. Існує цілком обґрунтована теорія панспермії – поширення зародків життя в космосі, якими, ймовірно, є мікроорганізми, що дало обґрунтування для пошуку їх на інших космічних об'єктах, у першу чергу на Марсі.

Завдяки своєму різноманітному та пластичному метаболізму мікроби займають усі мислимі й не мислимі екологічні ніші, використовуючи величезний діапазон своїх ресурсів. Вони можуть існувати у багатьох місцях, в яких не можуть розвиватися інші живі організми – при температурі до 130 °С, повній відсутності кисню, насиченому розчині NaCl, край кислому і лужному середовищі та ін.

Мікроорганізми, як темна матерія та темна енергія у Всесвіті, всюдисущі в біосфері Землі та, не зважаючи на мікроскопічні розміри, проводять колосальну роботу глобального масштабу як у синтезі органічної речови-

ни, так і в мінералізації відмерлого біологічного матеріалу. Метаболічні процеси, що вони виконують, забезпечують підтримку та існування всіх інших форм життя.

Ці невидимі організми становлять, в цілому, більше половини біомаси на Землі, а їх діяльність необхідна для підтримки життя. Сам кисень, яким ми дихаємо, є результатом діяльності мікроорганізмів. Без них були б неможливими глобальні цикли азоту, сірки, вуглецю та існування рослин і тварин. Рослини і тварини занурені у світ мікробів, їх еволюція та виживання значно залежать від діяльності мікроорганізмів, мікробного симбіозу та патогенів.

Незважаючи на перевагу мікроорганізмів і важливість їх діяльності в природі, вони невидимі в щоденному людському досвіді. Більшість людей знає про мікроорганізми переважно через здатність частини з них викликати захворювання людини, тварин та рослин, в той час як переважна більшість інших складають корисну мікробіоту, яка навпаки виконує захисну функцію.

Мікроорганізми вплетені також у життя людини, починаючи від інфекційних захворювань і закінчуючи їжею, яку ми їмо, водою, яку ми п'ємо, родючістю ґрунтів, нашим здоров'ям і навіть пальним, яке ми використовуємо.

Мікробіологи досягли значних успіхів у вивченні функціонування мікроорганізмів і застосування цих знань значно покращило здоров'я та добробут людини. Дані Національного центру статистики охорони здоров'я США і Центру контролю та профілактики захворювань (рис. 1.1) показують, яких успіхів досягли мікробіологи та медицина в боротьбі з хворобами мікробної природи за останні 120 років на прикладі США. На початку XX ст. причиною смертей більше половини всіх померлих людей були бактеріальні та вірусні збудники, тоді як сьогодні вони спричиняють менше 5% усіх смертей.

Однак, патогенні мікроорганізми та інфекційні захворювання все ще залишаються основною загрозою для людства, і боротьба з цими шкідливими організмами залишається головною у фокусі мікробіології.

Мікробіологія сприяла прогресу в медицині завдяки вакцинації та антибіотикотерапії, досягненням в техніці очищення питної води та стічних вод, безпеці харчових продуктів, наприклад, пастеризації та кращого розуміння того, як мікроорганізми передаються до людини.

В дійсності більшість мікроорганізмів не шкідливі і в багатьох випадках навіть важливі для здоров'я і добробуту людини та функціонування біосфери нашої планети. Мікробіом товстої кишки людини містить близько 10^{11} клітин різноманітних видів мікроорганізмів на грам вмісту, які допомагають у перетравленні складних вуглеводів і синтезують вітаміни та інші поживні речовини, необхідні для організму.

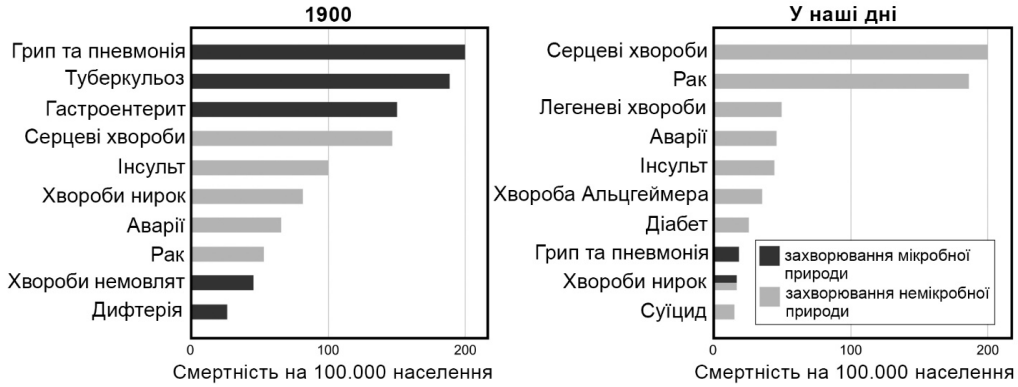


Рис. 1.1. Рівень смертності та основні причини смерті в Сполучених штатах: 1900 і 2016 роки. Дані Національного центру статистики охорони здоров'я США та Центру контролю та профілактики захворювань

Мікробіологія досягла значного прогресу в розумінні важливої ролі, яку відіграють мікроорганізми у виробництві сільськогосподарської продукції, продуктів харчування, цінних для людини продуктів, генерації енергії і оздоровленні довкілля.

Практичне використання мікроорганізмів як продуцентів практично цінних продуктів, призвело до виникнення біотехнології. Методами генетичної інженерії створюються продуценти з новими корисними властивостями.

Мікроорганізми завдяки своїй біохімічній активності використовуються для створення фармацевтичних препаратів, ферментів, вітамінів, для захисту та стимулювання росту рослин, отримання відновлювальних джерел енергії, вилуговування металів, видобутку корисних копалин, оздоровлення довкілля.

Мікроорганізми завдяки простоті роботи з ними, високій швидкості росту та економічності є вигідними об'єктами дослідження біохіміків, генетиків, молекулярних біологів, біофізиків та ін.

Світ мікроорганізмів у всій його різноманітності ще далеко не пізнаний. Вважається, що мікробіологам поки відомо менше 1% всіх мікроорганізмів, що живуть на Землі. У зв'язку з цим перед мікробіологами стоїть завдання прискорити виявлення нових, ще не відкритих мікроорганізмів, для подальшого пізнання їхньої біологічної різноманітності на нашій планеті та пошуку мікробного життя на інших планетах Сонячної системи.

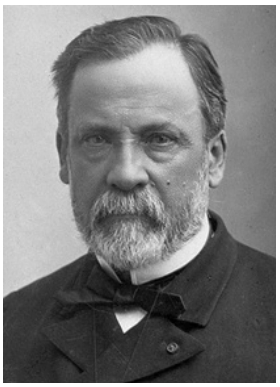
1.2. Історія становлення та розвитку мікробіології

Історія розвитку мікробіології починається з 1676 року, коли Антоні ван Левенгук (1632–1723) вперше побачив мікробів, описав їх основні морфологічні групи, а описи своїх спостережень з ретельними зарисовками, посилав до Англійського Королівського товариства, де їх було опубліковано. Це був початок описового періоду історії мікробіології.

Антоні Ван Левенгук (1631–1723)

З середини XIX ст. розпочався фізіологічний період розвитку мікробіології, пов'язаний з іменами французького мікробіолога Луї Пастера та німецького мікробіолога Роберта Коха, які започаткували експериментальну мікробіологію та суттєво збагатили методичний арсенал цієї науки.

Л. Пастер (1822–1995) заклав основи вивчення метаболізму мікроорганізмів, довів, що бродіння викликають мікроорганізми та спростував теорію самозародження. Дослідження процесів бродіння призвели до відкриття невідомого раніше способу життя без кисню. Дослідження збудників «хвороб» пива та вина дозволили Л. Пастеру запропонувати спосіб теплової обробки продуктів (пастеризацію), який попереджає їх псування, та навели вченого на думку про те, що мікроорганізми, можливо, є збудниками інфекційних хвороб людини.



Луї Пастер (1822–1895)

Роберт Кох (1843–1910) доказав бактеріальну етіологію сибірки, виділив збудників деяких хвороб в чистій культурі (серед них *Mycobacterium tuberculosis*), остаточно сформулював тріаду Коха для доказу мікробної етіології захворювання: 1) мікроорганізм повинен бути присутнім у матеріалі хворого; 2) виділений у чистій культурі, він повинен викликати ту ж хворобу; 3) збудник при експериментально викликаному повторному захворюванні має знову бути виділений у чисту культуру, і дві ці чисті культури повинні бути ідентичними. У лабораторії Р. Коха введено в практику методи отримання чистих культур, використання в мікробіологічних дослідженнях твердих середовищ на основі агару та мікробіологічний посуд, зокрема чашку Петрі.

Роберт Кох (1843–1910)

Сергію Виноградському (1856–1953) та Мартіну Бейєрінку (1851–1953) належить визнання головної ролі мікроорганізмів у важливих біогеохімічних колообігах елементів у природі. Наш земляк С. Виноградський відкрив унікальний хемолітотрофний спосіб генерації енергії за рахунок окиснення мікроорганізмами відновлених неорганічних сполук азоту, сірки, заліза та відкрив представників цієї групи – сірчаних та нітрифікуючих бактерій. С. Виноградський і М. Беєрінк незалежно один від одного виявили мікроорганізми, здатні фіксувати молекулярний азот. М. Беєрінк виділив та відкрив здатність *Azotobacter chroococcum* і бульбочкових бактерій до азотфіксації. С. Виноградський виділив анаеробного азотфіксатора *Clostridium pasterianum* та розробив метод накопичувальної культури.

Сергій Виноградський
(1856–1953)

Мартін Беєрінк
(1851–1931)

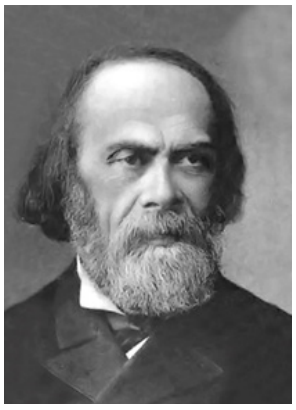
Дмитро Івановський (1856–1953) у 1892 році розпочав дослідження, що призвели до відкриття вірусу тютюнової мозаїки, а згодом Мартін Беєрінк (1898 р.) повторив дослідження Д. Івановського й зробив висновок, що інфекційний матеріал, який пройшов крізь фільтр, є новою формою інфекційних агентів та ввів у вжиток слово «вірус». Ці дослідження започаткували науку вірусологію.

Голандські вчені Альберт Клюйвер (1888–1956) і Корнеліс ван Ніль (1897–1985) провели фундаментальний порівняльний біохімічний аналіз організмів різних таксономічних груп і з'ясували, що різноманітність типів їх життєдіяльності поєднується з одноманітністю біохімічних процесів, інакше кажучи, з біохімічною єдністю живого, що проявляється в єдності енергетичних і конструктивних процесів у мікроорганізмів, рослин і тварин, єдності конструктивних молекул, енергетичних та конструктивних процесів, механізмів запису та передачі інформації.

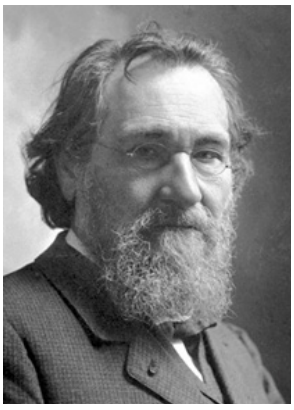
Альберт Клюйвер
(1888–1956)

Корнеліс ван Ніль
(1898–1985)

Перші роботи в галузі мікробіології та розвиток мікробіології в Україні пов'язані з іменами видатних вчених природничників кінця XIX – початку XX століття, які працювали в Одеському національному (тоді Імператорському Новоросійському) університеті – Лева Ценковського та Іллі Мечникова.



Лев Ценковський
(1822–1887)



Ілля Мечников
(1845–1916)

Лев Ценковський (1822–1887) – ботанік, протистолог і бактеріолог був першим завідувачем кафедри ботаніки в Новоросійському університеті. Він був першим професором ботаніки, котрий викладав з мікроскопом в руках. За відгуками сучасників Л. Ценковський "поступово піднімав перед очима науки пелену чудового світу мікроорганізмів". Він розробив основи морфології мікроорганізмів і велику увагу приділяв вивченню нижчих рослинних (водорості) і тваринних (інфузорії, радіолярії) організмів, грибів і бактерій.

Ілля Мечников (1845–1916) – один із засновників мікробіології та імунології, працював в Новоросійському університеті з 1867 по 1882 рр. Розвиваючи вчення про фагоцитоз, він заклав основи імунології. В Одесі І. Мечников вивчав грибкові і бактеріальні хвороби комах і не тільки обґрунтував можливість біологічного методу боротьби з комахами, але намагався також запровадити його на практиці. У 1886 р. в Одесі була створена друга в світі після Паризької бактеріологічна станція, яку очолив І. Мечников, а поруч з ним працювали М. Гамалія та Я. Бардах. Станція відіграла важливу роль у застосуванні пастерівських вакцин проти сказу та в боротьбі з інфекційними хворобами. З 1887 року І. Мечников працював в інституті Пастера в Парижі, де розробив вакцину проти холери, запропонував вакцину проти черевного тифу, одним із перших звернув увагу на мікробіоту кишківника, її вплив на здоров'я людини, досліджував питання механізму старіння та тривалості життя людини. У 1908 році за дослідження в галузі імунології І. Мечникову (спільно з П. Ерліхом) була присуджена Нобелівська премія з фізіології та медицини.

Микола Гамалія (1859–1949) – видатний вчений мікробіолог та епідеміолог, який закінчив Новоросійський університет. Він керував протиепідемічними заходами в час епідемії чуми в Одесі, створив протихолерну та противіспяну вакцини, розробив низку санітарно-профілактичних заходів боротьби з чумою, холерою, грипом, висипним та поворотним тифами.

Яків Бардах (1857–1929), випускник і професор Новоросійського університету, вів дослідження в галузі загальної та медичної мікробіології, імунології, епідеміології, а також з вивчення мікроорганізмів Одеських лиманів, полів зрошення, солоних водойм. Його ім'я тісно пов'язано з Одеським (Новоросійським) університетом. Я. Бардах один з перших запровадив з 1895 року викладання самостійного курсу бактеріології для студентів, що вивчали ботаніку, зоологію, агрономію та фізіологію. В основу курсу

Микола Гамалія
(1859–1949)

Яків Бардах
(1857–1929)

Я. Бардах поклав екологію мікроорганізмів, їх участь у колообігу речовин у природі, значення в практичній діяльності людини. У 1922 р. Я. Бардах очолив створений мікробіологічний сектор кафедри біології.

Данило Заболотний (1866–1929) – мікробіолог, основоположник епідеміології, випускник Новоросійського університету, директор заснованого з його ініціативи Інституту мікробіології та епідеміології АН УРСР (тепер Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України), створив учення про природний осередок чуми та визначив роль диких гризунів як природний резервуар збудника чуми, вивчав холерного вібріона та шляхи поширення його з осередків інфекції.

Данило Заболотний (1866–1929)

Тут названо лише кілька великих імен, проте необхідно пам'ятати, що їхні відкриття були підготовлені роботами багатьох інших відомих та рядових мікробіологів.

1.3. Основні галузі мікробіології

Сучасна мікробіологія така ж різноманітна як і організми, які вона вивчає. Мікробіологія має як фундаментальні, так і прикладні напрямки дослідження. Фундаментальні аспекти стосуються біології самих мікроорганізмів, а прикладні – їх дії та таких практичних проблем як захворювання, очищення води та стічних вод, виробництво і псування харчових продуктів, а також їх промислове використання. Фундаментальні дослідження часто проводяться в прикладних галузях, і застосування мікроорганізмів переважно виникає в результаті фундаментальних досліджень.

Важливою подією в мікробіології є все більш широке використання молекулярно-біологічних і геномних методів для вивчення мікроорганізмів та їх взаємодії з іншими організмами. Ці методи призвели до швидкого прогресу, який визнають другим «золотим віком» мікробіології.

Мікробіологію прийнято поділяти на субдисципліни за досліджуваними мікроорганізмами. Так, основними об'єктами бактеріології є бактерії та археї, мікології – гриби, протистології – найпростіші та мікроскопічні водорості, вірусології – віруси. Дослідження окремих представників кожної з цих груп – спеціалізована сфера.

Мікробіологія також ділиться на субдисципліни на основі діяльності мікроорганізмів, наприклад, медична мікробіологія, ветеринарна мікробіологія, харчова мікробіологія, морська мікробіологія, ґрунтова мікробіологія, сільськогосподарська мікробіологія. Мікробіологи можуть також вивчати лише один аспект біології мікроорганізмів, що призводить до таких

субдисциплін, як молекулярна мікробіологія, генетика мікроорганізмів, біохімія мікроорганізмів, екологія мікроорганізмів.

Однією з найбільш активних і важливих галузей мікробіології є **медична мікробіологія**, яка вивчає інфекційні захворювання людини. Медичні мікробіологи досліджують збудників інфекційних захворювань і розробляють заходи щодо боротьби з ними, відстежують нові, неідентифіковані патогени, вивчають, як мікроорганізми викликають захворювання. У клінічній лабораторії мікробіологи, використовуючи культуральні та молекулярно-біологічні методи, отримують інформацію, яка необхідна лікарям для діагностики та лікування інфекційних захворювань. Захоплюючим і перспективним розділом є дослідження мікроорганізмів, які пов'язані з тілом людини, – людського мікробіому.

Мікробіологи й епідеміологи стежать за кількістю захворювань у популяціях, щоб виявляти спалахи та епідемії як тільки вони починаються, і вживати відповідних заходів контролю, ведуть спостереження за новими захворюваннями, а також за випадками біотероризму. Мікробіологи громадського здоров'я, які працюють у місцевих органах влади, контролюють громадські заклади харчування та водопостачання, щоб переконатися, що вони безпечні та вільні від патогенів.

Ветеринарна мікробіологія займається інфекційними захворюваннями свійських та домашніх тварин. Ветеринарні мікробіологи вивчають збудників інфекційних захворювань і розробляють заходи щодо боротьби з ними. Вони відстежують нові, неідентифіковані патогени, вивчають, як мікроорганізми викликають захворювання. Інші мікроорганізми живуть у шлунково-кишковому тракті жуйних тварин, таких як велика рогата худоба, і розщеплюють рослинний корм, що споживають ці тварини. Існують також патогени тварин, які мають значний економічний вплив, якщо їх не контролювати. Крім того, деякі патогени домашніх тварин також викликають захворювання людини.

Ґрунтова мікробіологія та **Морська мікробіологія** є важливими субдисциплінами екологічної мікробіології, в яких мікробні екологи використовують сучасні молекулярні та інформаційні методи до опису величезної різноманітності мікроорганізмів з точки зору їх зв'язків з іншими організмами та компонентами середовища їх існування.

Ґрунтові мікробіологи вивчають біохімічні процеси, зумовлені життєдіяльністю окремих груп ґрунтового мікробного населення, їхні інтенсивність та напрями протікання біохімічних реакцій залежно від кліматичних умов і антропогенного впливу, досліджують роль мікроорганізмів в утворенні ґрунтів та їх родючості.

Дослідження ролі мікроорганізмів у локальному та глобальному колообігу вуглецю, азоту та сірки набули нової актуальності в зв'язку зі зміною клімату. Особливий інтерес викликає роль мікроорганізмів у виробництві та вилученні парникових газів, таких як вуглекислий газ і метан.

Мікробні екологи також використовують мікроорганізми для біоремедіації та очищення навколишнього середовища.

Новим розділом екологічної мікробіології, який тільки започатковується, є астробіологія або пошук мікроорганізмів на інших космічних об'єктах.

Сільськогосподарська мікробіологія вивчає мікробіоту рослин та її вплив на вирощування сільськогосподарських культур, наприклад, азотфіксуючі бактерії, які впливають на родючість ґрунту та ріст рослин. Мікробіологи працюють над методами підвищення родючості ґрунту та врожайності, вивчають фітопатогенні мікроорганізми, розробляють засоби боротьби з хворобами рослин та використання бактеріальних і вірусних збудників комах як замінників хімічних пестицидів.

Харчова мікробіологія сприяє забезпеченню продуктами харчування високої якості. Мікробіологи вивчають мікроорганізми, які використовують для приготування їжі та напоїв (наприклад, йогурт, сир, пиво), а також мікроорганізми, які спричиняють псування їжі або є збудниками захворювань, що поширюються через їжу. Щоб захистити населення, потрібно відстежити конкретний штам від джерела до інфікованої їжі. Мікробіологи також працюють над запобіганням мікробному псуванню їжі та проводять дослідження щодо використання мікроорганізмів як джерел поживних речовин для людей.

Прикладна мікробіологія та **Мікробні біотехнології** використовують технології для виготовлення таких продуктів як вакцини, стероїди, спирти та інші розчинники, вітаміни, амінокислоти, ферменти, біопаливо та ін. з використанням мікроорганізмів. Ці альтернативні види палива є відновлюваними та можуть допомогти зменшити залежність від викопного палива.

Досягнення прикладної мікробіології є результатом фундаментальних досліджень у таких галузях як мікробна біохімія, мікробна генетика, молекулярна біологія та біоінформатика. Мікробіологи вивчають багато аспектів біології мікроорганізмів, включаючи їх різноманітні метаболічні можливості, зокрема, синтез антибіотиків і токсинів; способи, за допомогою яких мікроорганізми виживають у суворих умовах навколишнього середовища, а також вплив хімічних і фізичних агентів на ріст і виживання мікроорганізмів. Мікробні генетики, молекулярні біологи та біоінформатики вивчають природу генетичної інформації та як вона регулює розвиток і функціонування клітин і організмів. Бактерії *Escherichia coli* і *Bacillus subtilis*, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (пекарські дріжджі) і бактеріальні віруси, такі як фаги Т4 і лямбда, залишаються важливими модельними організмами, які використовують для розуміння біологічних процесів.

У мікробіології – величезні перспективи. Молекулярна геноміка зробила революцію в мікробіології, оскільки тепер вчені починають розумі-

ти організми цілісно, а не фрагментарно та у взаємодії з іншими членами спільноти. Як еволюціонують геноми; природа взаємодій хазяїн-патоген; мінімальний набір генів, необхідних для виживання організму; різноманітність мікроорганізмів (мікробіомів) в природних біотопах, у тому числі мікробіомів хемолітотрофних екосистем глибоководних гідротермальних джерел і мікробіому людини та багато інших питань активно вивчають методами молекулярно-геномного аналізу.

Активно здійснюється пошук нових генів для біотехнології; створюються синтетичні мікроорганізми та нові штами мікроорганізмів-продуцентів методами генетичної інженерії; розробляються нові молекулярно-біологічні методи діагностики мікроорганізмів-збудників; нові молекулярно-біотехнологічні методи та підходи для захисту людини, тварин та рослин від збудників захворювань; технологій біоремедіації та біоаугментації для оздоровлення довкілля.

Завдяки новим інструментаріям та методам молекулярної біології та біоінформатики мікробіологія в наш час знаходиться на другому етапі свого бурхливого розвитку. На мікробіологів попереду чекає багато неймовірних і неочікуваних відкриттів.

Питання для самостійного контролю

1. Що вивчає наука мікробіологія?
2. На яких концептуальних поняттях та твердженнях базується сучасна мікробіологія?
3. Назвіть групи організмів, що належать до об'єктів мікробіології.
4. Яке місце займає мікробіологія у системі біологічних наук?
5. Які переваги мікроорганізмів над іншими організмами як об'єктами лабораторних досліджень?
6. Які властивості мікроорганізмів визначають їхню фундаментальну роль у функціонуванні різноманітних екосистем і біосфери в цілому?
7. Яка роль мікроорганізмів у природі?
8. Яка роль мікроорганізмів у практичній діяльності людини?
9. За якими основними напрямками розвивається мікробіологія в наш час?
10. Охарактеризуйте основні субдисципліни мікробіології. Які з них фундаментальні, а які – прикладні?
11. Що вивчає медична та ветеринарна мікробіологія?
12. Який внесок зробили вітчизняні вчені в розвиток мікробіології?
13. Розгляньте як ваше життя залежить від мікробних продуктів (продукти харчування, біодобавки та ліки), які ви особисто вживаєте.

РОЗДІЛ 2
СИСТЕМАТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ

2.1. Положення мікроорганізмів в системі живої природи

Основним завданням систематики є побудова філогенетичної системи, що відображає хід еволюції всіх організмів. Першу спробу зобразити еволюційну історію живих організмів зробив Ернст Геккель у 1866 році (рис. 2.1) незабаром після того, як Дарвін опублікував «Походження видів» (1859). Геккель запропонував схему, в якій чотири основні групи організмів (*Plantae, Animalia, Protista* та *Moneres*) еволюціонували від загального одноклітинного предка. У групу *Moneres* (Монера) Геккель включив мікроорганізми, які ми зараз називаємо прокаріотами. Одноклітинні організми він позначив біля кореня дерева (рис. 2.1) як предки інших форм життя.

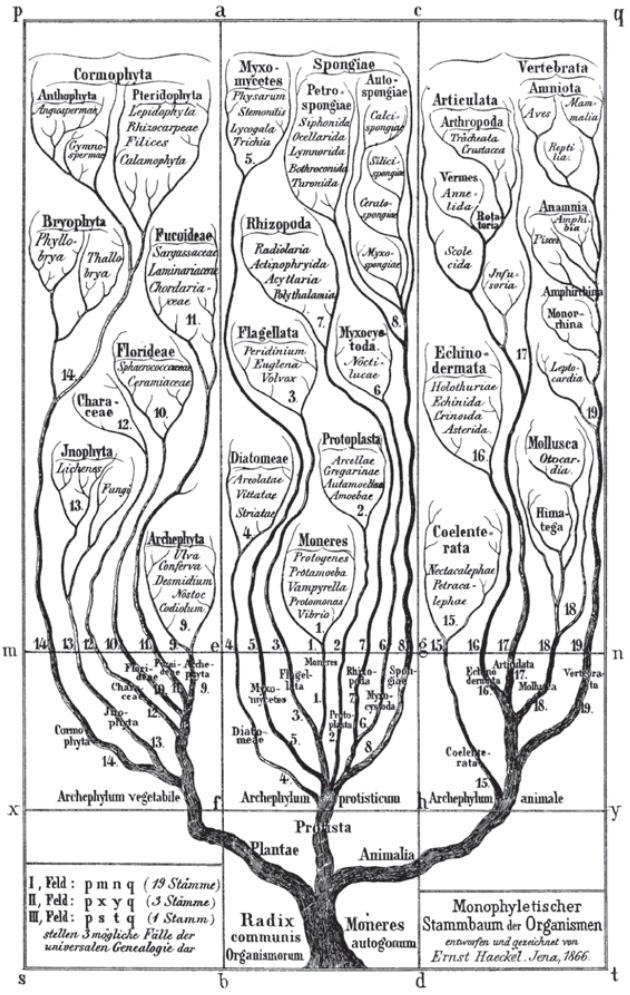


Рис. 2.1. Дерево життя Ернста Геккеля у Generelle Morphologie der Organismen (1866)

Система Геккеля, що включала рослини, тварини і протисти (найпростіші та мікроскопічні водорості), не розв'язувала проблему еволюційних зв'язків між організмами.

У 1969 році Роберт Віттекер запропонував систему живої природи з п'яти царств (рис. 2.2), яка демонструє певний прогрес у розумінні мікробної еволюції з часів Геккеля. Віттекер визнав ті самі групи що і Геккель (рис. 2.1), та вперше запропонував виділити *Fungi* (Гриби) як окреме царство. Протисти, як у Геккеля, включали еукаріотичні мікроорганізми, а Монера, відповідно, – прокаріотичні мікроорганізми.

Рис. 2.2. Універсальне дерево життя Роберта Віттекера (1969)

У 1970-х роках Карл Возе (1928–2012) запропонував використовувати для з'ясування філогенетичних (родинних), тобто еволюційних зв'язків між організмами порівняння послідовностей нуклеотидів генів, що кодують рибосомну РНК (рРНК). Гени, що кодують рРНК, є чудовими кандидатами на встановлення ступеня родинних зв'язків та проведення філогенетичного аналізу, оскільки вони присутні в усіх клітинах, функціонально постійні, нуклеотидні послідовності в них висококонсервативні (повільно змінюються в процесі еволюції) і мають достатню довжину для розрахунків філогенетичних зв'язків на достатню глибину часу еволюції.

Універсальне дерево життя, побудоване на основі послідовностей генів рРНК (рис. 2.3), це сучасне уявлення про генеалогію всього живого на Землі. Ця діаграма зображує історію еволюції – філогенез усіх організмів і чітко поділяє всі організми на три домени. Корінь універсального дерева являє собою момент часу, коли все існуюче життя на Землі мало останнього універсального спільного предка LUCA (Last Universal Common Ancestor). Від LUCA еволюція йшла двома шляхами до формування доменів *Bacteria* та *Archaea*.

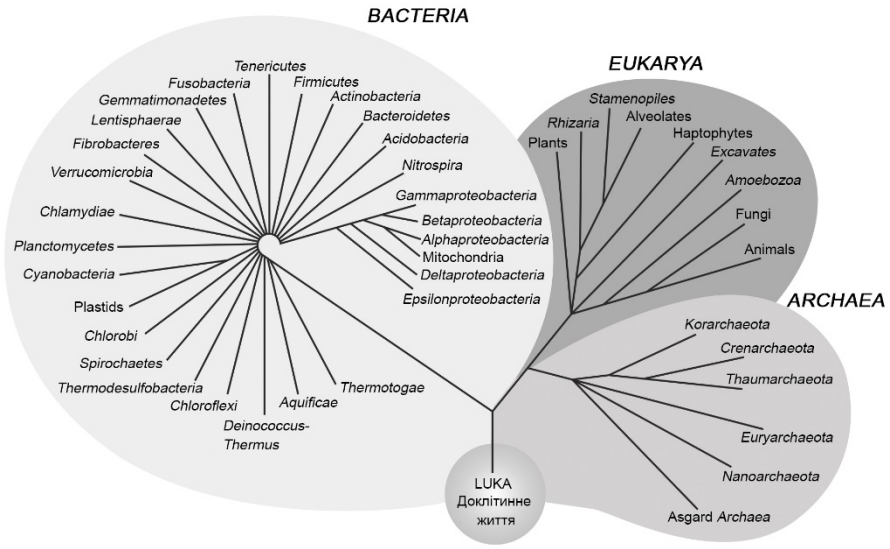


Рис. 2.3. Схема універсального філогенетичного дерева, побудоване шляхом порівняння послідовностей нуклеотидів генів малої субодиниці рРНК. Кожен домен представлено лише кількома ключовими представниками.

Пізніше в процесі еволюції домен *Archaea* розійшовся з доменом *Eukarya*. Ці три домени клітинного життя *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya* є еволюційно різними, але вони мають однакові риси, що вказують на їх спільне походження від універсального предка клітин. У кожному домені у ході еволюції формувались нові ієрархічні групи – таксони, які представляють сучасний зріз сформованої та існуючої біологічної різноманітності живих організмів. Впорядкуванням сформованої в процесі еволюції величезної кількості форм клітинного життя займається наука систематика.

2.2. Таксономія

Мікробіологи стикаються з непростим завданням: зрозуміти різноманітність форм життя, які займають усі можливі для цього місця на Землі, але їх неможливо побачити неозброєним оком. Очевидно, що саме це є першочерговим завданням для систематики.

Систематика – це біологічна наука, яка вивчає різноманітність організмів, поділ їх на групи (таксони), визначає родинні зв'язки між ними та правила найменувань організмів. Завданням систематики мікроорганізмів є впорядкування великих масивів даних про мікробіологічні об'єкти для зручної роботи з ними.

Оскільки мікроорганізми – це велика збірна група, в яку організми об'єднані виключно за мікроскопічними розмірами, то термін мікроорганізм не є таксономічним. До мікроорганізмів відносяться бактерії, археї, гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші, а також віруси, що не мають клітинної будови та використовують біосинтетичний апарат клітини хазяїна. Так історично склалося, що еукаріотичні мікроорганізми – мікроскопічні водорості, гриби та найпростіші є об'єктами, відповідно, курсів ботаніки, мікології та зоології, а віруси – вірусології, тому систематика їх розглядається в спеціалізованих розділах цих біологічних наук. У цій главі основну увагу приділено правилам біологічної номенклатури та класифікації саме прокаріотичних мікроорганізмів – бактерій та архей.

Одною з головних задач систематики є побудова за визначеними правилами системи (схеми), в якій у певному порядку розташовуються представники мікроорганізмів, об'єднані в групи (таксони). Таку схему називають класифікацією, тобто **класифікація** – це створена за певними правилами система живих організмів.

Наука про класифікацію живих істот називається **таксономією**. У більш широкому сенсі таксономія складається з трьох окремих але взаємопов'язаних частин: класифікація, номенклатура та ідентифікація. Термін **таксономія** використовується для розподілу організмів на групи, які називаються таксонами. **Таксон** – це класифікаційна одиниця в систематиці живих організмів, що означає групу організмів з заданим ступенем подібності.

Термін «систематика» часто використовується як синонім терміну «таксономія», хоча іноді він передбачає більш загальне наукове дослідження організмів з кінцевою метою їх впорядкування.

При створенні класифікації таксони розташовують відповідно до їх ієрархії. У сучасній класифікації прокаріотів прийнято наступну **ієрархію таксонів**:

Домен/Надцарство	(Regio)
Царство	(Regnum)
Філум/Тип	(Phylum/Divisio)
Клас	(Classis)
Порядок	(Ordo)
Родина	(Familia)
Триба	(Tribus)
Рід	(Genus)
Вид	(Species)

На рис. 2.4 наведена ієрархічна система на прикладі класифікації бактерій роду *Shigella*.

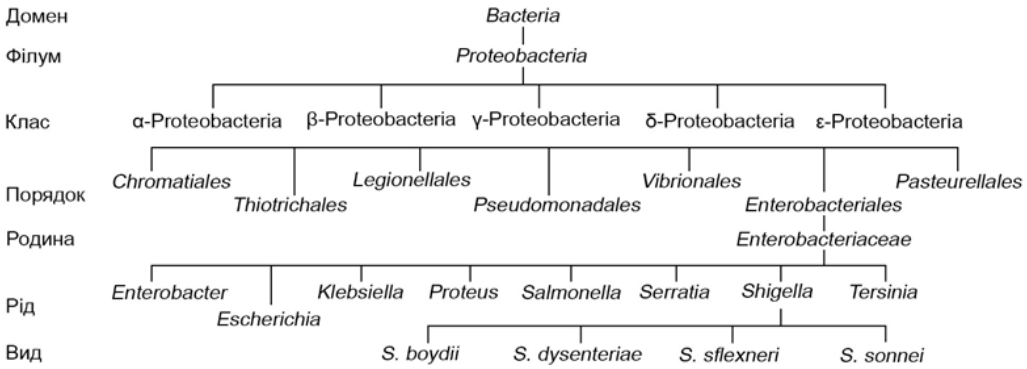


Рис. 2.4. Ієрархічна система на прикладі класифікації бактерій роду *Shigella*

Як і в ботаніці та зоології основною таксономічною одиницею у прокаріотів є вид. Визначення виду для прокаріотів через їх генетичну мінливість та видову гетерогенність є неоднозначним. В мікробіології **вид** може бути визначений як сукупність штамів з високим ступенем схожості послідовностей ДНК (для 16S рРНК більше 95%) та фенотипічних ознак. Представником виду є **штам** – чиста культура мікроорганізму, ізольована з певного джерела і в певний час.

Для визначення внутрішньовидової різноманітності застосовують підвидову категорію **біовар** (біологічний варіант). Біовари як представники виду відрізняється за певними біологічними ознаками (хемовар, фаговар, серовар т. ін.).

Необхідно розуміти визначення також інших часто вживаних термінів в мікробіології: **культура** – популяція клітин мікроорганізму, що штучно вирощується (або виросла); **чиста культура** – популяція мікроорганізмів, що складається з клітин одного виду; **культивування** – процес штучного вирощування мікроорганізмів; **колонія** – ізольоване скупчення клітин, що утворилося на поверхні щільного поживного середовища, в результаті їх розмноження. **Ідентифікація** – це практична сторона таксономії. Під терміном ідентифікація треба розуміти визначення положення ізольованого мікроорганізму в системі класифікації, відношення його до конкретного таксону та його назви, а **діагностика мікроорганізму** – це визначення відношення ізольованого мікроорганізму до певної групи збудників, що викликають захворювання.

Проблеми виду в мікробіології пов’язані з неможливістю визначення чітких меж між представниками споріднених видів, що обумовлено знач-

ною генетичною мінливістю прокаріотів завдяки наявності мобільних позахромосомних генетичних елементів (плазміди, транспозони, бактеріофаги), механізмам горизонтального переносу генетичної інформації (кон'югація, трансдукція, трансформація) та переміщенням генів у геномі (генні касети).

Для впорядкування систематики прокаріот у 1980 році було прийнято Міжнародний кодекс номенклатури бактерій (прокаріот), який визначає правила найменування таксонів відповідно до їх рангу. Він є одним із кодексів біологічної номенклатури. На базі сформульованих у ньому принципів була проведена інвентаризація назв прокаріотів і складено Затверджені Списки назв (Approved Lists), що постійно поповнюються, та засновано Міжнародний журнал систематичної та еволюційної мікробіології, в якому обнародується інформація про відкриті нові мікроорганізми, їх характеристики, назви та всі внесені зміни в класифікації прокаріотів.

Номенклатура – це розділ таксономії, який займається присвоєнням назв таксономічним групам за погодженням з опублікованими правилами. Біологічна номенклатура прокаріотів включає правила найменувань та списки затверджених назв таксонів. Для назв таксонів використовується біологічна латинська мова, яка на час становлення систематики була мовою науки. У мікробіології як і взагалі в біології для назви виду у прокаріотів використовують біномну (бінарну) номенклатуру.

Назва виду складається з двох слів і включає назву роду та видове визначення, наприклад, *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*. Назва штаму включає назву виду та штамове визначення, яке дається у довільній формі, наприклад, *Escherichia coli* ATCC 1095*, Bacillus subtilis* IMB 987*, Pseudomonas aeruginosa* ONU 10057. При частому написанні назву виду можна скорочувати (назву роду до першої літери) – *E. coli* ATCC 1095*, B. subtilis* IMB 987*, P. aeruginosa* ONU 10057. Назви таксонів вище виду складаються з одного слова.

Як уже визначали вище, класифікація – це створена за певними правилами система живих організмів. У залежності від підходів до побудови класифікації є фенетичними (штучними) або філогенетичними (природними). В основу фенетичної класифікації прокаріотів покладено визначення ступеня схожості за сукупністю їх фенотипічних (морфо-культуральних і фізіолого-біохімічних) ознак, а філогенетична – базується на визначенні ступеня родинних зв'язків, тобто їх еволюційного походження.

Можливість будувати філогенетичну класифікацію з'явилась, коли в 1970-х роках Карл Возе та Джордж Фокс запропонували використовувати нуклеотидні послідовності рРНК для оцінки еволюційних зв'язків між мікроорганізмами, що відкрило можливості для визначення походження та еволюції мікробних форм життя на Землі.

2.3. Класичний підхід

Класичні підходи до систематики використовують сукупність фенотипічних характеристик: морфологію клітин і колоній; культуральні ознаки (характер росту на середовищах різного складу); фізіологічні характеристики (використання різних субстратів, відношення до температури, кисню, pH і т. ін.); біохімічні властивості (наявність певних ферментів та метаболічних шляхів); хемотаксономічні ознаки (хімічний склад, наявність специфічних сполук); серологічні властивості (наявність певних антигенів); чутливість до специфічних фагів (фаготипування).

Морфологічна характеристика. Морфологію легко вивчати й аналізувати в еукаріотичних мікроорганізмів. Морфологічні порівняння є цінними, оскільки структурні особливості залежать від експресії багатьох генів і зазвичай є генетично стабільними. Тому морфологічна подібність для них часто є хорошим показником спорідненості. У бактерій і архей морфологічні особливості клітин дуже обмежені, тому мало інформативні для таксономії.

Фізіологічні та біохімічні характеристики корисні, оскільки вони безпосередньо пов'язані з природою та активністю мікробних білків. Наприклад, виявлення специфічних кінцевих продуктів бродіння показує наявність специфічних катаболічних ферментів і генів мікроорганізму, які їх кодують. Тому аналіз характеристик, таких як енергетичний метаболізм і транспорт поживних речовин, забезпечує непряме порівняння мікробних геномів.

Серед важливих біохімічних характеристик, що використовують в таксономії прокаріотів, є жирні кислоти. Їх можна аналізувати за допомогою методики аналізу метилових ефірів жирних кислот (МЕЖК). Профіль жирних кислот виявляє відмінності в довжині ланцюга, ступені насичення, розгалуженні ланцюгів, гідроксильних групах. Мікроорганізми одного виду матимуть ідентичні профілі жирних кислот за умови, що вони вирощуються при суворому дотриманні однакових умов. Це також обмежує аналіз МЕЖК лише тими мікроорганізмами, які можна вирощувати в чистій культурі.

Оскільки ідентифікацію до виду здійснюють шляхом порівняння результатів невідомого мікроорганізму, про який йде мова, з профілем МЕЖК інших, відомих мікроорганізмів, ідентифікація можлива лише за умови попереднього аналізу представника відповідного виду. Тим не менш, аналіз МЕЖК особливо важливий у мікробіології громадського здоров'я, продуктів харчування та води.

Досягнення мас-спектрометрії призвели до швидкої та точної ідентифікації бактерій на основі порівняння присутності великої кількості специфічних білків. Для цього використовується метод матрично лазерної десорбції/іонізації за часом прольоту MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser

Desorption Ionization Time Of Flight Mass-Spectrometry) – типу мас-спектрометрії, що дозволяє аналізувати складні біомолекули. Подібно до аналізу МЕЖК, кожен експериментально отриманий профіль білка необхідно зіставити з профілем білка відомого мікроорганізму.

Метод MALDI-ToF стає все більш важливим у медичних мікробіологічних лабораторіях, де знаходяться культури штамів уже чітко ідентифікованих мікроорганізмів, що регулярно зустрічаються як збудники. Як і в методі МЕЖК, культури мікроорганізмів потрібно вирощувати при суворому дотриманні однакових умов.

2.4. Молекулярно-біологічний підхід

Важко переоцінити, як дослідження ДНК, РНК і білків розширили розуміння мікробної еволюції та таксономії. Біологи-еволюціоністи, які вивчають рослини та тварини, опираються на багатий літопис скам'янілостей, щоб зібрати історію морфологічних змін, а молекулярні підходи доповнюють такі дані.

Навпаки, мікроорганізми майже не мають скам'янілих палеонтологічних решток, тому молекулярний аналіз геному є єдиним можливим засобом збору даних про історію еволюції мікроорганізмів. Мікробні геноми можна безпосередньо порівнювати, а філогенетичну подібність можна оцінити різними способами. Для цього використовують послідовність нуклеотидів ДНК, яку можна визначати та порівнювати для одного чи кількох генів або для повного геному досліджуваних мікроорганізмів залежно від необхідного ступеня ідентифікації.

Олігонуклеотидні підписи (сигнатури). Рибосомні РНК з малих субодиниць (16S з клітин бактерій і архей, відповідно 18S з еукаріотів) стали молекулами вибору для визначення мікробної філогенії та таксономічного визначення на рівні роду (рис. 2.5). Рибосомальна РНК малої субодиниці (МСО) широко застосовуються в дослідженнях мікробної еволюції, спорідненості та ідентифікації до роду з кількох важливих причин. По-перше, вони виконують однакову функцію в усіх мікроорганізмів. Крім того, оскільки рибосоми абсолютно необхідні для життєдіяльності клітин, і самі рибосоми не можуть функціонувати без рРНК МСО, то гени, що кодують ці рРНК, не можуть мати часті та великі мутації. Таким чином, ці гени змінюються з часом дуже повільно. Нарешті, гени рРНК рідко піддаються горизонтальному переносу, що є важливим фактором у порівнянні послідовностей для філогенетичних задач.

Для визначення ступеня родинних зв'язків порівнюються послідовності не всієї молекули 16S та18S рРНК, а окремих ділянок специфічних олігонуклеотидних послідовностей, що назвали сигнатурами (підписами). Гени рРНК мають певні послідовності, які є варіабельними у мікроорганізмів, а також інші ділянки послідовностей, які є

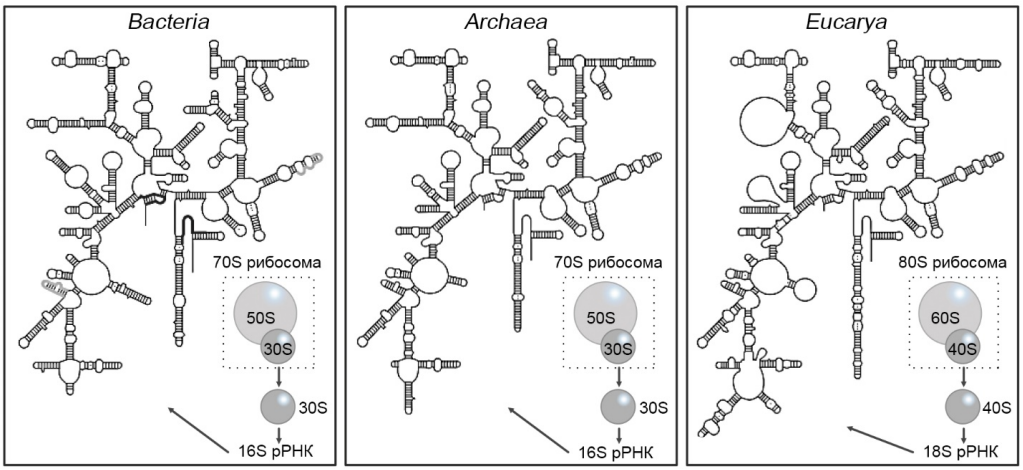


Рис. 2.5. Вторинна структура рРНК (16S рРНК прокаріотичних та 18S рРНК еукаріотичних) представників з доменів *Bacteria (Escherichia coli), Archaea (Methanococcus vannielii)* і *Eukarya (Saccharomyces cerevisiae)*

стабільними та досить подібними. Варіабельні ділянки послідовностей дозволяють порівнювати близькоспоріднені мікроорганізми, тоді як стабільні послідовності дозволяють порівнювати більш віддалені мікроорганізми.

Порівняльний аналіз послідовностей рРНК МСО з тисяч організмів продемонстрував наявність послідовностей олігонуклеотидних сигнатур. Це короткі консервативні послідовності нуклеотидів, специфічні для філогенетично визначених груп організмів. Таким чином, сигнатурні послідовності, знайдені в бактеріальних рРНК, рідко або взагалі не зустрічаються в рРНК архей, і навпаки. Подібним чином 18S рРНК еукаріотів містить характерні послідовності, які є специфічними для домену *Eukarya*. Сигнатурні послідовності для таксону нижчого рівня, наприклад, роду *Pseudomonas*, можуть бути знайдені у варіабельних областях вищого таксону домену *Bacteria*.

Здатність ампліфікувати (копіювати) сигнатурні ділянки генів рРНК (рДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і секвенувати ДНК методами технології нового покоління значно підвищили ефективність визначення послідовностей рРНК МСО. Методом ПЛР можна ампліфікувати необхідні ділянки рДНК з геномів різних організмів та використовувати для виявлення спорідненості досліджуваних мікроорганізмів.

Це означає, що на практиці ПЛР-праймери можна генерувати для ампліфікації рДНК як культивованих, так і некультивованих мікроорганізмів. Будь-який некультивований мікроорганізм, ідентифікований виключно за його послідовністю нуклеїнової кислоти, називається філотипом. Використання сигнатурних послідовностей рРНК МСО як таксономічного маркера прийнято як молекулярну міру спорідненості.

2.5. Технологія філогенії генів 16S рРНК

В основному для визначення ступеня родинних зв'язків використовується молекули 16S рРНК для прокаріотичних та 18S рРНК для еукаріотичних організмів (рис. 2.5). Ці молекули входять до складу рибосом, які в усіх організмів відповідають за самий важливий життєвий процес – синтез білка, тому є високо консервативними і можуть вважатися своєрідним біологічним «хронометром».

Послідовності нуклеотидів цих молекул порівнюваних мікроорганізмів визначають методами секвенування та біоінформатичного аналізу. Шляхом порівняння їх методом кластерного аналізу з використанням відповідних комп'ютерних програм вираховують групи подібності (клади), що відображають родинні зв'язки мікроорганізмів та їх еволюційний розвиток.

Схема технології (рис. 2.6), що лежить в основі філогенії генів рибосомної РНК включає: виділення ДНК з клітин; копіювання генів, що кодують рРНК, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); секвенування скопійованих генів; вирівнювання послідовностей, порівняльний аналіз послідовностей цього гена з інших організмів та побудова філогенетичного дерева.

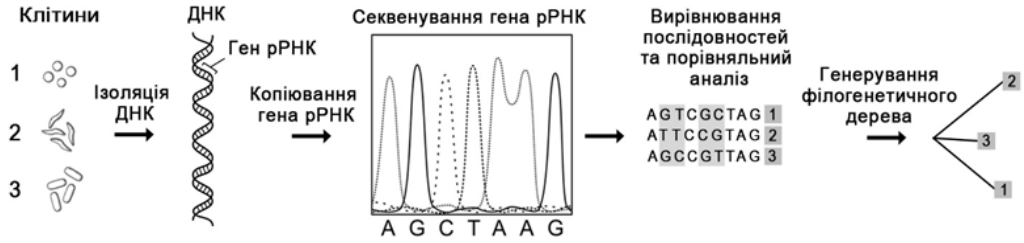


Рис. 2.6. Схема технології філогенії генів 16S рРНК

На основі таких порівнянь було побудовано філогенетичне дерево, де всі представники живого світу розділені на три великі домени (надцарства): *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya* (рис. 2.3). Домени *Bacteria* та *Archaea* містять лише прокаріотичні організми, а домен *Eukarya* поєднує як одноклітинні, так і багатоклітинні (рослини, тварини) організми.

Традиційно члени доменів *Bacteria* та *Archaea* відносять до прокаріотів, оскільки вони на відміну від еукаріотів мають просту внутрішню клітинну структуру без ядра та інших органел, відокремлених мембранами. Проте найважливішим результатом тридоменного дерева життя є те, що ми тепер усвідомлюємо, що бактерії та археї – це різні філогенетичні групи. Археї не є специфічною, спеціалізованою групою бактерій, як вважалося раніше, а насправді є окремою групою, що має більш тісні філогенетичні зв'язки з еукаріотами, ніж з бактеріями.

Ця концепція виявилась дуже важливою для формування нашого уявлення про еволюцію організмів. Порівняльний аналіз послідовностей рибосомних РНК також показав, що мітохондрії та хлоропласти мають прокаріотичне походження.

Також виявлено багато доказів широкого горизонтального перенесення генів між мікроорганізмами. Такі передачі відбуваються найчастіше між спорідненими організмами, але гени можуть також переноситися на більші генетичні відстані – навіть між доменами. Представники бактерій і архей містять деякі гени з дуже схожими послідовностями, члени *Eukarya* містять гени з доменів *Bacteria* та *Archaea*, а деякі члени домену *Bacteria* містять еукаріотичні гени.

Порівняння послідовностей повного геному. Наразі систематика знаходиться на етапі переходу від методів порівняння послідовностей рРНК МСО до методів, заснованих на повногеномному секвенуванні (ПГС). При цьому розроблена оригінальна номенклатура залишається, хоча техніка виконується *in silico*, а не *in vitro*. Як і в випадку з фенетичними підходами, порівняння зі стандартами та типовими штамами формує основу для ідентифікації та філогенетичного поділу. Багато класичних властивостей, які використовуються при ідентифікації, тепер виводяться з послідовностей нуклеотидів геному, а не визначаються шляхом культивування.

Оскільки сфера таксономії мікроорганізмів переходить до секвенування повного геному для ідентифікації штамів і таксономічної класифікації, розробляються нові кількісні показники та оцінки спорідненості.

Ідентифікація на видовому рівні вимагає детального порівняння геномів нового ізоляту з типовими штамами його найближчих родичів. Середня ідентичність нуклеотидів (СІН) наразі вважається стандартом ідентифікації видів. Ця техніка використовує попарне вирівнювання всіх спільних послідовностей між двома геномами та обчислює частку ідентичних нуклеотидів. Значення СІН для двох геномів одного виду повинні становити не менше 95%.

Для визначення ступеня спорідненості використовують також метод гібридизації ДНК-ДНК (ДДГ), яка передбачає змішування геномної ДНК двох штамів. Суміш нагрівають до денатурації для розділення ниток ДНК, а потім повільно охолоджують, щоб забезпечити ренатурацію та створення гібридних молекул ДНК з ниток двох досліджуваних мікроорганізмів. При цьому некомплементарні ділянки ДНК залишаються непарними, що дозволяє обчислювати ступінь ренатурації та, відповідно, ступінь родинних зв’язків.

Ще один молекулярний показник родинних звязків – це визначення вмісту гуаніну та цитозину (Г+Ц). Цей показник є простим відсотком від усіх пар нуклеотидів у ДНК. Показник Г+Ц легко визначається обчислювальним шляхом з даних повногеномного секвенування. Вміст Г+Ц в

організмах коливається приблизно від 30% до 80%. Незважаючи на широкий діапазон варіацій, вміст Г+Ц у штамах в межах виду є постійним і мало змінюється в межах роду.

Для виявлення споріднених зв'язків у мікроорганізмів іноді використовують також деякі білкові молекули. Так, для дихаючих організмів застосовують визначення послідовності амінокислот у білка цитохрому *с*.

2.6. Молекулярно-біологічна ідентифікація

Усі нуклеотидні послідовності вивчених організмів дослідники вносять до Всесвітнього комп'ютерного генбанку (GenBank), що використовується для ідентифікації нового виділеного мікроорганізму шляхом порівняння його послідовностей з послідовностями, внесеними в генбанк.

Для ідентифікації конкретного мікроорганізму виділяють його чисту культуру та проводять аналіз нуклеотидної послідовності 16S рРНК. Порівняння з уже відомими послідовностями дозволяє віднести ізольований мікроорганізм в одну із груп (кластерів) на філогенетичному дереві, враховуючи загальноприйняті рівні подібності послідовностей нуклеотидів: для виду > 95%, роду > 94%, родини > 92%, порядку > 90%, класу > 85%, філуму > 80%. Групи подібності, що формуються шляхом порівняння послідовностей називають «операційними таксономічними одиницями» (ОТО).

Ідентифікація підвидів і штамів. У багатьох випадках для з'ясування різноманітності в межах виду, як правило, необхідно аналізувати гени, що змінюються швидше, ніж ті, що кодують рРНК. Техніка під назвою *мультилокусний аналіз послідовностей* порівнює послідовності кількох наявних консервативних генів (рис. 2.7).

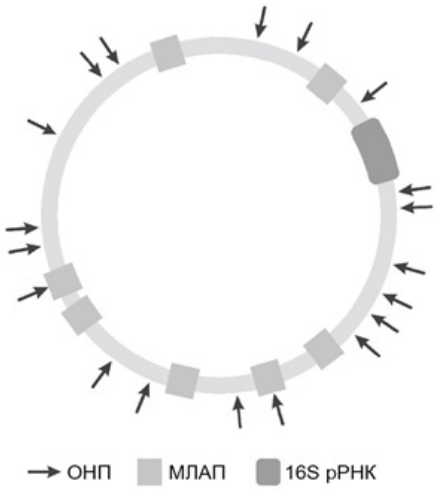


Рис. 2.7. Місця геному, що використовуються для молекулярно-таксономічних досліджень: ОНП – однонуклеотидні поліморфізми; МЛАП – мультилокусний аналіз послідовностей; 16S рРНК – 16S рибосомальна РНК

При цьому досліджують принаймні 5 генів, щоб уникнути недостовірних результатів, що можуть виникнути через горизонтальне перенесення генів. Оскільки може існувати багато різних версій (алелів) кожного гена, виявлення факту, що два мікробних ізоляти мають однакові алелі для кількох генів, є переконливим доказом того, що два штами тісно пов'язані, або, можливо, це є навіть один і той самий штам. Зараз мультилокусний аналіз послідовностей часто виконується з послідовностями цілого геному, що має назву *повногеномний мультилокусний аналіз послідовностей*.

Доступність даних повногеномного мультилокусного аналізу послідовностей дозволяє розширене порівняння гена з геном. Щоб оглянути велику частину геному, однонуклеотидні поліморфізми ідентифікують в конкретних генах, міжгенних областях або інших некодуючих областях (рис. 2.7).

Аналіз однонуклеотидних поліморфізмів має спільні риси з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. Ця методика ідентифікує відмінності в фрагментах ДНК (патернах), отриманих в результаті розщеплення ДНК ендонуклеазою рестрикції, які відображають зміни окремих пар основ. Коли цей аналіз застосовують до гена, що кодує рРНК малої субодиниці, його називають риботипуванням. З появою повногеномного сиквенування ці техніки все частіше виконуються біоінформатично *in silico*.

При ідентифікації бактерій і архей мікробіологи використовують Посібник Бергі. Перше видання Посібника з визначення бактерій професора бактеріології університету Пенсильванії Девіда Бергі та його чотирьох колег вийшло в світ у 1923 р.. В IX виданні Посібника Бергі з систематичної бактеріології (1984 р.) вперше виокремлено археї від бактерій.

У XXI столітті створено онлайн-довідник Bergey's Manual of Systematics of *Archaea* and *Bacteria,* що дозволяє періодично оновлювати ресурс у міру виявлення, опису та перевірки нових таксонів. Останнє видання цього довідника складається з п'яти томів. Класифікація в ньому організована на основі філогенезу, а клінічно важливі бактерії розглядаються в загальній філогенетичній схемі.

2.7. Колекції мікроорганізмів

Колекції мікроорганізмів є вкрай необхідними як для потреб таксономії (підтримання типових штамів мікроорганізмів, за якими закріплені відповідні назви) та фундаментальних досліджень, так і для потреб практичного їх застосування, оскільки вони створюють цінні продукти, наприклад, виробництво хліба, пива, вина, конкретних метаболітів, таких як антибіотики, біоінсектициди, алкалоїди, спирти, органічні кислоти, вітаміни, амінокислоти, біополімери у XX столітті та виробництво мікробних продуктів за технологією рекомбінантних ДНК на початку XXI століття. У цьому випадку колекції мікроорганізмів виконують функцію депозитаріїв, в яких довгостроково зберігають практично корисні мікроорганізми.

Колекції мікробних культур існують з тих пір, як бактеріологи вперше змогли виділити та культивувати мікроорганізми. Це багате джерело (сховище, репозитарій) мікроорганізмів, які становлять інтерес у минулому, теперішньому та майбутньому. Основне завдання колекції довгостроково зберігати культури мікроорганізмів *ex situ*.

На початку XX ст. окремими дослідниками чи науковими організаціями в країнах Європи було створено цілий ряд колекцій мікроорганізмів, проте всі вони на сьогоднішній день втрачені.

Таблиця 2.1

Деякі колекції культур мікроорганізмів

Абревіатура	Назва колекції	Країна
ATCC	American Type Culture Collection (Американська колекція типових культур)	США
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Німецька колекція культур мікроорганізмів і культур клітин)	Німеччина
NCTC	National collection of typical cultures (Національна колекція типових культур)	Великобританія
NCYC	National Collection of Yeast Cultures (Національна колекція культур дріжджів)	Великобританія
LMG	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms/LMG Bacteria Collection (Бельгійська координована колекція мікроорганізмів)	Бельгія
RSKK	Refik Saydam National Type Culture Collection (Національна колекція типових культур Рефіка Сайдама)	Туреччина
NBRC	NITE Biological Resource Center (Центр біологічних ресурсів NITE)	Японія
UKM	Ukrainian Collection of Microorganism (Українська колекція мікроорганізмів)	Україна
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal and Yeast Collection (Колекція грибів і дріжджів)	Нідерланди
SCCM	Sporometrics Culture Collection of Microorganisms (Колекція культур спороутворювальних мікроорганізімів)	Канада

У 1920 р. у Великій Британії була заснована Національна колекція типових культур (NCTC), до складу якої увійшли понад 5000 бактеріальних штамів. Створена в США на п'ять років пізніше Американська колекція типових культур (ATCC) наразі вважається найбільшим у світі біоресурсним центром зі зберігання та вивчення мікроорганізмів. Колекція налічує понад 18 000 бактеріальних штамів, що належать до 750 родів. В ATCC зберігається понад 3600 типових штамів, що закладають основу для вивчення бактерій з метою їх таксономії.

Зараз існує 568 колекцій культур у 68 країнах, зареєстрованих у Всесвітньому центрі даних мікроорганізмів (WDCM) по всьому світі. Більшість із цих колекцій є невеликими спеціалізованими колекціями, які надають культури чи інші пов'язані послуги лише за спеціальною угодою. Інші, особливо національні колекції, публікують каталоги з переліком організмів, що зберігаються, і надають широкі послуги промисловим і науковим організаціям (табл. 2.1).

Основні функції колекції мікробних культур: збирати, вивчати та підтримувати культури мікроорганізмів, збирати та накопичувати інформацію про мікроорганізми, що утримуються, робити їх доступними для наукової спільноти через друковані або онлайн-каталоги, діяти як безпечні депозитарії мікроорганізмів з обмеженим розповсюдженням, надавати послуги ідентифікації відповідно до спеціалізації колекції та служити сховищем для довгострокового зберігання цінних культур.

Досліднику важливо депонувати культури, описані в експериментальних публікаціях, щоб забезпечити доступ у майбутньому та забезпечити наукову відтворюваність. Сьогодні більшість наукових журналів вимагають депонування послідовностей нуклеотидів у загальнодоступних сховищах, а також має бути обов'язковим депонування культур, у яких визначено послідовності нуклеотидів. Важливо депонувати культури мікроорганізмів в університетських колекціях для організації навчальних занять, зокрема пов'язаних з ідентифікацією та підтримкою культур мікроорганізмів.

Питання для самостійного контролю

1. Охарактеризуйте положення мікроорганізмів у системі живої природи.
2. Чому термін «мікроорганізм» не має таксономічного сенсу?
3. Дайте визначення термінам класифікація та систематика?
4. Чому рРНК підходить для визначення ступеня родинних зв'язків.
5. Для чого застосовують олігонуклеотидні сигнатури 16S рРНК?
6. Опишіть правила назви виду для бактерій і наведіть приклади.
7. Назвіть таксони в порядку їх ієрархії.
8. Опишіть схему технології філогенії генів 16S/18S рРНК.
9. Сформулюйте та поясніть проблеми виду в мікробіології.
10. За якими критеріями можна визначити що виділено новий вид?

РОЗДІЛ 3
БІОЛОГІЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ

Як визначено вище до мікроорганізмів відносяться всі мікроскопічні організми, які мають клітинну будову: бактерії, археї, гриби, мікроскопічні водорості, найпростіші, а також віруси, які не мають клітинної будови та власного метаболізму.

Різноманітність мікроорганізмів можна розглядати як з точки зору філогенетичної, так і функціональної різноманітності. Філогенетична різноманітність базується на еволюційних (родинних) зв'язках між мікроорганізмами, тому її можна визначити шляхом порівняння послідовностей генів або геномів і, зазвичай, вона визначається на основі філогенії генів 16S/18S рРНК, яка, як вважають, відображає всю філогенетичну історію організму.

Функціональна різноманітність залежить від виконуваних функцій, що залежать від фізіології та метаболізму мікроорганізмів. У багатьох випадках функціональні ознаки прокаріотичних мікроорганізмів збігаються з філогенетичними групами, однак, часто функціональна різноманітність не відповідає різноманітності, що визначена за генами 16S рРНК. Це можна пояснити тим, що функціональна ознака в процесі еволюції шляхом горизонтального перенесення генів поширюється між різними організмами з несхожими послідовностями генів 16S рРНК, або ознака формується еволюційно незалежно в різних лініях і кодується різними генами.

Опис біологічної різноманітності та характеристики основних представників доменів *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya* у подальшому наведено у відповідності до структури філогенетичного дерева життя, побудованого на порівнянні 16(18)S рРНК (рис. 3.1).

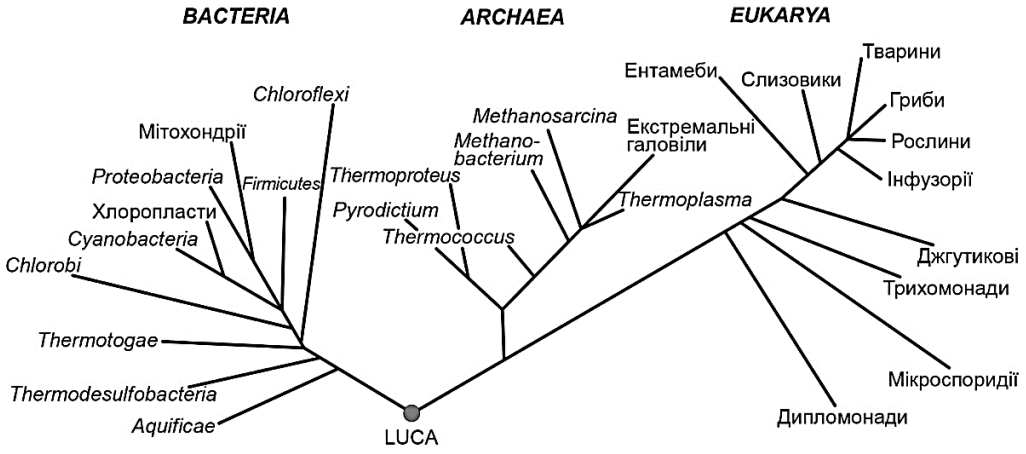


Рис. 3.1. Філогенетичне дерево життя, засноване на порівнянні 16(18)S рРНК. LUCA – останній універсальний спільний предок

Очевидно, що десятки тисяч описаних видів мікроорганізмів неможливо розглянути в одному підручнику. Тому, базуючись на побудованих філогенетичних деревах, зосередимо нашу увагу на найбільш поширених у природі та вивчених представниках, які мають важливе значення в житті людини (див. Додаток).

Філогенез, заснований на послідовностях нуклеотидів генів рРНК засвідчує, що організми доменів *Bacteria* та *Archaea* представлені виключно мікроорганізмами, а в домені *Eukarya* всі лінії еволюції включають мікроорганізми, які складають переважну більшість вищих таксономічних груп.

3.1. Домен *BACTERIA*

Філогенез, заснований на послідовностях генів рибосомної РНК, підтверджує три сфери життя *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya*. На основі 16S рРНК до домену *Bacteria* віднесено прокаріотичні мікроорганізми, які розділено на більше як 80 філумів (типів), з яких бактерії 23 філумів культивуються, а решта виявлені за нуклеотидною послідовністю 16S рРНК (рис. 3.2).

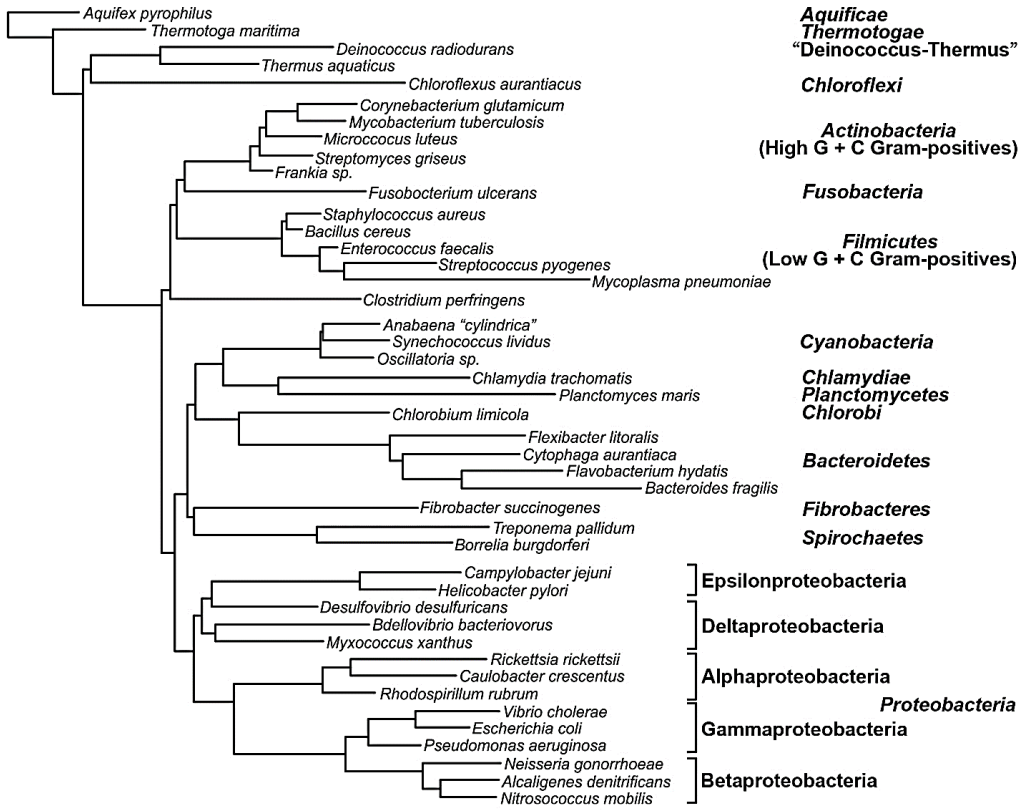


Рис. 3.2. Філогенетичне дерево основних філумів домену *Bacteria*, сформоване шляхом порівняння послідовностей 16S рРНК. Зображені основні клади домену *Bacteria*, які мають культивовані види

До філогенетичних груп домену *Bacteria*, які мають представників, що культивуються, на сьогодні відносено філуми: *Aqificie, Thermotoga*, *Thermodesulfobacteria, Deinococcus-Thermus, Chrysiogenetes, Chloroflexi, Thermomicrobia, Nitrospirae, Deferribacteres, Cyanobacteria, Chlorobi, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Planctomicetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacteres, Acidobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria, Verrucomicrobia, Dictioglomi.*

Більше ніж 90% охарактеризованих родів і видів бактерій віднесено до чотирьох філумів: *Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes.*

Коротка інформація про біологічну різноманітність та характеріологічні особливості основних груп бактерій наведена в Додатку до цього підручника.

3.2. Домен *ARCHAEA*

До домену *Archaea* відносять прокаріотичні мікроорганізми, розділені на 5 філумів: *Nanoarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota, Crenarcheota* (рис. 3.3).

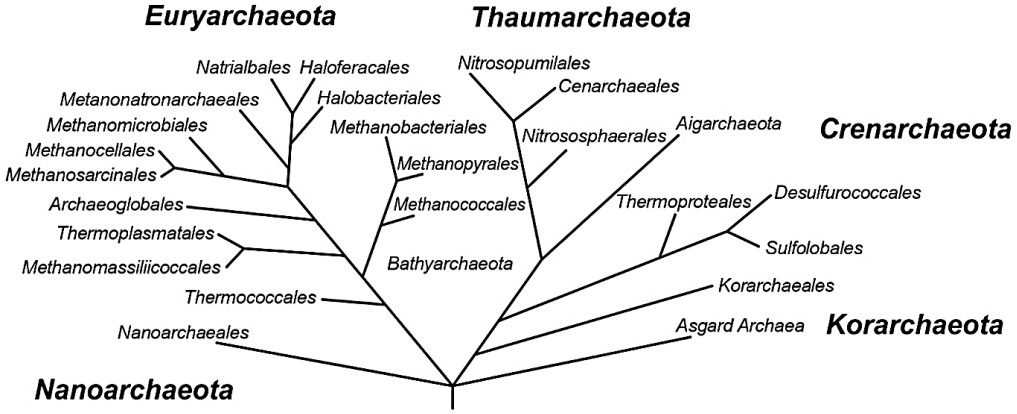


Рис. 3.3. Філогенетичне дерево домену *Archaea*

Домен *Archaea* названий на честь архейського еону, коли життя вперше поширилося на Землі. В археї були високі температури, атмосфера без O_2 і густі токсичні гази покривали Землю. Археї зараз вважаються залишками цієї забутої епохи, оскільки багато їх живе в екстремальних середовищах, таких як вулканічні екосистеми та соляні водойми. Археї займають широкий спектр середовищ існування та виконують важливі біогеохімічні процеси в природі.

Не дивлячись на те, що археї та бактерії мають прокаріотичну клітину, вони значно відрізняються як генетично, так і фізіологічно та багато в чому схожі з еукаріями. Вважається, що клітини архей зробили фундаментальний внесок у походження домену *Eukarya*.

Археї майже такі ж різноманітні як і бактерії, але, зазвичай, їх важко вирощувати в культурі, тому вони менше вивчені. На сьогоднішній день більшість добре охарактеризованих видів архей відносять до двох філумів: *Euryarchaeota* та *Crenarchaeota*. Кілька видів виділено в культуру з філуму *Thaumarchaeota*. В той же час філуми *Korarchaeota* та *Nanoarchaeota* представлені переважно видами, що виявлені за нуклеотидною послідовністю 16S рРНК.

Цей домен характеризується значною фізіологічною різноманітністю. Спільними ознаками всіх архей є характерні ліпіди (у звичайних бактеріальних ліпідах гліцерол пов'язаний складноефірним зв'язком з жирними кислотами, а в архей – простим ефірним зв'язком з C_{20}-спиртом – фітанолом); відсутність пептидоглікану в клітинних стінках та структурно складні РНК-полімерази, що схожі на еукаріотичні, які, ймовірно, були присутні в останньому спільному предку. Археї можуть мати як звичайні бішарові, так і ригідні моношарові мембрани, що містять ізопреноїди. У архей не знайдено типових для бактерій пептидогліканових клітинних стінок. Вони представлені або псевдомуреїном, або білковим S-шаром (структурованим білком, що містить «кислі» амінокислоти).

В архей ДНК пов'язана з гістонами та має інтронні ділянки, подібно до еукаріотів. РНК-полімерази цих організмів більше схожі на еукаріотичні за складом субодиниць. Механізм трансляції не чутливий до хлорамфеніколу (на відміну від бактерій), зате чутливий до дифтерійного токсину (як у еукаріот). Автотрофна фіксація CO_2 в архей відбувається нециклічним шляхом (ацетил-КоА-шлях), тоді як у більшості бактерій – у пентозофосфатному циклі Кальвіна.

Галофільні археї здійснюють фотосинтез, пов'язаний з функціонуванням особливого білка, бактеріородопсину, за багатьма властивостями схожого з родопсином сітківки ока тварин.

Серед архей є як хемоорганотрофи, так і хемолітотрофи. Вони можуть дихати або ферментувати, можуть бути аеробними або анаеробними, використовуючи велику різноманітність донорів і акцепторів електронів. Крім того, вони виробляють метан і є унікальними за фізіологічними властивостями: галофілами, ацидофілами, термофілами та психрофілами. Більшість гіпертермофільних архей виділено з гарячих вод геотермальних джерел, що містять S^o та H_2S і метаболізують сірку тим чи іншим способом.

В Додатку до цього підручника наведена коротка інформація про біологічну різноманітність та характеріологічні особливості основних груп архей.

3.3. Домен *EUKARYA*

Еволюційне дерево еукаріотів, основане на послідовності усього геному, показує наявність супергруп в домені *Eukarya*, що не є офіцій-

ними таксонами, а скоріше групами споріднених філумів: *Archaeplastida*, *Stramenopiles*, *Alveolata, Rhizaria*, *Excavates*, *Amoebozoa* та *Opisthokonta* (рис. 3.4). У домені *Eukarya* всі еволюційні лінії організмів включають мікроорганізми.

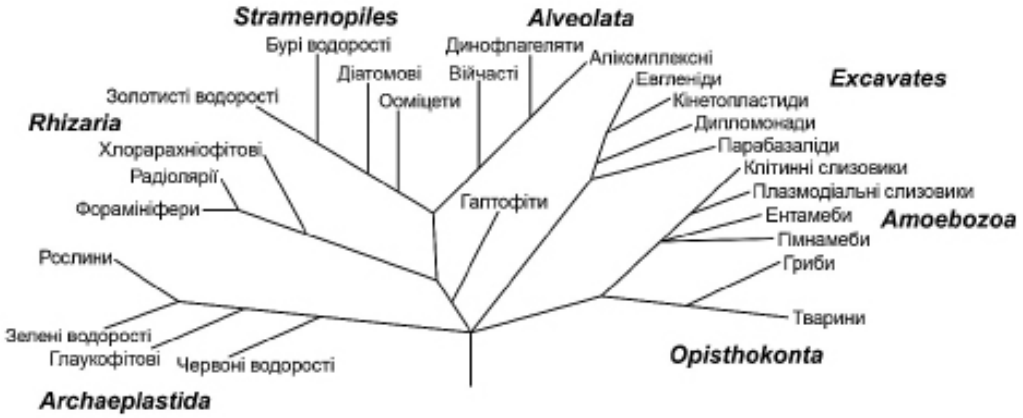


Рис. 3.4. Філогенетичне дерево домену *Eukarya*. Еукаріотичні мікроорганізми представлені в усіх основних еволюційних лініях цього домену (за винятком тварин і рослин)

Archaeplastida включають все царство рослин, а також червоні водорості, зелені водорості та глаукофіти. Ці фототрофні лінії є результатом первинного ендосимбіозу, що привело до утворення хлоропластів.

Супергрупи *Stramenopiles*, *Alveolata, Rhizaria* включають гетеротрофні та фототрофні види різноманітних протист, які мають спільного предка. Їх разом віднесено до клади SAR (акронім ***S****tramenopiles*, ***A****lveolata* та ***R****hizaria*). Ці лінії з'явились у результаті вторинного ендосимбіозу.

Amoebozoa включають багато форм амеб і слизовики, хоча клітини з амебоїдною морфологією зустрічаються в багатьох інших лініях *Eukarya* також.

Нарешті, супергрупа *Opisthokonta* включає відомі царства *Fungi* та *Animalia*. Багато філумів *Eukarya* не потрапляють в ці групи оскільки їх положення на дереві життя залишається поки невизначеним.

Останній спільний предок усіх еукаріотичних клітин був одноклітинним мікроорганізмом, тісно пов'язаним з *Archaea*. Біологи визнали, що еукаріотична клітина є симбіотичною химерою. Придбання мітохондрій було основоположною подією в походженні *Eukarya*. Мітохондрії пішли від бактерій і містять бактеріальну ДНК. Придбання мітохондрій і створення структури еукаріотичної клітини заклали основу для еволюції різноманітних одноклітинних та багатоклітинних організмів.

Фототрофні еукаріоти генерують енергію за рахунок фотосинтезу, що здійснюють хлоропласти. Хлоропласти, як і мітохондрії, були утворе-

ні шляхом первинного ендосимбіозу. У процесі вторинного ендосимбіозу еукаріотична клітина, яка вже мала мітохондрію, придбала фототрофну ціанобактерію як ендосимбіонт. Ці ендосимбіонти набули взаємної залежності від свого еукаріотичного хазяїна та стали обов'язковим її елементом.

Слідом за первинним ендосимбіозом кілька різних груп найпростіших придбали хлоропласти шляхом вторинного ендосимбіозу. Вторинний ендосимбіоз виник, коли клітина, яка вже мала ендосимбіонт, поглиналася другою клітиною-хазяїном. Таким чином багато найпростіших стали фототрофними, придбавши водорості ендосимбіонти, які вже мали хлоропласт.

Мікробні еукаріоти, члени домену *Eukarya*, набагато старші філогенетично та більш різноманітні, ніж їхні макроскопічні родичі. Вони мають обмежений спектр метаболічної різноманітності в порівнянні з прокаріотами та є майже виключно хемоорганотрофами або фототрофами, а більшість – облігатними аеробами. Майже всі *Eukarya* залежать від своїх органел мітохондрій і хлоропластів для генерування енергії. Способи живлення мікробних еукаріотів включають фаготрофію (отримання енергії шляхом споживання інших клітин або детриту), сапротрофію (отримання енергії шляхом поглинання поживних речовин з навколишнього середовища), фототрофію (виробництво енергії зі світла) та/або симбіоз (постійна взаємодія з іншим організмом, яка може бути корисною, коменсальною або паразитичною).

Найпростіші зустрічаються в усіх філогенетичних лініях *Eukarya* та зазвичай є фаготрофами. Водорості є також одноклітинними еукаріотами, які здійснюють фотосинтез, а гриби – нефототрофними еукаріотичними мікроорганізмами з клітинною стінкою, побудованою з хітину. Гриби утворюють єдину філогенетичну групу, до якої входять дріжджі, цвілі та інші гриби, що демонструють сапротрофність і/або симбіотичний спосіб життя, часто пов'язаний із розкладанням, переважно аеробно, органічних сполук.

Усіх еукаріотів об'єднує те, що їхні клітини поділені мембранами на комірки – справжні органели. Конструктивна складність еукаріотичної клітини дозволила членам домену *Eukarya* набути в процесі еволюції величезну морфологічну різноманітність.

На основі висновків, зроблених у результаті молекулярно-філогенетичних досліджень, підтверджених відкриттями мікрофосилій, видається ймовірним, що основне філогенетичне розходження в еукаріотичній еволюції відбулося досить рано. Ймовірно, це було викликано ендосимбіотичним придбанням мітохондрій – фундаментальної події в еволюції еукаріотичної клітини.

Усі існуючі еукарії містять мітохондрії, гомологічні мітохондріям структури або якісь генетичні сліди цих структур. Що сприяло цій первинній ендосимбіотичній події – невідомо, але цілком можливо, що це

було накопичення O_2 в атмосфері в результаті фотосинтезу ціанобактерій. Мітохондрії могли покращити здатність ранньої еукаріотичної клітини генерувати енергію та надати еукаріотам значну перевагу над анаеробними конкурентами.

Дещо пізніше між еукаріотичними клітинами та ціанобактеріями відбулася інша первинна ендосимбіотична подія, яка породила перші водорості. За цією подією послідувала серія вторинних ендосимбіозів, що створили різноманітність відомих сьогодні фототрофних еукаріотів.

Ендосимбіоз явно мав важливе значення в еволюції еукаріотів, і отримання мітохондрій первісними еукаріями мало центральне значення для еволюційного успіху представників цього домену. Однак деякі паразитичні мікробні еукаріоти такі як лямблії та мікроспоридії втратили їх, ймовірно, через повернення до анаеробного способу життя. Однак геноми амітохондріальних еукаріот зберігають деякі гени мітохондріального походження. Це є переконливим доказом того, що їх предки колись мали мітохондрії.

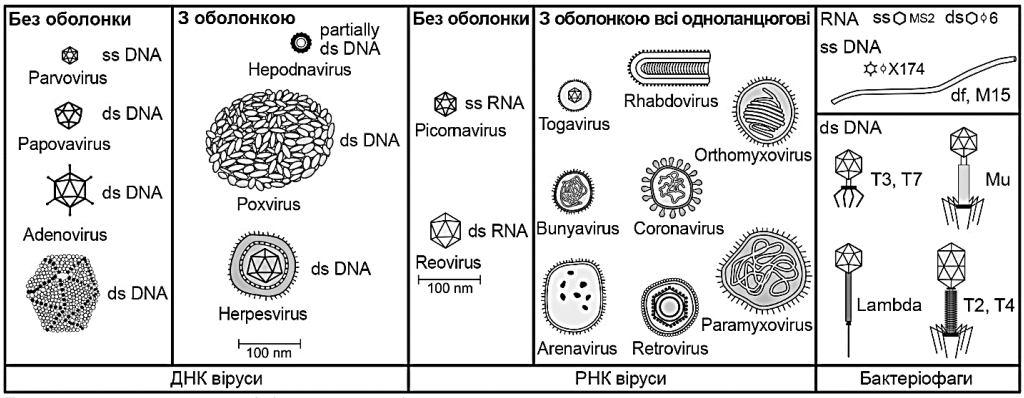
Дерево домену *Eukarya* також демонструє, як вторинні ендосимбіози пояснюють походження хлоропластів у деяких одноклітинних фототрофних еукаріотів. Після первинного ендосимбіозу ціанобактеріального предка хлоропластів з ранніми еукаріотами, що містять мітохондрії, ці, тепер уже фототрофні еукаріоти розійшлися на червоні та зелені водорості.

Потім, у вторинних ендосимбіозах предки евгленід, кінетопластид і хлорарахніофітів симбіотично поглинули зелені водорості, тоді як предки альвеолят і стрематопілів поглинули червоні водорості. Ці вторинні ендосимбіози пояснюють велику філогенетичну різноманітність фототрофних еукаріотичних мікроорганізмів.

Коротку інформацію про біологічну різноманітність та характерологічні особливості основних груп еукаріотичних мікроорганізмів наведено в Додатку до цього підручника.

3.4. Царство *VIRA*

Віруси – це неклітинні біологічні агенти, які демонструють багато властивостей клітин за винятком того, що вони обов'язково потребують клітини-хазяїна для розмноження. Віруси дуже різноманітні. Усі клітинні організми мають свої віруси. Вірус – це генетичний елемент, який може розмножуватися лише всередині живої клітини-хазяїна. Вірусам необхідна клітина як репродуктивна машина для свого відтворення, тому вони є облігатними внутрішньоклітинними паразитами. Однак віруси мають власні геноми та в цьому сенсі не залежать від геному хазяїна. На відміну від клітин, геноми яких складаються з дволанцюгової ДНК, віруси мають геноми з ДНК або РНК, що можуть бути дволанцюговими або одноланцюговими. Хоча віруси не мають клітинної будови, їхні геноми кодують функції, необхідні для розмноження. Вони мають складну структурну організацію, що називається віріоном (рис. 3.5).



Позначення: ss - одноланцюгові, ds - дволанцюгові

Рис. 3.5. Форма вірусів хребетних та бактерій. Позначення: ss – одноланцюговий геном, ds – дволанцюговий геном

Віріон містить геном віруса (РНК чи ДНК), вкритого білковим капсидом. Більшість вірусів тварин мають зовнішню оболонку – подвійний фосфоліпідний шар, що сформований з мембрани клітини-хазяїна. Капсид і фосфоліпідна оболонка виконують захисну функцію, коли вірус знаходиться поза клітиною, а білки на поверхні віріону важливі для адгезії та проникнення в клітину-хазяїна. Віріон також може містити кілька вірусоспецифічних ферментів, що виконують певну функцію під час інфікування та реплікації.

Потрапивши в клітину-хазяїна, вірусний геном починає керувати репродуктивним апаратом клітини двома різними шляхами. Вірус може розмножуватися і знищувати хазяїна у вірулентній інфекції через літичний шлях. При літичній інфекції, вірус перенаправляє метаболізм клітини на синтез вірусних компонентів і збирання нових віріонів, що вивільняються з клітини та можуть інфікувати нові клітини.

Інші віруси можуть викликати лізогенну інфекцію. У цьому випадку геном віруса вбудовується в геном клітини-хазяїна, стає його складовою, а при поділі клітини передається дочірнім клітинам. За певних умов геном віруса вивільнюється з геному клітини, після чого починається процес синтезу структурних елементів та формування нових віріонів, які виходять з клітини і починається новий лізогенний цикл репродукції віруса.

Віруси інфікують клітини всіх трьох доменів життя – *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya*. Віруси, що заражають бактерії, називають бактеріофагами або фагами (рис. 3.5). Бактеріофаги використовують як модельні системи для дослідження багатьох аспектів біології вірусів та для терапії інфекцій, викликаних резистентними до антибіотиків «супербактеріями». Віруси класифікують за морфологією, типом симетрії та структурою віріонів, типом нуклеїнової кислоти, стратегією вірусного геному, спектром сприйнятливих хазяїв.

Хоча більшість вірусів значно менша за бактеріальні клітини, існують також надзвичайно великі віруси, такі як пандоравіруси, що більше одного мікрометра в довжину і мають геном (до 2500 генів) більший, ніж у багатьох бактерій.

Універсальне дерево життя не містить вірусів, які хоча демонструють деякі властивості клітин, але не є клітинами. У них відсутні рибосоми, а отже, і рибосомна РНК, за послідовністю нуклеотидів якої можна було б розмістити віруси на філогенетичному дереві.

Питання, коли вперше з'явилися віруси на Землі та їх зв'язок із клітинами залишається не з'ясованим. У вірусів дуже мало генів і не існує універсально консервативних спільних генів, на порівнянні яких можливо створити дерево життя. Ймовірно, що віруси мають кілька ліній походження та еволюціонували незалежно один від одного протягом історії життя.

Віруси мало чим відрізняються від мобільних елементів ДНК, таких як плазміди та транспозони. Ці елементи були названі «егоїстичною ДНК», оскільки вони реплікуються незалежно від хромосоми хазяїна та містять гени, що забезпечують їх передачу між клітинами, мають різних хазяїнів і не беруть прямої участі в функціонуванні клітини. Основні відмінності між вірусами та мобільними ДНК полягають у тому, що віруси, зазвичай, швидше реплікуються, часто призводять до загибелі клітини-хазяїна, а вірусна ДНК укладається в білковий капсид.

Крім вірусів існують два типи субвірусних інфекційних агентів – віроїди, які мають РНК, але не мають білка, та пріони – білкові агенти, що не мають нуклеїнової кислоти.

Вірóїди – це інфекційні агенти, які являють собою низькомолекулярну, висококомплементарну одноланцюгову молекулу РНК, замкнену в кільце, що може утворювати дволанцюгову структуру шляхом внутрішньоланцюгового спаровування нуклеотидів у формі шпильки з закритими кінцями (рис. 3.6). Це робить віроїд достатньо стабільним для існування поза клітиною-хазяїном і захищає його всередині клітини від клітинних рибонуклеаз.

Рис.3.6. Структура віроїду

На відміну від вірусів віроїди не мають білкової оболонки. Більшість віроїдів містить від 246 до 399 нуклеотидів, що набагато менше, ніж у вірусів, і демонструють значний ступінь гомології послідовностей один до одного, що свідчить про їх спільне еволюційне коріння.

Послідовності нуклеотидів віроїдів не кодують власних білків. Можливо, копіювання віроїдної РНК здійснюється РНК-полімеразами кліти-

ни-хазяїна. Деякі віроїди реплікуються в ядрі клітини, інші – в хлоропластах. Найкраще вивчені віроїди кокосового каданг-каданг (246 нуклеотидів) і бульб картоплі (359 нуклеотидів).

Віроїди спричиняють такі захворювання рослин як карликовість хризантем, веретеноподібність бульб картоплі, плямистість авокадо тощо. Оскільки в віроїда відсутній капсид, він не має відповідних рецепторів для адгезії та проникнення в клітину-хазяїна. Замість цього віроїд потрапляє в рослинну клітину через рану, наприклад, завдяки комахам або через інші механічні пошкодження. РНК віроїдів має рибозимну (каталітичну) активність, але не кодує власні білки, тому процес реплікації віроїда повністю залежить від хазяїна.

Віроїди значно впливають на світове сільське господарство, оскільки спричиняють захворювання економічно важливих культурних і декоративних рослин. На цей час невідомі віроїди, які б інфікували тварин та мікроорганізми.

Пріони – це інфекційні агенти, які є білками з аномальною третинною структурою. Вони не містять нуклеїнових кислот. У певному сенсі пріони подібні до вірусів, оскільки здатні збільшувати свою чисельність, використовуючи ресурси клітини. Разом з тим для їх розмноження не потрібні ДНК або РНК. Пріонні білки тварин і людини утворюються з нормальних клітинних білків, що асоційовані з оболонкою нервових волокон.

Просторова структура цих білків може аномально змінюватися. Як правило, під час переходу білка з нормального стану в пріонний, його α-спіралі перетворюються на β-структуру. Унаслідок цього білок набуває каталітичної активності й каталізує перетворення дедалі більшої кількості нових нормальних білків на пріонні. Таким чином, запускається ланцюгова реакція й утворюється безліч неправильно згорнутих білків, що накопичуються в клітині та формують відкладення – амілоїди. Уражені амілоїдами тканини втрачають нормальну структуру й відмирають.

У ссавців пріонні захворювання вражають нервову тканину, переважно головний мозок. Вони спричиняють невиліковний стан – губчасту енцефалопатію (коров'ячий сказ у великої рогатої худоби, скрейпі в овець), хронічне виснаження оленів і лосів, що призводить до смерті. У людини відомі такі пріонні захворювання як хвороба Крейтцфельда-Якоба і куру.

Окрім трансмісивних губчастих енцефалопатій амілоїди також пов'язані з виснажливими захворюваннями людини, такими як хвороба Альцгеймера, Хантінгтона, Паркінсона та діабет 2 типу. Допоки не зрозуміло, чи ці захворювання дійсно є пріонними. Пріонні хвороби рослин до цього часу невідомі.

Пріони були виявлені в дріжджів. Деякі гриби мають білки, що відповідають пріонному визначенню, хоча ці білки не викликають помітних захворювань. Натомість вони пристосовують клітини гриба до динамічних

умов навколишнього середовища шляхом зміни їх здатності до використання поживних речовин, підвищення стійкості до антибіотиків і утворення біоплівки. Наприклад, у дріжджів пріон є білком, який регулює транскрипцію генів, що кодують певні функції метаболізму азоту.

Людина також має корисні пріони. Білок MAVS, що є частиною нашої вродженої імунної системи, перетворюється на самозбережену пріоноподібну форму в клітинах, інфікованих вірусом. Агрегація білка MAVS запускає виробництво імуномодуляторів – інтерферонів. Ці білки викликають залучення фагоцитуючих клітин, таких як макрофаги (клітини, які поглинають і знищують патогени, сторонні частки та залишки клітин) та інші імунні чинники, що призводить до руйнування інфікованої вірусом клітини. В кінцевому підсумку це запобігає захопленню вірусом молекулярного механізму клітини та не дозволяє вірусу заразити сусідні клітини.

Питання для самостійного контролю

1. У яких доменах представлені прокаріоти?
2. Назвіть основні відмінності еукаріотів і прокаріотів.
3. Які основні філуми домену *Archaea*?
4. Назвіть основні філуми домену *Bacteria.*
5. Назвіть подібні та відмінні риси архей та бактерій, архей та еукарій.
6. Які групи мікроорганізмів вважаються найдрівнішими?
7. Назвіть філум домену *Bacteria*, що складається лише з облігатних внутрішньоклітинних паразитів.
8. Для представників якого філуму домену *Bacteria* особливе значення мають хемотаксономічні ознаки?
9. Які основні еволюційні лінії організмів у домені *Eukarya* включають мікроорганізми?
10. Опишіть які еволюційні події призвели до появи мітохондрій та хлоропластів і походження еукаріотичної клітини.
11. Охарактеризуйте стратегії живлення, що використовують протисти.
12. Порівняйте метаболічну різноманітність еукаріотів і прокаріотів.
13. Чому віруси не можна розмістити на філогенетичному дереві життя?
14. Охарактеризуйте відмінності прокаріотів і вірусів.
15. Опишіть особливості віроїдів і пріонів.
16. За якою ознакою пріони можна відрізнити від інших інфекційних агентів?
17. Чим пріон відрізняється від віроїду, а віроїд – від вірусу?

РОЗДІЛ 4
ФУНКЦІОНАЛЬНА АНАТОМІЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ

Мікроорганізми – це велика збірна група одноклітинних організмів, які мають мікроскопічні розміри, що варіюють у широкому діапазоні (рис. 4.1). Розміри клітин більшості прокаріотів знаходяться в межах 0,1–10,0 мкм. Серед них є «карлики» (мікоплазми, нанобактерії) з розміром приблизно 0,05–0,10 мкм та «гіганти» (*Achromatium*, *Macromonas*) довжиною до 100 мкм. Найбільшими з виділених до цього часу прокаріотів є клітини *Epulopiscium fishelsoni*, що мешкають в кишечнику глибоководної риби-хірурга, довжиною до 600 мкм та діаметром до 100 мкм, і *Tiomargarita namibiensis* діаметром 400–600 мкм.

Рис. 4.1. Шкала відносних розмірів макро- і мікроорганізмів

Отже, можна дійти висновку, що розміри відомих прокаріотичних мікроорганізмів перебувають у межах від 0,05 до 600 мкм. У той же час еукаріотичний мікроорганізм морська водорость *Nanochlorum eukariotum* (табл. 4.1), незважаючи на дуже малі розміри (1,0–2,0 мкм), має справжнє ядро, хлоропласти та мітохондрії.

Таблиця 4.1

Розміри окремих представників живого світу

Мікроорганізм	Розмір, мкм
Поксвіруси	Ø ~ 0,05
Нанобактерії	Ø< 0,05
Мікоплазми	Ø ~ 0,3
Nanochlorum eukaryotum	Ø ~ 1,0–2,0
Escherichia coli	1,1 × 6,0
Спірохети	1,5 × 50,0
Oscillatoria sp.	Ø ~ 7,0
Epulopiscium fishelsoni	100 × 600
Thiomargarita namibiensis	Ø ~ 600

Морфологія прокаріотів. Форми клітин прокаріотів не відрізняються великою різноманітністю (рис. 4.2). Зазвичай, це палички різної довжини, сферичні клітини (коки), а також звивисті форми – вібріони та спірили. Клітини бактерій можуть утворювати досить стійкі об'єднання: пари паличок та коків (диплококи), ланцюжки паличок та коків (стрептококи), тетради та пакети з декількох кокоподібних клітин (сарцини), форми ґрони винограду (стафілококи), розетки, плоскі таблички, сітки та трихоми (ланцюжки клітин, які тісно розташовані одна до одної, прямі і розгалужені).

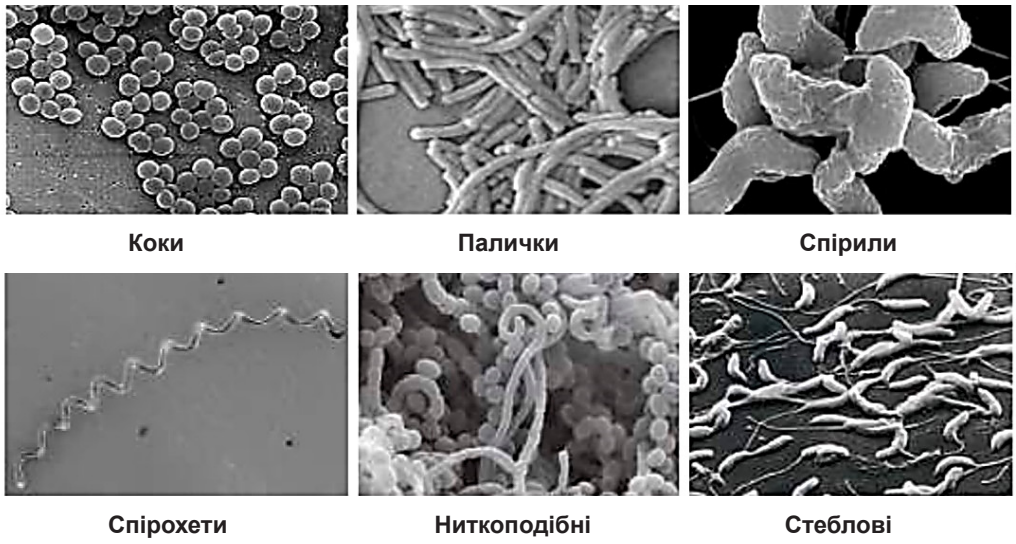


Рис. 4.2. Клітини бактерій різних морфологічних форм

У той же час існують мікроорганізми незвичайної форми (квадратні, прямокутні, бобоподібні, зірчасті, тарілкоподібні), розгалужені, такі, що утворюють міцелій (актиноміцети), мають гіфи з бруньками (*Hyphomicrobium*), стеблинки (*Galionella*), простеки (*Campylobacter*). Існують бактерії, що змінюють свою морфологію протягом життєвого циклу (*Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia*) і володіють плейоморфізмом (різні морфологічні форми).

Оскільки як прокаріотичні, так і еукаріотичні мікроорганізми – це переважно одноклітинні організми, то їх диференціація полягає власне у структурній організації їх клітин (табл. 4.2). Будь-яка клітина складається з цитоплазми та ядерного матеріалу, які відділені від навколишнього середовища клітинною мембраною (КМ).

Вчення про два морфотипи – еукаріотичний і прокаріотичний – виходить в першу чергу з того, що в еукаріотичній клітині є морфологічно

оформлене ядро. Однак ядро не є єдиною ознакою, за якою прокаріоти та еукаріоти відрізняються один від одного. Основна відмінність цих двох типів клітин полягає у поділі клітин еукаріотів ендомембранами на комірки, названі компартментами, що мають спеціалізовані функції та називаються органелами.

Крім ядра в клітинах еукаріотів є лізосоми, вакуолі, апарат Гольджі, ендоплазматичний ретикулум, мікротрубочки, мікрофіламенти, а також мітохондрії та протопласти, які насправді є ендосимбіонтними прокаріотами. Головною з органел є ядро (хромосома чи хромосоми) оточене подвійною мембраною на відміну від прокаріотичної клітини, у якої ядерний апарат розташований дифузно в цитоплазмі. У ДНК прокаріотів на відміну від еукаріотів рідко зустрічаються інтрони – ділянки ДНК, що є частиною гену, але на відміну від екзонів, вони не кодують послідовність амінокислот білка. В еукаріотів практично відсутні позахромосомні ДНК – плазміди.

Таблиця 4.2

Основні відмінності між про- та еукаріотичними мікроорганізмами

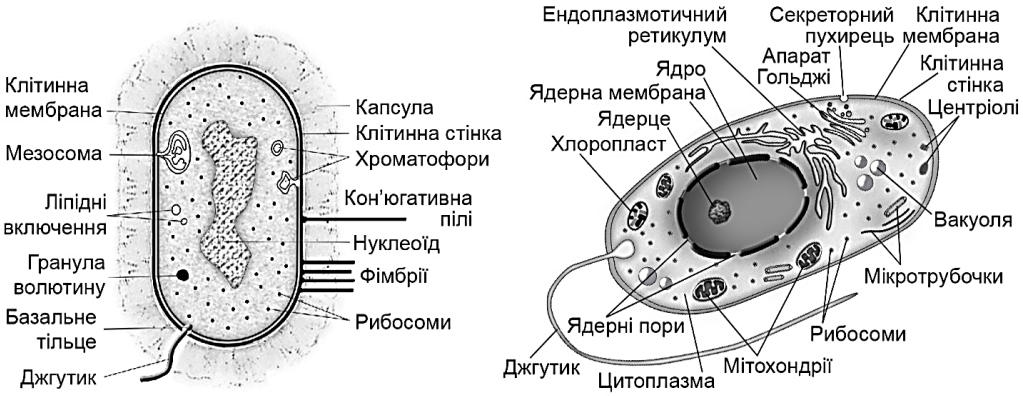
Ознака	Прокаріоти	Еукаріоти
Число хромосом	1	>1
Мітоз	-	+
Ядро	-	+/-
Мітохондрії	-	+/-
Протопласти	-	+/-
Лізосоми	-	+/-
Апарат Гольджі	-	+/-
Вакуолі	-	+/-
ЕПР	-	+/-
ДНК в органелах	-	+/-
Рибосоми	70S	80S
Рух цитоплазми	-	+/-

Ендомембранні структури рідко зустрічаються в прокаріотів. Крім того, рибосоми в еукаріотів більші за розміром (80S) від прокаріотів (70S). У прокаріотів відсутні також процеси поділу клітин шляхом мітозу та мейозу.

Необхідно відзначити, що в структурно-функціональному відношенні прокаріоти не простіші за еукаріоти, вони «інші».

4.1. Структури прокаріотичної клітини та їх функції

Компартменталізація прокаріотичних клітин значно менш виражена, ніж у еукаріотичних клітин. ДНК не оточена ядерною мембраною і розташовується дифузно в цитоплазмі (рис. 4.3), а органели типу мітохондрій



4.3. Будова прокаріотичної та еукаріотичної клітин

та хлоропластів у них відсутні. У багатьох бактерій вп'ячування клітинної мембрани утворюють певні структури у внутрішньому просторі протопласта (внутрішньоклітинні мембрани), що переважно виконують енергетичні функції. З клітинною мембраною прокаріотів також пов'язані процеси дихання чи фотосинтезу, що забезпечують клітину енергією, тобто функції, за які в клітинах еукаріотів відповідальні мембрани мітохондрій та хлоропластів.

4.1.1. Клітинна мембрана

Клітинна (цитоплазматична) мембрана – це саме той обов'язковий структурний елемент, який власне фізично відділяє цитоплазму з її компонентами від навколишнього середовища, визначає межі та функціонально забезпечує існування клітини (рис. 4.4). Вона становить залежно від виду бактерій 8–15% сухої маси клітини. Хімічний склад її представлений білково-ліпідним комплексом, у якому білки складають 50–75%, ліпіди – 15–50%, та невеликою кількістю вуглеводів. Головним ліпідним компонентом мембрани є фосфоліпіди. Білкова фракція клітинної мембрани представлена білками, що мають ферментативну активність. Так, у клітинній мембрані бактерій *Escherichia coli* міститься близько 120 різних білків.

Мембрани прокаріотів на відміну від еукаріотів багаті на білки, містять незвичайні жирні кислоти і, переважно, не мають стеринів. Загалом клітинна мембрана прокаріотів як і еукаріотів побудована за рідинно-мозаїчною моделлю. За своєю структурою мембрана – це подвійний шар ліпідів

(рис. 4.4). Гідрофобні «кінці» молекул фосфоліпідів та тригліцеридів спрямовані всередину, а гідрофільні «головки» – назовні. Завдяки такій будові клітинна мембрана володіє унікальною властивістю – напівпроникністю. Вона проникна для води та низькомолекулярних речовин, але не проникна для іонізованих сполук.

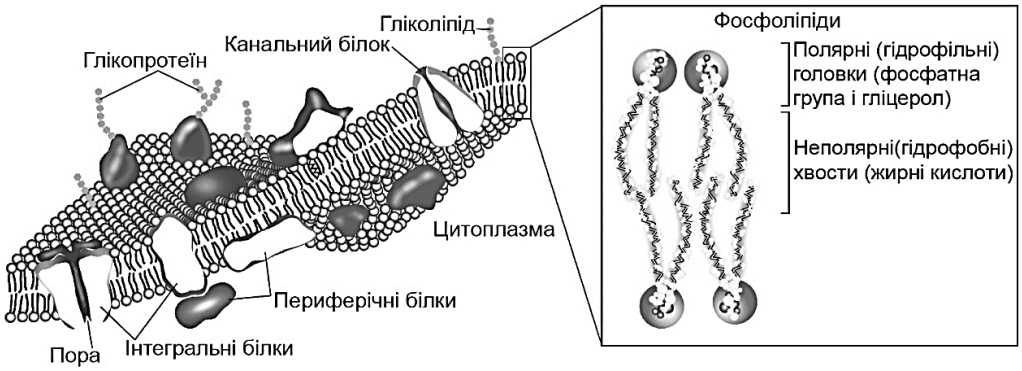


Рис. 4.4. Мозаїчна модель структури клітинної мембрани бактерій

Клітинна мембрана виконує низку життєво необхідних для клітин мікроорганізмів функцій. Вона забезпечує транспорт необхідних речовин усередину клітини та вихід продуктів метаболізму назовні за рахунок спеціалізованих транспортних систем та ферментів пермеаз, які локалізуються в мембрані та регулюють потоки поживних речовин і метаболітів. У подвійний шар ліпідів вбудовано активні білкові молекули (рис. 4.4). До них відносяться НАД·H_2-дегідрогенази, елементи електронтранспортної системи (цитохроми, залізосірчані білки та ін.), які формують градієнт протонів на клітинній мембрані, білки АТФ-азного комплексу, через який по градієнту здійснюється переміщення протонів та синтезується АТФ, а також білки базального тіла джгутика, які забезпечують його обертання за рахунок переміщення протонів.

4.1.2. Мембрани архей

Клітинна мембрана архей за будовою подібна до бактерій і еукарій, але хімічний склад у неї дещо інший. У ліпідах бактерій і еукарій гідрофобні жирнокислотні хвости зв’язані з гліцерином складноефірними зв’язками, а ліпіди архей мають гідрофобні ізопреноїдні (а не жирнокислотні) хвости, що зв’язані з гліцерином ефірними зв’язками.

Незважаючи на відмінності в хімічному складі між клітинними мембранами архей і інших організмів, фундаментальна конструкція їх однакова у всіх клітин. Очевидно, еволюція вибрала цю конструкцію як найкращу для виконання основних функцій клітинної мембрани.

4.1.3. Внутрішньоцитоплазматичні мембрани

Клітини деяких прокаріотів, що належать до різних таксономічних груп, мають мембрани, які утворюються при вп'ячуванні клітинної мембрани в цитоплазму (так звані мезосоми) та іноді можуть відділятися від неї. Деякі прокаріоти мають внутрішні мембранні системи, відмінні від мезосом. Розвинена мережа внутрішньоцитоплазматичних мембран характерна для фототрофних прокаріотів, нітрифікуючих та метанокиснюючих бактерій. У нітрифікуючих бактерій *Nitrobacter, Nitrosomonas* і *Nitrosococcus* є стоси ламел (рис. 4.5), що складаються з паралельно розташованих плоских стопок.

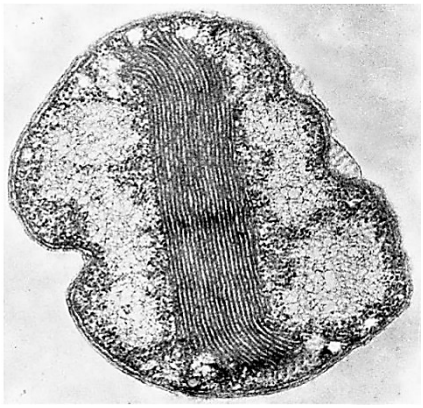


Рис. 4.5. Стос внутрішньоклітинних мембран нітрифікуючої бактерії *Nitrosococcus oceani*

Особливо багаті на внутрішньоклітинні мембрани фототрофні пурпурові бактерії. Фотосинтетичні внутрішні мембранні системи мають вигляд трубок, бульбашок або стопок. Фотосинтетичні мембрани подібні до будови та хімічного складу клітинної мембрани, але, крім того, містять пігменти, що поглинають світло (бактеріохлорофіли та каротиноїди), а також компоненти фотосинтетичного електронтранспортного ланцюга (цитохроми, хінони) та фосфорилювальної системи. Деякі клітини утворюють газові вакуолі (аеросоми), оточені білковою мембраною, що виконують у водних організмів роль регуляторів плавучості.

Внутрішні мембранні структури часто пов'язані з клітинною мембраною та виникають з неї шляхом інвагінації. Вони більш збагачені білками та іншими молекулами, що беруть участь в генерації енергії. Внутрішні мембрани з вмонтованими в них ферментами за рахунок збільшення площі поверхні забезпечують клітині більшу метаболічну активність.

4.1.4. Клітинна стінка бактерій

У цитоплазмі прокаріотів зберігається висока концентрація розчинених речовин, що створює в клітині значний осмотичний тиск – біля 2 атм.

Це приблизно стільки ж, скільки тиск в автомобільній шині. Цього осмотичного тиску достатньо, щоб клітинна мембрана лопнула і клітина лізувалась. Клітини більшості бактерій і архей витримують цей тиск тургору завдяки клітинній стінці, що розташована зовні цитоплазматичної мембрани. Окрім захисту від осмотичного лізису, клітинна стінка також визначає форму та жорсткість клітини.

Прокаріоти за будовою клітинної стінки розділені на чотири основні групи: *Gracilicutes* – бактерії з грамнегативною клітинною стінкою; *Firmicutes* – бактерії з грампозитивною клітинною стінкою; *Tenericutes* – бактерії, позбавлені клітинних стінок; *Mendosicutes* – археї, клітинні стінки яких відрізняються за будовою від відповідних структур бактерій.

Назви двох типів найпоширеніших бактерій – грампозитивні ($Гр^+$) та грамнегативні ($Гр^–$) засновані на їх реакціях на забарвлення за методом Грама (датський мікробіолог Ганс Грам), що визначається організацією та структурою клітинної стінки. Клітинна стінка $Гр^+$ зазвичай має товстий шар муреїну, тоді як у $Гр^–$ – тонкий шар муреїну, за яким розташована зовнішня мембрана, а між клітинною мембраною та шаром пептидоглікану – периплазматичний простір.

Основою клітинної стінки бактерій є пептидоглікан – полісахарид, який надає структурну міцність клітині. Пептидоглікан міститься в усіх бактеріях, які мають клітинну стінку. Він унікальний для бактерій і не зустрічається в архей чи еукарій. Каркас пептидоглікану формується з структурного блоку, який складається з двох модифікованих залишків глюкози – N-ацетилглюкозаміна та N-ацетилмурамової кислоти, з'єднаних *β*-1,4 зв'язком (рис. 4.6). До залишку N-ацетилмурамової кислоти приєднується короткий бічний ланцюг пептиду.

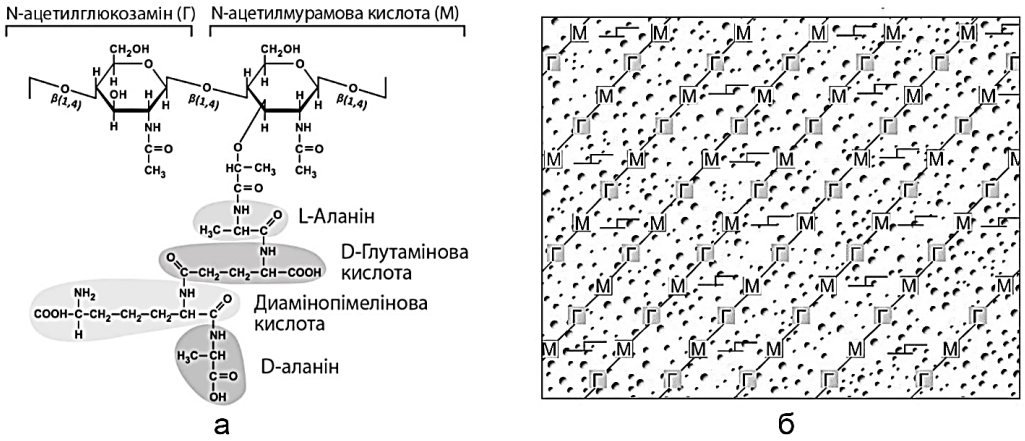


Рис. 4.6. Структурна одиниця пептидоглікану *Escherichia coli* (а) та схема фрагменту мережі пептидоглікану, що утворюється навколо клітини (б)

Амінокислотний склад цього пептиду може значно змінюватися в бактерій різних видів. У *Escherichia coli* він містить амінокислоти *L*-аланін, *D*-аланін, D-глутамінову кислоту та диамінопімелінову кислоту (ДАП), хоча в інших бактерій *L*-лізин може замінити ДАП. Наявність *D*-стереоізомерів амінокислот *D*-аланіну і *D*-глутамінової кислоти є специфікою пептидоглікану, оскільки відомо, що білки завжди побудовані з *L*-амінокислот. Ці компоненти з'єднані впорядкованим чином, утворюючи гліканový тетрапептид (рис. 4.6), та формують довгі ланцюги цієї структурної одиниці пептидоглікану, що з'єднані *β*-1,4 зв'язком.

Ланцюги пептидоглікану розташовуються паралельно один одному навколо клітини. Тетрапептиди суміжних ланцюгів пептидоглікану з'єднуються між собою ковалентними пептидними зв'язками. Таким чином навколо клітини утворюється багатошарова мережа з однієї величезної молекули пептидоглікану. У грамнегативних бактерій поперечні зв'язки утворюються переважно між аміногрупою ДАП на одному пептидоглікановому ланцюгу та карбоксильною групою кінцевого *D*-аланіну на сусідньому ланцюзі.

Клітинна стінка $Гр^+$ бактерій містить шар пептидоглікану товщиною від 20 до 35 нм, що набагато товщий, ніж у $Гр^-$ бактерій (рис. 4.7). Пептидоглікан може складати до 90% маси клітинної стінки $Гр^+$ бактерій. Стінка

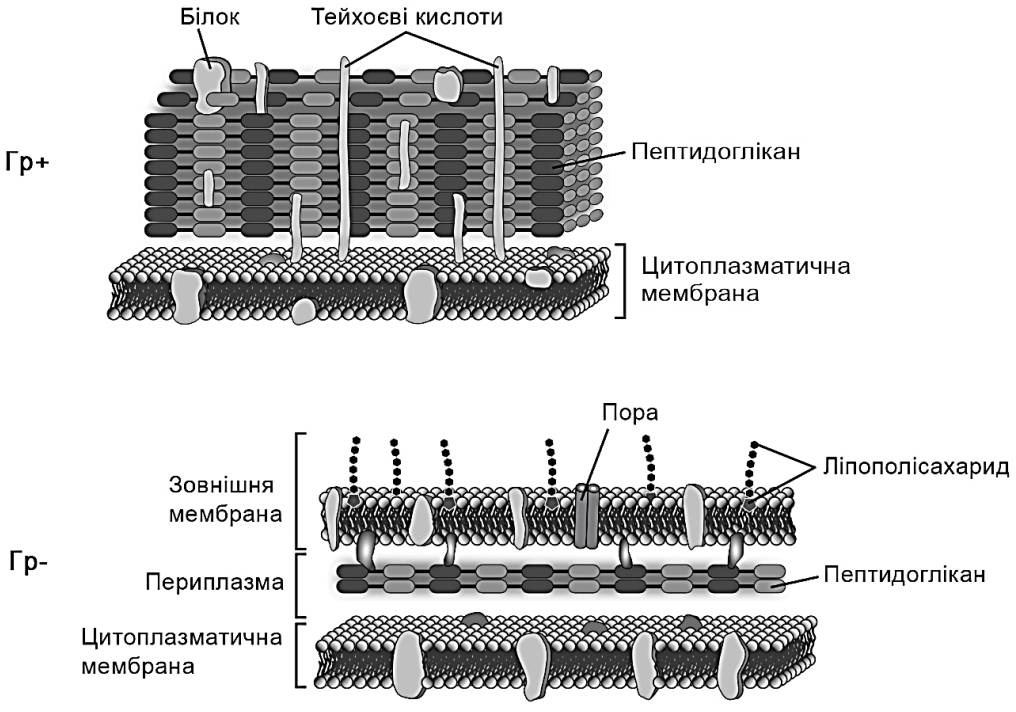


Рис. 4.7. Клітинна стінка грампозитивних і грамнегативних бактерій

грампозитивної клітини може мати 15 і більше шарів, які стабілізуються тривимірно за допомогою пептидних перехресних зв'язків, що утворюються між сусідніми нитками пептидоглікану як по горизонталі, так і по вертикалі. Специфічним компонентом грампозитивних бактерій є тейхоєві кислоти, що скріплюють шар пептидоглікану та зв'язують клітинну стінку з цитоплазматичною мембраною.

Клітинна стінка Гр⁻ бактерій має товщину 2–7 нм і складається переважно з одного або декількох шарів пептидоглікану. Утворена таким чином пептидогліканова сітка є гнучкою і пористою, але досить міцною, щоб протистояти тиску тургору та запобігати розриву клітинної мембрани та лізису клітини.

Значну частину клітинної стінки Гр⁻ бактерій займає зовнішня мембрана, яка розташована зовні за шаром пептидоглікану. Зовнішня мембрана (ЗМ) притаманна для грамнегативних бактерій та розташована в клітинній стінці зовні за шаром муреїну (рис. 4.7). Порівняно з клітинною мембраною зовнішня мембрана має значно асиметричний подвійний шар ліпідів, у якому внутрішній шар складається з фосфоліпідів, а зовнішній – з ліпополісахаридів. За будовою вона має типову організацію, характерну для елементарної мембрани. Основним компонентом ЗМ є ліпіди, що становлять у середньому 22% сухої маси клітинної стінки. Вона виконує як механічні, так і фізіологічні функції.

Зовнішня мембрана є відносно проникною для малих молекул завдяки білкам поринами. Вони функціонують як гідрофільні пори для входу і виходу розчинених низькомолекулярних речовин. Порини специфічні для зовнішньої мембрани бактерій. Вони складаються з трансмембранних білків, що формують канали, через які можуть дифундувати вода та низькомолекулярні незаряджені сполуки.

Зовнішня мембрана на відміну від клітинної мембрани крім фосфоліпідів та білків містить молекули полісахаридів, що ковалентно зв'язані з ліпідами, так звані ліпополісахариди (рис. 4.8). Молекули ліпополісахаридів (ЛПС) мають кілька функцій: вони можуть брати участь у розпізнаванні

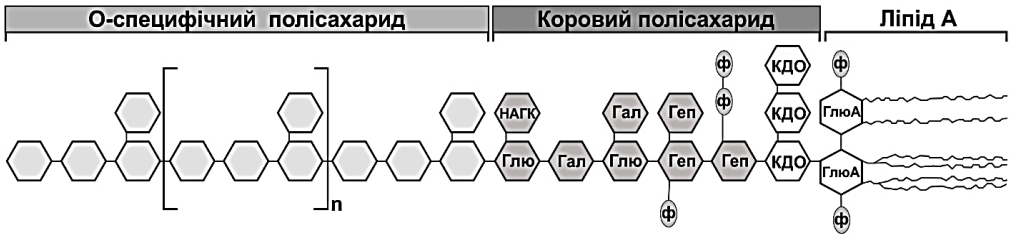


Рис. 4.8. Будова бактеріального ліпополісахариду: КДО – кетодезоксиоктонат; Геп – гептоза; Глю – глюкоза; Гал – галактоза; НАГК – N-ацетилглютамова кислота; ГлюА – глюкозамін; Ф – фосфат. Глюкозамін і жирні кислоти ліпіду А пов'язані через амінні групи глюкозаміну

та адгезії; є важливими факторами вірулентності для деяких бактеріальних патогенів; сприяють механічній міцності клітини. Важлива відмінність зовнішньої мембрани від клітинної полягає в наявності поринів, які є трансмембранними білками, що забезпечують неспецифічний транспорт розчинених речовин. Зовнішня мембрана набагато більш проникна для сполук, ніж клітинна мембрана.

Основним компонентом ЗМ є ліпополісахариди, крайні О-ланцюги яких є антигенами. ЛПС зовнішньої мембрани ентеробактерій, наприклад, містить три структурні частини: 2-кето-3-дезоксиоктулозонат-ліпід А (КДО-ліпід А) – унікальний гліколіпід, що фіксує молекулу у структурі ЗМ, центральний олігосахаридний регіон та периферійні ланцюги О-антигенів. О-антигени містять довгі молекули полісахаридів, що складаються з повторюваних олігосахаридних одиниць, які містять дезокси-, дидезокси- і аміноцукри, відповідальні за імунологічні особливості бактерій.

Хімічна структура ліпіду А та полісахаридів може відрізнятися серед грамнегативних бактерій, але коровий полісахарид зазвичай незмінний. О-специфічні полісахариди є дуже різноманітні серед видів бактерій. Склад, структура та імуноспецифічність ЛПС широко варіює всередині родів і становить основу серологічного типування штамів. Деякі з них є ентеротоксинами.

Важливою біологічною активністю ЛПС є його токсичність для людини та тварин. Грамнегативні збудники для людини включають види *Salmonella, Shigella, Escherichia* та багато інших, які передаються через заражені харчові продукти. Токсичність їх пов'язана з ЛПС, зокрема, з ліпідом А. Деякі ендотоксини викликають сильні симптоми, включаючи газоутворення, діарею та блювоту.

Між клітинною мембраною та зовнішньою мембраною знаходиться периплазма – простір близько 15 нм, в якому знаходяться активні позаклітинні білки (рис. 4.7). До них відносяться гідролітичні ферменти, які функціонують на початку деградації полімерних речовин; зв'язувальні білки, що розпочинають процес транспорту субстратів; хеморецептори, що керують реакцією хемотаксису; білки, які утворюють позаклітинні структури (такі як пептидоглікан і зовнішня мембрана).

4.1.5. Клітинна стінка архей

Клітинні стінки архей принципово відрізняються від таких у бактерій. У архей відсутній пептидоглікан і зазвичай бракує зовнішньої мембрани, через що для них не використовується забарвлення за Грамом. Наприклад, клітинні стінки деяких архей, що виробляють метан (метаногени), містять полісахарид псевдомуреїн, структурно надзвичайно схожий на пептидоглікан. Кістяк псевдомуреїну формується з повторів N-ацетилглюкозаміну (присутній у пептидоглікані) і N-ацетилталозамінуронової кислоти, яка замінює N-ацетилмурамову кислоту пептидоглікану. Псевдомуреїн також

відрізняється від пептидоглікану тим, що глікозидні зв'язки між похідними цукру є β-1,3 замість β-1,4, як у бактерій, і всі амінокислоти є L- а не D-стереоізомерами, через що клітини архей на відміну від бактерій не чутливі до руйнівної дії лізоциму та пеніциліну. Більшість архей замість полісахариду у клітинній стінці мають білковий S-шар.

4.1.6. S-шар

У багатьох бактерій і більшості архей крайній зовнішній шар (S-шар) клітинної стінки складається з паракристалічного моношару з'єднаних між собою молекул білка або глікопротеїну.

S-шар зазвичай складається лише з однієї або кількох субодиниць, організованих у повторювані структури, які можуть мати гексагональну, тетрагональну або тривимірну симетрію. Ці повторювані одиниці утворюють жорстку проникну паракристалічну ґратку, яка може бути товщиною 5–20 нм у бактерій і до 70 нм у архей.

У багатьох архей S-шар виконує функцію клітинної стінки, захищає клітину від осмотичного лізису, надає їй форму та може створювати періплазматичний простір, де відбуваються біохімічні реакції. S-шари функціонують як молекулярні сита, проникні для низькомолекулярних сполук, можуть підвищувати здатність деяких бактеріальних збудників викликати захворювання, сприяючи адгезії або захищаючи клітину від хазяїна.

Деякі бактерії та археї не мають клітинної стінки. До них, зокрема, відносяться мікоплазми та інші патогенні бактерії, які є внутрішньоклітинними паразитами, а також археї, такі як термоплазма та її родичі. Функцію клітинної стінки в них виконує міцна клітинна мембрана та її хімічні компоненти. Наприклад, більшість мікоплазм містять в клітинній мембрані стерини, що додають міцності та жорсткості мембрані, як це спостерігається в клітинній мембрані еукаріотичних клітин. Також мікоплазми можуть не потребувати клітинної стінки, оскільки вони відчувають слабкий вплив осмотичного тиску, тому що мешкають в цитоплазмі іншої клітини. Крім того, відсутність пептидоглікану може допомогти мікоплазмі уникнути дії імунної системи організму хазяїна, яка розпізнає саме компоненти клітинної стінки, як один із багатьох сигналів бактеріальної інвазії.

В лабораторних умовах можна експериментально отримати бактерії без клітинної стінки, якщо обробити їх лізоцимом (N-ацетилмурамідаза), що руйнує пептидоглікан, який розриває β-1,4-глікозидні зв'язки, або вирощувати бактерії в присутності антибіотиків пеніцилінового ряду (пеніцилін, ампіцилін, карбеніцилін та ін.), що пригнічують синтез пептидоглікану, перешкоджаючи утворенню пептидних зв'язків та поперечному зшиванню пептидоглікановых ланцюгів.

Таким чином можна отримати протопласти та сферопласти. Протопласти повністю позбавлені залишків клітинної стінки та оточені лише клітинною мембраною. Їх частіше утворюють з грампозитивних бактерій.

У сферопластів зберігаються залишки клітинної стінки. Вони утворюються з клітин грамнегативних бактерій. Протопласти та сферопласти стабільно зберігаються в гіпертонічних чи ізотонічних умовах і не здатні до розмноження. Вони в 3–10 разів більші за вихідні клітини цих бактерій.

Бактерії, які частково або повністю позбавлені клітинної стінки, але ще зберегли здатність до росту, назвали L-формами від назви інституту Лістера в Лондоні, де вперше виявили незвичайні клітини в культурі бактерій *Streptococcus moniliformis*. Пізніше були описані L-форми у бактерій різних видів та показано, що L-форми виникають спонтанно або індуковано під впливом агентів, що блокують синтез клітинної стінки, ультрафіолетових та рентгенівських променів. L-форми утворюються в результаті незбалансованого росту нормальних бактеріальних клітин у довжину та товщину, тому вони плейоморфні, тобто мають різну форму.

4.1.7. Цитоскелет і цитоплазма

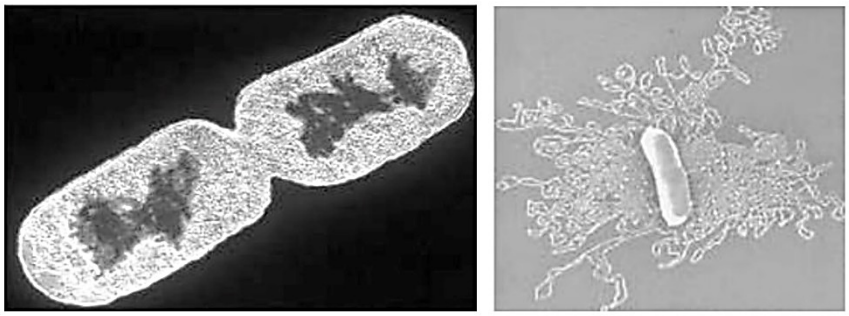
Основну функцію утримання форми та структури клітини у прокаріотів виконує клітинна стінка. Білки цитоскелета, що пронизують всю клітину, відіграють вирішальну роль у визначенні форми та сприяють процесам поділу клітини. Деякі білки цитоскелета бактеріальних клітин аналогічні еукаріотним, тоді як інші є унікальними. Найкраще вивчені нитки актину, що скручуються всередині клітини та допомагають підтримувати форму в процесі збільшення розмірів клітини.

Цитоплазма – це вміст клітини, оточений клітинною мембраною. Фракція цитоплазми, що має гомогенну консистенцію та містить набір розчинених РНК, ферментних білків, продуктів та субстратів метаболічних реакцій, отримала назву цитозолю. В цитоплазмі розташовані структурні елементи: рибосоми, внутрішньоцитоплазматичні включення, нуклеоїд, гранули запасних поживних речовин.

4.1.8. Нуклеоїд

Генетичний матеріал прокаріотів представлений молекулою (молекулами) ДНК, укладеною в компактну структуру та локалізованою в обмежених ділянках цитоплазми, що не має, на відміну від еукаріотів, власної мембрани. Цю ділянку цитоплазми, де розташована бактеріальна хромосома прийнято називати нуклеоїдом.

Радіоавтографи переконливо доводять, що ДНК бактерій *E. coli* має форму нитки, замкнутої в кільце. Ця замкнута в кільце молекула ДНК завдовжки біля 1 мм, містить кілька тисяч генів, розташованих лінійно, і називається хромосомою. Нуклеоїд займає центральну частину бактеріальної клітини розміром (у кишкової палички) близько 1 мм (рис. 4.9 а). У фазово-контрастному мікроскопі в клітинах живих бактерій нуклеоїд виглядає як овальне тільце.



а б

Рис. 4.9. Нуклеоїди (а) та хромосома (б) *Escherichia coli*

Повністю «упакований» нуклеоїд є достатньо компактним утворенням цитоплазми (рис. 4.9 а). Стабілізуючу роль такої структури виконують специфічні білки, що сприяють «упаковці» ДНК. Вони подібні за амінокислотним складом та іншими властивостями до гістонів еукаріотів, мають порівняно невеликі розміри (9–28 кД) і здебільшого відносяться до основних білків. Схожі білки, що сприяють «упаковці» ДНК, виділені з самих різних мікроорганізмів, зокрема й архебактерій.

Важливу роль для збереження цілісності структури та функціонування геному бактерій має прикріплення нуклеоїду до специфічних ділянок клітинної мембрани.

Хоча кожна бактеріальна клітина у більшості видів бактерій містить одну хромосому, часто в клітині виявляють до 8 і більше хромосом. Так, у *Azotobacter chroococcum* в експоненціальній фазі росту на одну клітину припадає 20–25 копій хромосоми.

Розміри хромосомної ДНК у різних видів бактерій відрізняються. У найменшої за розміром бактерії *Mycoplasma genitalium*, що викликає у людей уретрити, хромосомна ДНК дорівнює 580 070 п. н.; у бактерій *E. coli* – 4 653 831 п. н. Нитка хромосомної ДНК у бактерій *E. coli* має лінійний розмір 1,6 мм, а діаметр упакованого нуклеоїду в цитоплазмі – 1 мкм. Більшість бактерій – гаплоїдні організми, тобто вони мають одну хромосому. Однак у деяких видів *Rhodobacter sphaeroides, Agrobacterium tumefaciens, Leptospira interrogans* клітини мають по дві хромосоми, що різняться між собою за величиною, у *Burkholderia cepacia* – навіть три хромосоми.

4.1.9. Рибосоми

Рибосоми є механізмом для синтезу білка. При ультрацентрифугуванні рибосоми прокаріотів мають коефіцієнт седиментації 70S, в той час як у еукаріотів – 80S. Вони утворені двома субодиницями – 30S та 50S. За розміром та деяким іншим особливостям рибосоми бактерій подібні до рибосом мітохондрій і хлоропластів. Менша субодиниця 30S містить молекулу 16S рРНК та в більшості випадків по одній молекулі 21 виду білків.

Субодиниця 50S складається з двох типів молекул рРНК (23S і 5S) і близько 35 молекул різних білків, представлених, як правило, також однією копією. Бактеріальна клітина містить від 5 до 50 тис. рибосом, кількість їх тим більша, чим більша швидкість росту клітини.

4.1.10. Капсули, слиз та чохли

Поверхню клітинних стінок багатьох клітин прокаріотів покривають слизові капсули різної товщини (рис. 4.10), тому поверхня колоній бактерій з капсулами виглядає гладкою та вологою. Зв'язок мікрокапсул з клітинною стінкою настільки міцний, що її можна розглядати як елемент клітинної стінки. Деякі бактерії оточені слизом, що має аморфний, неструктурований вигляд і легко відокремлюється від поверхні бактеріальної клітини, а по товщині часто перевершує її діаметр.

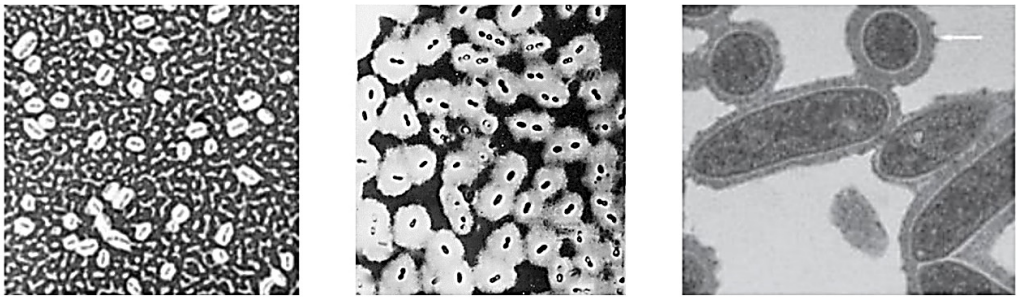


Рис. 4.10. Капсули бактерій: (а) *Bacillus sp.,* (б) *Azotobacter sp.,* (в) *Rhodobacter capsulatus*

У більшості бактерій капсула утворена полісахаридами (*Streptococcus mutans*). Капсули деяких бактерій складаються з поліпептидів, в яких міститься багато D- і L-глутамінової кислоти (збудник сибірської виразки *Bacillus anthracis*).

Капсули слугують джерелом запасних поживних речовин, утримують вологу та допомагають захистити клітину від висихання, оберігають її від механічних пошкоджень. Вони є фактором вірулентності у деяких патогенних бактерій (*Streptococcus pneumoniae*), слугують бар'єром для бактеріофагів, перешкоджаючи їх адсорбції на клітині бактерій, сприяють прикріпленню клітин до субстрату.

Полісахарид ксантан бактерій *Xanthomonas campestris* використовується у складі мастил при видобутку нафти, у косметології, у харчовій промисловості для покращення смакових властивостей продуктів, соусів, кремів. Декстрани *Leuconostoc mesenteroides* знаходять застосування як кровозамінники.

На відміну від капсул і слизових шарів чохли мають тонку складну структуру, у їх складі є кілька шарів різної будови.

4.1.11. Ендоспори та інші форми бактерій, що покояться

Багато мікроорганізмів утворюють структури, що дозволяють їм виживати за несприятливих умов. Бактерії деяких видів виробляють спеціалізовані спори, які називаються ендоспорами (рис. 4.11). Ендоспори є високодиференційованими сплячими клітинами, які забезпечують виживання та можуть переносити суворі умови навколишнього середовища: високу температуру, радіацію, вплив хімічних речовин, висихання та виснаження поживних речовин. Ендоспори не є репродуктивними структурами, такими як спори грибів, а стадією спокою в життєвому циклі бактерій: вегетативна клітина – ендоспора – вегетативна клітина.

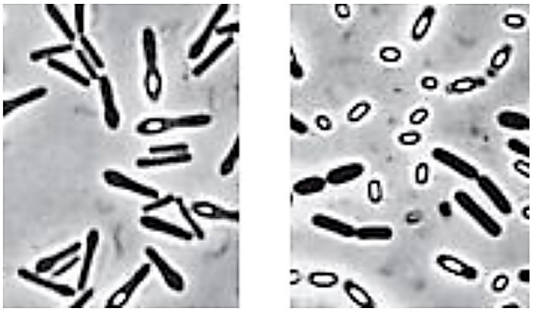


Рис. 4.11. Розташування ендоспор у клітині: (а) термінальне, (б) центральне

Багато бактерій можуть утворювати спори або спороподібні структури – міксоспори міксобактерій, артроспори актиноміцетів, а також різні форми цист, але лише ендоспори відрізняються своєю надзвичайною стійкістю до несприятливих факторів. Зокрема, ендоспори у мезофільних бактерій є єдиною формою, яка здатна годинами переносити температуру, вищу температури кипіння води. Завдяки своїй унікальній структурі, ендоспори можуть залишатися в стані спокою протягом сотень, а то і тисяч років та прорости за сприятливих умов.

Ендоспори легко поширюються вітром, водою або через кишківник тварин, тому ендоспороутворювальні бактерії дуже поширені в природі. Ендоспори виробляються лише бактеріями порядків *Bacillales* і *Clostridiales*, які є грампозитивними бактеріями філуму *Firmicutes*. Ці бактерії мають спільного предка, тому цілком ймовірно, що здатність утворювати ендоспори в процесі еволюції з'явилася лише один раз, але багато видів у цих групах з часом втратили відповідні гени.

Спороутворювальні бактерії широко зустрічаються в ґрунті, морських і прісних водоймах, а деякі є добре відомими збудниками захворювань людини та тварин. Зокрема, ендоспороутворювальні бактерії є основною причиною псування продуктів харчування та хвороб харчового походження.

Ендоспора у вегетативній клітині перетворюється на структуру, що заломлює світло, завдяки цьому її добре видно під мікроскопом без забарвлення (рис. 4.12). Вони розташовуються на кінці бактеріальної клітини або по центру.

Спороутворення зазвичай запускається у випадку нестачі певної поживної речовини або погіршення умов культивування. Коли клітина відчуває це, запускається процес, який перетворює вегетативну клітину на ендоспору, що контролюється складною генетичною системою регулювання.

Ендоспора може залишатися в стані спокою роками, але за настання умов, сприятливих для росту, вона може впродовж декількох хвилин перейти до процесу проростання.

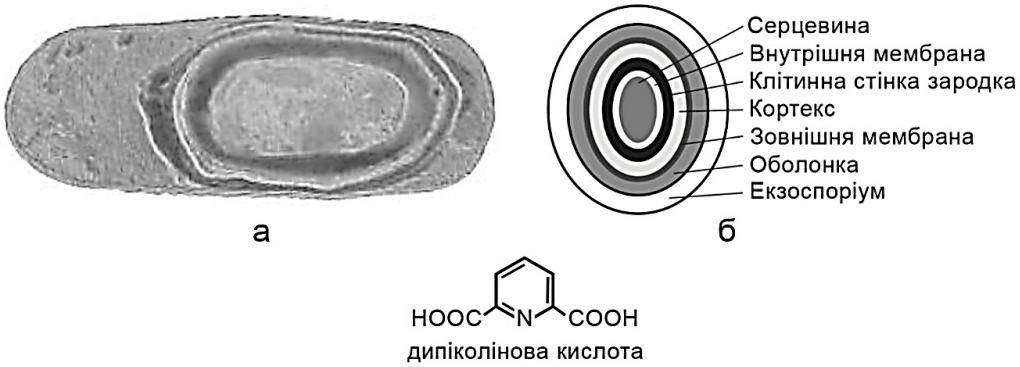


Рис. 4.12. Будова ендоспори бактерій: (а) бактеріальна клітина *Bacillus subtilis* у стадії споруляції, (б) схема будови зрілої спори

Структура ендоспори, яку видно за допомогою електронного мікроскопа, помітно відрізняється від структури вегетативної клітини. Ендоспора містить багато шарів, відсутніх у вегетативній клітині. Внутрішня область ендоспори є її серцевиною, що називається зародком, який містить нуклеоїд і рибосоми та утворюється з цитоплазми вегетативної клітини. Навколо ядра знаходиться внутрішня мембрана, клітинна стінка, кортекс та зовнішня мембрана (рис. 4.12). Внутрішня мембрана утворюється з клітинної мембрани вегетативної клітини, кортекс складається з пептидоглікану і спеціальної зовнішньої мембрани, яка утворюється під час споруляції (не плутати із зовнішньою мембраною грамнегативних клітин). За зовнішньою мембраною знаходиться оболонка ендоспори, що складається з шарів специфічних білків, а деякі ендоспори мають також шар зовнішньої білкової оболонки, який називається екзоспоріум.

Секрет стійкості ендоспор і причини, чому ендоспори мають таку високу здатність до заломлення світла, полягає в їхній дегідратації в процесі утворення. Зневоднення значно підвищує стійкість до температури та хімічних речовин. При цьому ферменти у серцевині переходять у неактив-

ний стан та накопичується специфічна для ендоспор дипіколінова кислота (рис. 4.12), що знаходиться в комплексі з кальцієм (Ca^{2+}). Комплекс кальцій-дипіколінова кислота складає приблизно 10% від сухої маси ендоспори.

Серцевина ендоспори також містить високий рівень низькомолекулярних спорових білків, що захищають ДНК від пошкодження ультрафіолетом.

Спороутворення зазвичай починається при обмеженні поживних речовин у середовищі або погіршенні умов культивування. Утворення спор – складний процес, який можна поділити на декілька стадій. Спочатку материнська клітина ділиться на два нерівні протопласти, кожен з яких має свій нуклеоїд. На наступній стадії більший протопласт повністю захоплює менший, який в результаті отримує дві мембрани, одна з яких власна, а друга належить протопласту вегетативної клітини, що поступово перетворюється в проспору. Далі між двома шарами мембран формується кортекс та починається накопичення в спорі дипіколінової кислоти. Навколо кортексу утворюються білкові оболонки та екзоспоріум. На останніх стадіях завершується синтез оболонок і спора перетворюється на зрілу. Процес утворення спори у *Bacillus subtilis* контролюють більше 200 генів. Тривалість циклу спороутворення зазвичай становить біля 8 годин.

Проростання сплячої спори в активну вегетативну клітину не менш складний процес, ніж утворення спори. Проростання спор відбувається за наявності необхідних поживних речовин та умов культивування. Цей процес можна індукувати прогріванням чи дією ультразвуку.

До інших форм бактерій, що покояться, відносяться цисти, екзоспори, міксоспори. Як і ендоспори, всі вони допомагають бактеріям переживати несприятливі умови. Екзоспори утворюються шляхом брунькування материнської клітини. Утворення екзоспор є характерним для метанокиснюючих бактерій.

Бактерії деяких видів (наприклад, роду *Azotobacter*) за несприятливих умов утворюють цисти – кулясті товстостінні клітини. На цисту перетворюється вся вегетативна клітина. Міксоспори утворюються також шляхом перетворення усієї клітини. Формування міксоспор притаманно ковзним бактеріям, зокрема представникам роду *Myxococcus*.

4.1.12. Пілі

У багатьох бактерій і архей на поверхні клітин розташовані ниткоподібні ворсинки білкової природи – пілі (однина пілус, від лат. волосина). Крім терміну «пілі» часто використовують синонім «фімбрії» (однина фімбрія, від лат. нитка) (рис. 4.13). Фімбріями називають короткі пілі, що забезпечують прикріплення клітини до певного субстрату. У довжину пілі можуть сягати до 20 мкм. Архітектура їх варіює від тонких ниткоподібних до товстих паличкоподібних утворень з осьовими порожнинами. Пілі

сформовані з одного або кількох типів білкових субодиниць, зібраних у спіральні структури, часто розташовані перитрихально по поверхні клітини, хоча пілі IV типу розташовані тільки на одному кінці клітини.

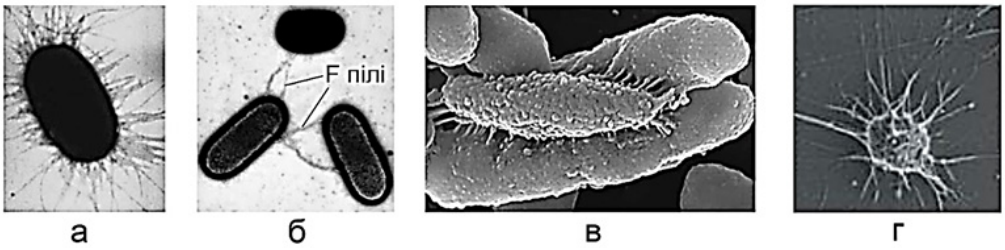


Рис. 4.13. Клітини бактерій з різними типами пілі: (а) пілі (фімбрії) *Escherichia coli*, що відповідають за адгезію; (б) кон'югативні пілі *Escherichia coli*; (в) асоціація бактерій *Chlorochromatium aggregatum* (центральна бактерія з пілями, що тісно контактують з епібіонтами); (г) піліподібні структури хамі в групі SM1 архей

Основне призначення пілі – забезпечувати прикріплення клітини до поверхні субстрату. Прикріплювальні субодиниці пілі (адгезини) є посередниками при бактеріальних контактах з неживими та живими об'єктами (тканинами та клітинами інших організмів). Колонізація тканин бактеріальними патогенами зазвичай залежить від стереохімічної подібності між архітектурою адгезину та відповідного рецептора клітини хазяїна. Пілі допомагають формуванню бактеріальних угруповань, таких як біоплівки, що є основним способом існування та фактором успішної колонізації шлунково-кишкового тракту (ШКТ), нирки, сечового міхура людини та тварин ентеро- та уропатогенними бактеріями.

Електропровідні пілі (нанодроти) з’єднують клітини в колонії, можуть проводити електрони між клітинами та таким чином відіграють важливу роль в енергетичному обміні.

Пілі виступають також як акцептори бактеріофагів. Вони відповідальні за прикріплення холерного вібріона до епітелію тонкого кишківника та є рецепторами для лізогенного фага, що кодує дві субодиниці холерного токсину. Вони допомагають клітинам передавати ДНК при кон'югації, а пілі IV типу (рис. 4.18 а) забезпечують бактеріям так звану посмикувальну рухливість (twitching motility).

Пілі IV типу також виявлені в архей. Вони беруть участь у адгезії та агрегації клітин, що призводить до формування біоплівки. Незвичайна група архей SM1, утворює унікальну структуру для прикріплення до поверхні – хамі (hami), яка нагадує тонкий гачок (рис. 4.13 г).

4.1.13. Джгутики та рухливість

Прокаріотичні мікроорганізми пересуваються в рідкому середовищі за допомогою спеціальних пристроїв. Вони можуть рухатися в певних на-

прямках у відповідь на хімічні або фізичні подразники. Рухливість дозволяє клітинам досягати різних зон свого середовища, що може забезпечити їм нове місце з додатковими ресурсами або захист від шкідливих речовин.

Багато бактерій плавають у рідкому середовищі завдяки джгутикам (рис. 4.14). В архей аналогічні структури називаються «архаели». Джгутики та архаели – це крихітні ротаційні механізми, які функціонують, щоб штовхати або тягнути клітину в рідкому середовищі.

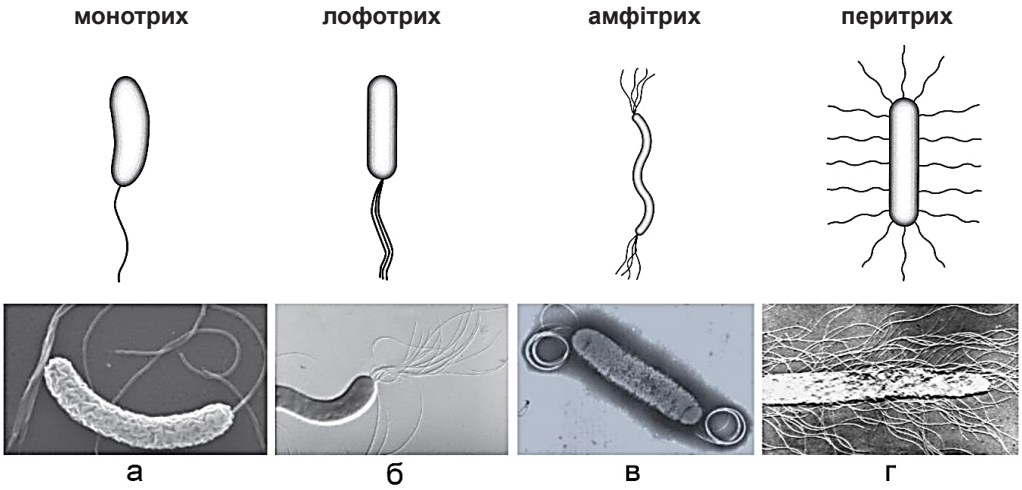


Рис. 4.14. Типи розташування джгутиків: (а) монотрих, (б) лофотрих, (в) амфітрих, (г) перитрих

Джгутики бактерій являють собою довгі тонкі відростки (шириною 15–20 нм, залежно від виду), прикріплені до клітини в різних місцях. Коли один джгутик прикріплений до клітини на одному кінці, таку бактерію називають монотрих, коли пучок джгутиків на одному кінці – лофотрих, пучки джгутиків на обох кінцях – амфітрих, джгутики, прикріплені по всій поверхні клітини – перитрих (рис. 4.14).

Джгутики можуть обертатися зі швидкістю до 1000 обертів за секунду для підтримки швидкості плавання до 60 довжин клітини/сек. Найшвидша відома наземна тварина гепард може рухатись зі швидкістю приблизно 25 довжин тіла/сек. Отже, бактерія рухається вдвічі швидше (відносно свого розміру) ніж найшвидша тварина.

Плавальні рухи монотрихових та лофотрихових бактерій відрізняються від рухів перитрихових (рис. 4.15). Перитрихові бактерії рухаються повільно і по прямій, зупиняються, а потім знову рухаються. Монотрихові часто рухаються швидше і переважно безперервно.

Рух клітини здійснюється шляхом обертання джгутика за або проти годинникової стрілки (у монотрихів), одночасно сама клітина повільно обертається у зворотний бік. При обертанні джгутика за годинниковою

стрілкою клітина тягнеться за джгутиком (джгутик – попереду). При обертанні проти годинникової стрілки джгутик штовхає клітину вперед (джгутик – ззаду).

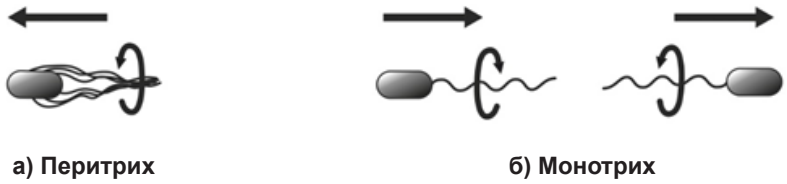


Рис. 4.15. Рух (а) перитрихової та (б) монотрихової бактерій

У перитриха рух вперед забезпечується всіма джгутиками, що формуються в пучок і певний час обертаються в одному напрямку. Зупинка призводить до розпаду пучка, через деякий час джгутики знову збираються в пучок і обертаються в тому ж напрямку. Перитрихи обертають джгутики (пучок джгутиків) проти годинникової стрілки (джгутики залишаються позаду клітини за напрямом руху).

Будова джгутиків. Джгутик складається з філамента, гачка та базального тіла, яке включає чотири (у $Гр^-$ бактерій) та два (у $Гр^+$ бактерій) кільця, стрижня і моторних білків (рис. 4.16). Філамент сформований із мо-

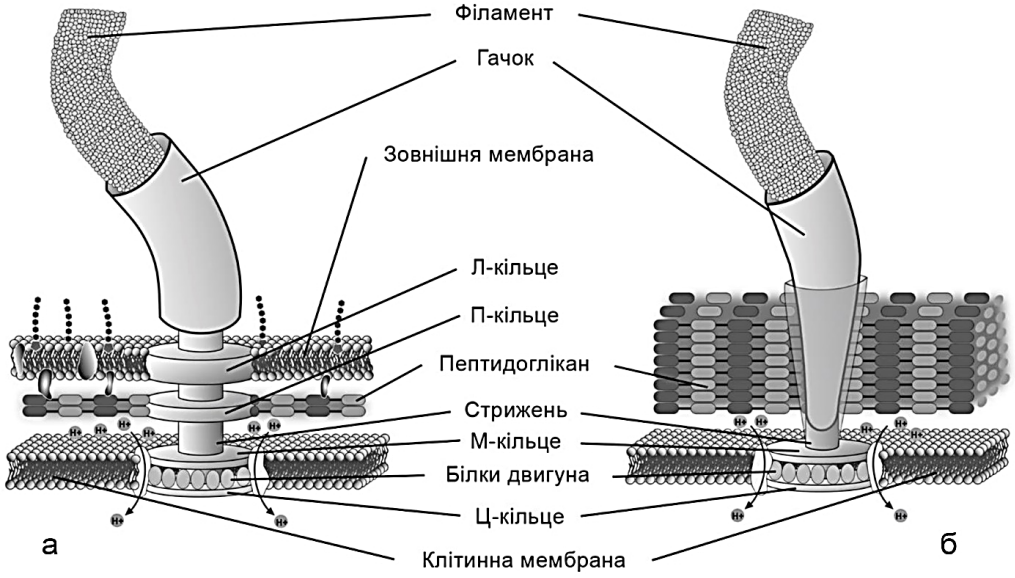


Рис. 4.16. Будова джгутика у грамнегативних (а) і грампозитивних (б) бактерій. Кільце ЗМ вбудовано в зовнішню мембрану, кільце П – у пептидоглікан, кільце КМ – в клітинну мембрану, а кільце Ц – розташоване в цитоплазмі з внутрішньої сторони клітинної мембрани

лекул білка флагеліна. Один філамент формують близько 20 тис. молекул флагеліна. Формування джгутика кодується більш ніж 30 генами.

Базальне тіло Гр⁻ бактерій з чотирма кільцями вбудовано в клітинну стінку та клітинну мембрану. Через всі кільця проходить стрижень, який через гачок передає обертовий момент на філамент. У стрижні та філаменті існує вузький канал, через який проходять молекули флагеліна, щоб досягти місця синтезу філамента. Кільце КМ оточене кількома моторними білками, від яких обертовий момент передається через стрижень на гачок, а потім на філамент.

Кільця КМ, Ц та білки, що їх оточують, функціонують як джгутиковий двигун, що обертає стрижень. Обертовий момент зі стрижня через гачок передається на філамент джгутика, який обертається та рухає клітину в середовищі. Білковий двигун бактеріального джгутика використовує енергію трансмембранного потенціалу, сформованого протонами на сторонах клітинної мембрани, які, протікаючи через моторні білки «протонної турбіни», обертають кільце КМ (ротор) і відповідно стрижень та філамент.

4.1.14. Архаели

Плавальна активність широко поширена серед архей, які рухаються завдяки обертанню аналогів джгутика – архаел, що більш схожі на пілі IV типу. Архаели дещо менші за джгутики, мають ширину приблизно 10–13 нм, не мають порожнистого каналу та на відміну від джгутиків їх філамент збирається з білків так само, як пілі IV типу. Обертання архаел забезпечується АТФ, а не переносом протонів. Двигун архаел конструктивно простіший джгутикового, його будову забезпечує 7–12 генів.

Клітини плаваючих архей рухаються набагато повільніше ніж бактерій, що може бути пов’язано з відмінностями в конструкції двигуна та енергії, що його живить.

4.1.15. Рухливість спірохет

Своєрідний спосіб пересування притаманний для спірохет. Клітина спірохети складається з протоплазматичного циліндра, представленого пептидогліканом шаром і клітинною мембраною, оточених зовнішнім чохлом. Навколо протоплазматичного циліндра в периплазматичному просторі знаходяться пучки нитчастих структур – аксіальні фібрили, які, як і у джгутика, складаються з білка флагеліна (рис. 4.17). Ці структури забезпечують рух спірохет як у рідкому середовищі, так і на розділі фаз рідкого та щільного середовища.

Число аксіальних фібрил коливається від 2 до 100. Один кінець кожної аксіальної фібрили прикріплений поблизу полюса протоплазматичного циліндра, а інший вільний. Клітина містить два набори фібрил, прикріплених субполярно біля кожного полюса клітини. Кожна з них тягнеться прак-

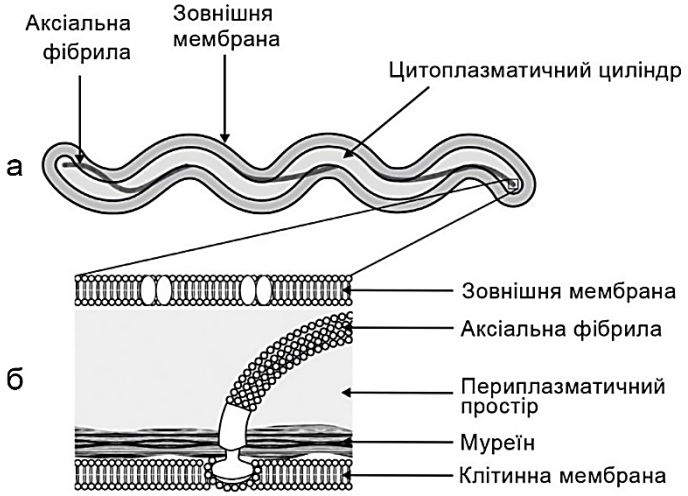


Рис. 4.17. Аксіальні фібрили спірохет: (а) клітина спірохети у поздовжньому розрізі; (б) місце прикріплення аксіальних фібрил біля полюса протоплазматичного циліндра

тично вздовж усієї довжини клітини, а в центральній частині клітини вони перекриваються. Фібрили, обертаючись чи скорочуючись, зумовлюють характерний для спірохет рух шляхом згинання, обертання навколо осі, хвилеподібно, гвинтоподібно.

4.1.16. Рухливість по поверхні

Багато рухомих мікроорганізмів не здатні плавати, а натомість пересуваються по поверхні субстрату різними способами. Ці форми рухливості вимагають прикріплення до поверхні і не залежать від джгутиків або архаел. Усі форми рухливості по поверхні значно повільніші ніж плавальна рухливість, зазвичай менше 10 мкм/с. Рухливість по поверхні може здійснюватися різними системами, з яких добре вивчені посмикування та ковзання.

Посмикувальну рухливість (twitching motility) забезпечують пілі IV типу, які витягуються в напрямку від клітини, прикріплюються вільним кінцем до поверхні субстрату і завдяки скороченню підтягують клітину вперед (рис. 4.18 а). Ці пілі розташовані винятково на полюсах бактерій і досить жорсткі. Такий рух відбувається дискретними кроками, ривками і забезпечується енергією АТФ. Посмикувальна рухливість описана в багатьох бактерій і деяких архей. Наприклад, грамнегативні бактерії роду *Pseudomonas* здатні до посмикувальної рухливості, що забезпечує їм можливість утворювати біоплівки.

Рухливість ковзанням визначається як плавний рух вздовж довгої осі клітини без допомоги видимих зовнішніх структур (таких як пілі або джгу-

тики) з швидкістю до 60 мкм/хв. Такий спосіб пересування притаманний бактеріям різних таксонів, зокрема міксобактеріям, і не виявлений у архей.

Механізми ковзного руху ймовірно різноманітні. Найкраще ковзання вивчено у бактерій родів *Myxococcus* і *Flavobacterium* (рис. 4.18 б). Вважається, що клітини цих бактерій мають на поверхні спіральну доріжку (трек), утворену білками, яка огортає клітину неперервною спіраллю та обертається навколо неї. При цьому клітина обертається в протилежний бік навколо своєї вісі та рухається вперед. Такі роторні «ковзальні» двигуни приводяться в рух протонрушійною силою, що еволюційно та функціонально подібно до джгутикового двигуна.

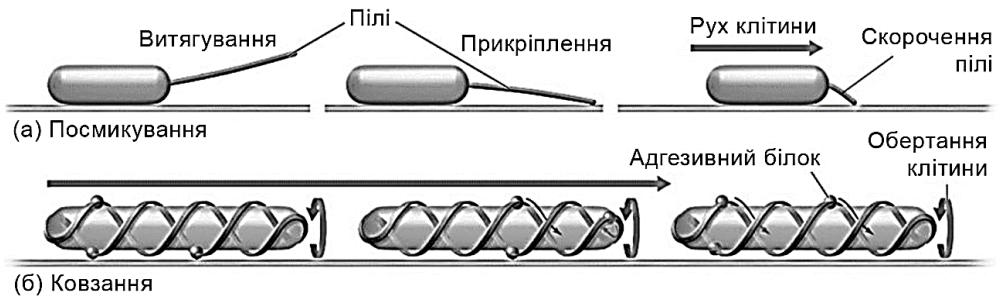


Рис. 4.18. Рухливість по поверхні: (а) посмикувальна рухливість; (б) ковзальна рухливість

Рухливі бактерії здатні здійснювати реакції таксису, що допомагають їм орієнтуватися в просторі, впізнавати один одного при кон'югації або пошуку симбіонта: фототаксис (особливо важливий для фототрофних мікроорганізмів); хемотаксис (рух до атрактанта та від репелента); *Aqaspirillum magnetotacticum* має внутрішньоклітинні ланцюжки магнетитових частинок або магнетосом, що допомагають бактерії орієнтуватися щодо ліній магнітного поля Землі, вибираючи оптимальне місцезнаходження; аеротаксис (по градієнту кисню, важливий для мікроаерофільних та анаеробних бактерій). Бактерії можуть реагувати на атрактанти в концентрації до 10^{-8} М. Їх хеморецептори локалізуються в периплазмі або в клітинній мембрані.

4.1.17. Бактерії зі складним циклом розвитку

Деякі прокаріоти характеризуються складним циклом розвитку, в процесі якого може змінюватися морфологія клітин і утворюються різні форми спокою. Відомі бактерії, які утворюють плодові тіла, часто химерних конфігурацій та забарвлень (рис. 4.19 а). Найбільш яскраві представники таких організмів це міксобактерії-хижаки. Вони харчуються іншими мікроорганізмами, бактеріями та дріжджами, яких вони вбивають антибіотиками, що виділяють. Міксобактерії утворюють цілу низку екзоферментів, за допомогою яких лізують клітини жертв та гідролізують високомолеку-

лярний субстрат. Низькомолекулярні продукти гідролізу, переважно короткі пептиди, всмоктуються в клітини міксобактерій і служать їм поживною речовиною.

У присутності харчового субстрату міксобактерії мігрують його поверхнею, одночасно харчуючись і залишаючи слід слизу (рис. 4.19 б). У цій стадії розвитку клітини можуть «роїтися», тобто пересуватися координовано, подібно до роїв комах, що шукають нові території для заселення. Клітини, рухаючись ритмічно, утворюють хвилі на поверхні субстрату. Коли субстрат вичерпується, міксобактерії агрегують і диференціюються в плодове тіло з спорангіями, що містять міксоспори (рис. 4.20). Цей складний

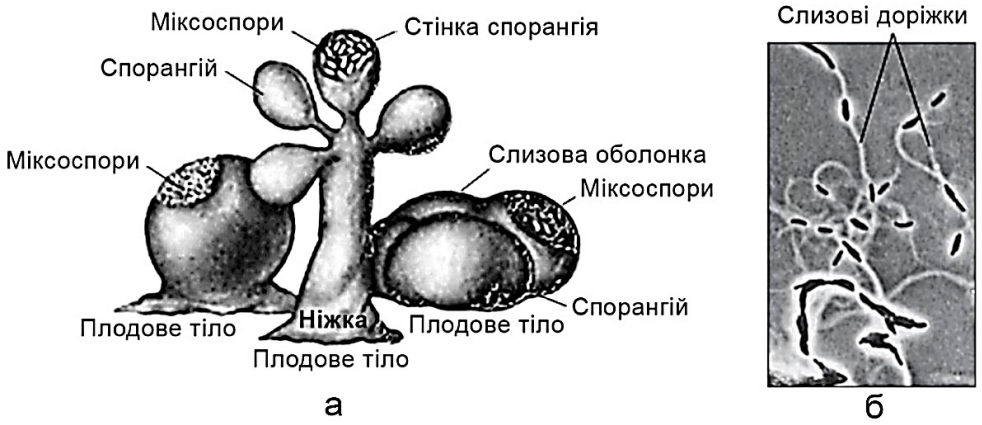


Рис. 4.19. Плодові тіла міксобактерій. (а) форми типових плодових тіл міксобактерій; (б) слизові доріжки (треки), що залишили бактерії в результаті переміщення по поверхні середовища

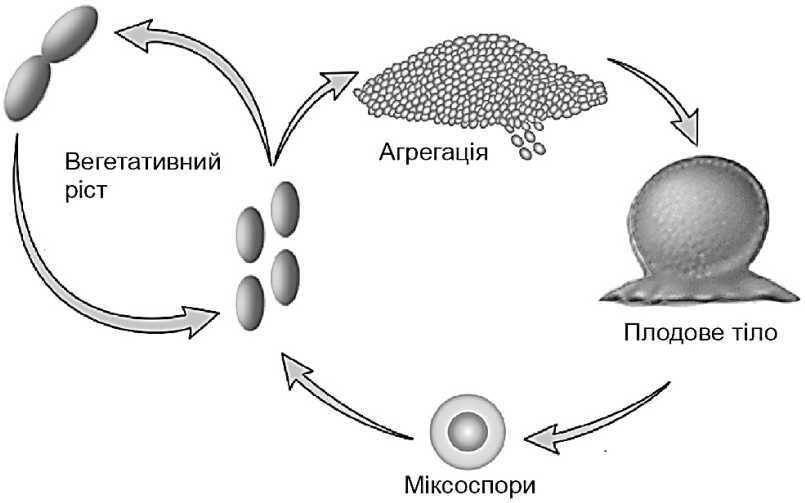


Рис. 4.20. Схема життєвого циклу міксобактерій

процес запускається голодуванням клітин і координується різними хімічними сигналами. За сприятливих умов міксоспори дають початок новим вегетативним клітинам і цикл повторюється.

Розміри плодових тіл варіюють у межах від 50 до 500 мкм. Плодові тіла містять 10^4–10^6 міксоспор і зазвичай яскраво забарвлені пігментами каротиноїдної природи в червоний, жовтий і коричневий кольори. Плодові тіла відрізняються за складністю будови від простих глобул, оточених стінками (*Myxococcus*), до розгалужених деревоподібних структур, що несуть кілька спорангіїв на стеблах або стовбурах (*Stigmatella*, *Chondromyces*). Кожен вид утворює характерні йому плодові тіла.

Міксоспори, сформовані з вегетативних клітин, що перебувають у спорангіях плодових тіл, більш стійкі ніж вегетативні клітини до висушування, високих температур та УФ-радіації. Вони можуть залишатися життєздатними за умов лабораторії до 10 років. Утворення плодових тіл з міксоспорами, укладеними в спорангії, сприяє ще більшому виживанню міксоспор, оскільки вони знаходяться компактно в плодових тілах, і нова колонія міксобактерій формується після того, як міксоспори вивільняються із спорангія та проростають.

Така соціальна організація має переваги, так як міксобактерії, пересуваючись гуртом на новий високомолекулярний субстрат або клітини жертви, виділяють гідролітичні екзоферменти та поглинають продукти гідролізу. Відповідно, більша кількість міксобактерій виділяє більшу кількість ферментів, що дозволяє їм більш ефективно споживати клітини жертви та субстрат.

4.1.18. Включення

Включення – це структури, що не є абсолютно необхідними для життєдіяльності клітини та можуть бути присутніми або відсутніми. Вони є досить різноманітними за хімічним складом (полісахариди, білки, жироподібні речовини, поліфосфати, сірка, залізо) та виконують, в основному, функцію запасних поживних речовин, утворення яких залежить від умов культивування бактерій. Виявити включення бактеріальної клітини можна за допомогою спеціальних методів забарвлення.

Запасні речовини накопичуються клітинами мікроорганізмів при надлишку екзогенних субстратів, насамперед енергетичних, і використовуються клітиною при нестачі подібних речовин, а також в період адаптації клітин до умов середовища. Включення мікробної клітини виявляють різними методами, враховуючи їх хімічний склад та деякі специфічні властивості.

Деякі спороутворюючі бактерії мають специфічні білкові структури – параспоральні кристали (тільця), що володіють ентомопатогенними властивостями, використовують як засіб боротьби з комахами. Кристали бувають різної форми (ромбовидні, кубічні), заломлюють світло подібно до спор, добре забарвлюються основними та кислими барвниками.

Поліфосфатні включення називають ще гранулами волютину чи метахроматиновими зернами. У молодих клітинах поліфосфатів більше, ніж у старих. Виявлення поліфосфатів базується на властивості волютину змінювати колір барвника. Наприклад, при забарвленні метиленовим синім поліфосфати набувають червоно-синього кольору. Виявлення поліфосфатів інколи базується на їх стійкості до кислот.

Гранульоза – це крохмалеподібний полісахарид, що зустрічається в клітинах маслянокислих бактерій. При взаємодії з розчином йоду гранульоза набуває темно-синього забарвлення.

Глікоген – це полімер глюкози, який накопичується в клітинах дріжджів та бактерій. Виявити глікоген можна реакцією з йодом, при взаємодії з яким, він набуває червоно-коричневого забарвлення.

Полі-β-гідроксибутират інтенсивно накопичується при культивуванні мікроорганізмів в умовах недостатньої кількості азоту та надлишку вуглецю в середовищі. Ці включення виявляють за допомогою спиртових розчинів судану чорного або червоного, що розчиняються в жирах і забарвлюють полі-β-оксимасляну кислоту у відповідні кольори.

У клітинах деяких бактерій містяться сигароподібні газові вакуолі. (аеросоми), оточені білковою оболонкою, що виконують у водних організмів роль регуляторів плавучості клітини.

У мікроорганізмів, які використовують вуглекислий газ як джерело вуглецю, можна виявити карбоксисоми, що містять ключовий фермент циклу Кальвіна. Карбоксисоми покриті тонкою білковою мембраною.

Деякі з включень вільно розміщені в цитоплазмі, інші оточені тонкою білковою оболонкою від 2 до 4 нм товщиною, що іноді містить ще й ліпіди. Такими мембранами оточені гранули полі-β-гідроксибутирату, іноді гранули глікогену та сірки.

Деякі бактерії містять мікромагніти – ланцюжки магнетосом (рис. 4.21). Магнетосома має ширину близько 90 нм. Нанокристали магнетита Fe_3O_4 з'єднані фосфоліпідною мембраною.

Рис. 4.21. Магнетосоми: (а) магнетосома *Magnetospirillum magnetotacticum*; (б) електронна мікрофотографія магнетосом

Елементарна сірка міститься в клітинах мікроорганізмів, що використовують сполуки сірки у своєму метаболізмі, у вигляді гранул, оточених одношаровою білковою мембраною.

Специфічною запасною речовиною ціанобактерій є ціанофіцин, що витрачається організмом в умовах нестачі азоту.

4.2. Структури еукаріотичної клітини та їх функції

Клітини еукаріотичних організмів настільки різноманітні, що жодна з них не може служити типовим прикладом. Немає такої клітини еукаріотичного мікроорганізму, яка могла б містити всі структурні елементи. Органели, які виконують спеціалізовані функції, ділять еукаріотичні клітини на комірки (компартменти), що набагато ускладнює її структуру порівняно з клітиною прокаріот.

Відмінності між будовою клітин мікроскопічних водоростей, грибів та найпростіших представлені на рис. 4.22. Загалом еукаріотичні мікробні

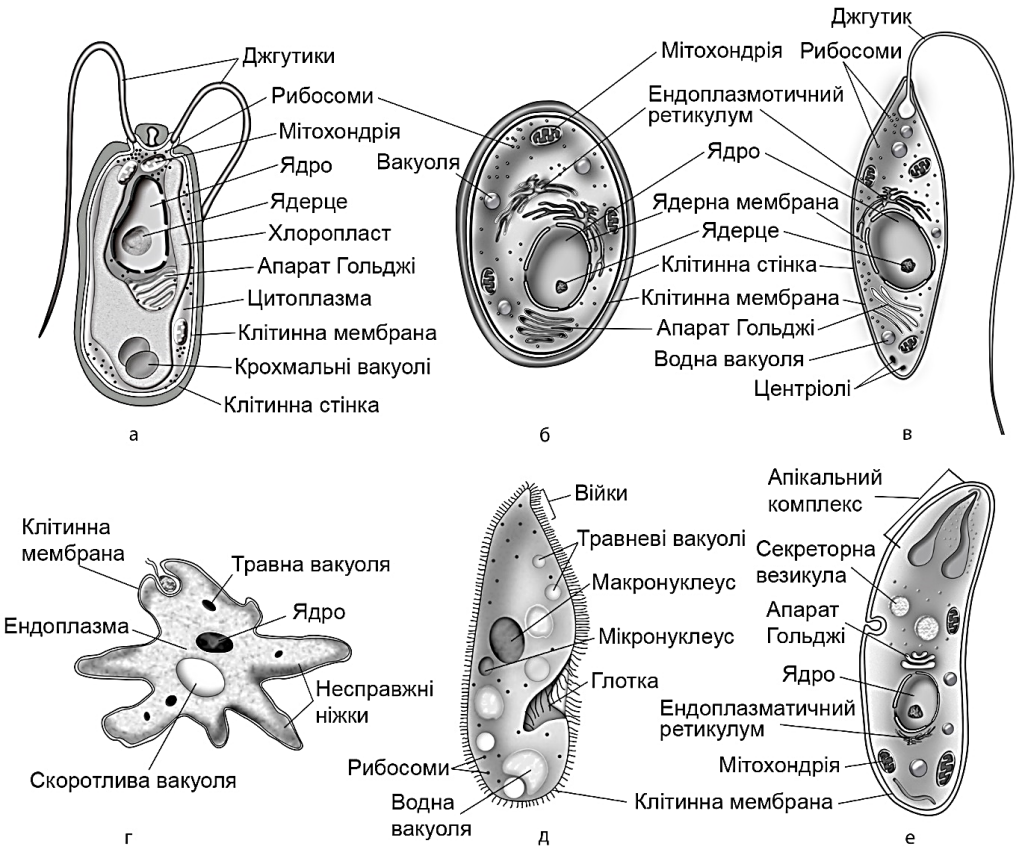


Рис. 4.22. Будова клітин еукаріотичних мікроорганізмів: (а) водорості, (б) гриби (дріжджі), (в) джгутикові, (г) амеби, (д) інфузорії, (е) апікомплексні (плазмодії)

клітини мають цитоплазматичну мембрану, ядро, мітохондрії, ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, вакуолі, цитоскелет і глікокалікс. Клітинна стінка, локомоторні придатки та хлоропласти є не в усіх еукаріотів.

4.2.1. Клітинна мембрана

Клітинна (цитоплазматична) мембрана еукаріотичних клітин, як і прокаріотичних, має типову структуру з подвійним шаром фосфоліпідів, в який вбудовані білкові молекули (див. рис. 4.4). Крім фосфоліпідів еукаріотичні клітинні мембрани також містять стероли різних видів, що забезпечують більшу стабільність мембранам еукаріотів. Ця функція надзвичайно важлива для клітин, які не мають клітинної стінки. Клітинні мембрани еукаріотів функціонально подібні до прокаріотів, виступаючи як вибірково проникні бар'єри при транспорті.

На відміну від прокаріотів, еукаріоти мають в клітині великі структури, які від 60% до 80% складаються з мембран. Білки та вуглеводи цих структур відповідають за взаємодію між клітинами, адгезію до поверхонь, секрецію продуктів всередині клітини і зв'язок між клітиною та її середовищем.

4.2.2. Клітинна стінка

Клітинні стінки грибів і водоростей є жорсткими і забезпечують захист і форму та відрізняються за хімічним складом від клітинних стінок прокаріотів. Клітинні стінки грибів мають товстий шар волокон, який складається з хітину або целюлози та тонкого зовнішнього шару гліканів. Клітинні стінки водоростей включають целюлозу, пектин і маннани в комплексі з мінералами, такими як диоксид кремнію і карбонат кальцію. Гриби та більшість водоростей мають товсту, жорстку клітинну стінку, що оточує клітинну мембрану. Найпростіші та деякі водорості не мають клітинної стінки, а її функцію виконує цитоплазматична мембрана.

Глікокалікс. Більшість еукаріотичних мікробів мають глікокалікс, крайню межу, яка безпосередньо контактує з навколишнім середовищем. Ця структура у джгутикових, амеб, інфузорій, апікомплексних складається з полісахаридів і виглядає як мережа волокон або шар слизу та дуже схожа на глікокалікс прокаріотів. Глікокалікс містить важливі рецептори і комунікаційні функції та забезпечує певний захист від змін умов середовища.

4.2.3. Рибосоми

Одні рибосоми еукаріотів розсіяні вільно в цитоплазмі та цитоскелеті, а інші тісно пов'язані з шорстким ендоплазматичним ретикулумом. Декілька рибосом часто розташовуються короткими ланцюжками (полірибосоми), оскільки знаходяться на молекулі матричної РНК. Структура еукаріотичної рибосоми подібна до прокаріотичних рибосом. Обидві вони

складаються з великої та малої субодиниць рибонуклеопротеїну. Однак, рибосоми еукаріотів (за винятком тих, що знаходяться в їх мітохондріях і хлоропластах) більші за розміром (80S).

4.2.4. Ядро

Ядро — це найбільша органела еукаріотичної клітини (рис. 4.23). Ядро відділене від цитоплазми оболонкою, яка має унікальну архітектуру, та складається з двох паралельних мембран, перфорованих невеликими порами, що слугують селективними проходами для міграції молекул між ядром і цитоплазмою. Основне тіло ядра складається з матриксу – нуклеоплазми та ядерця.

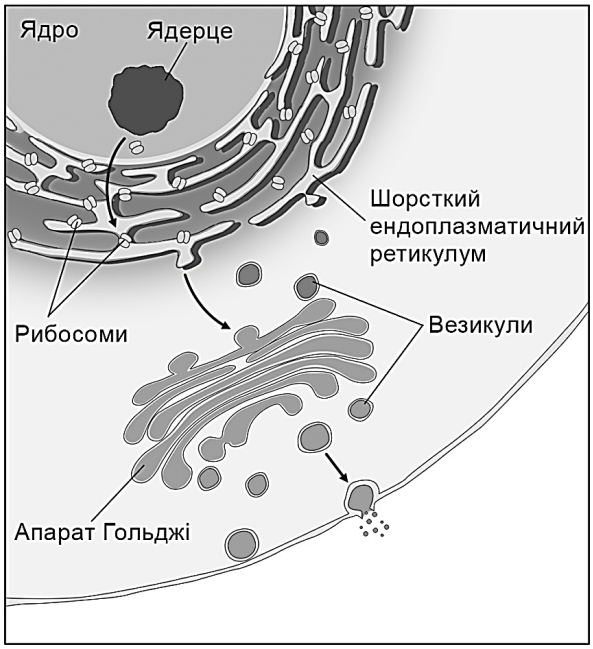


Рис. 4.23. Схема співпраці органел в синтезі та транспорті білків

Ядерце є місцем синтезу рибосомних РНК і зоною збору для субодиниць рибосом. Субодиниці транспортуються через ядерні пори в цитоплазму для остаточного збирання в рибосоми. Нуклеоплазма складається переважно з ДНК та білків гістонів, що формують хромосоми. У клітинах, які не діляться, хромосоми невидимі. Під час мітозу хромосоми стають легко видимими як окремі тільця.

4.2.5. Ендоплазматичний ретикулум

Ендоплазматичний ретикулум – це взаємопов'язана мережа мембран, порожнистих мішечків, що синтезують і транспортують речовини

(рис. 4.23). Він бере свій початок із мембрани ядерної оболонки та служить проходом для матеріалів між ядром і цитоплазмою. Є два типи ендоплазматичного ретикулуму (сітки) – це шорсткий ендоплазматичний ретикулум і гладкий ендоплазматичний ретикулум. Ці два типи ендоплазматичного ретикулуму схожі за походженням і безпосередньо пов'язані один з одним, але відрізняються в деяких аспектах структури та функцій.

Шорсткий ендоплазматичний ретикулум складається з паралельних, сплощених цистерн. На електронних мікрофотографіях він виглядає «шорстким», тому що зовнішня поверхня його всіяна рибосомами, функцією яких є синтез білків, які через просвіт цистерн транспортуються до апарату Гольджі.

У гладкого ендоплазматичного ретикулуму відсутні рибосоми. Він транспортує молекули в цитоплазму та виконує спеціальні функції синтезу небілкових молекул, таких як ліпіди, і детоксикації відходів метаболізму та інших токсичних речовин.

4.2.6. Апарат Гольджі

Апарат Гольджі є структурою, яка накопичує білки та упаковує їх для транспортування до кінцевого пункту призначення. Він складається з шарів сплощених дископодібних мішечків – цистерн, що надає вигляду стопки млинців (рис. 4.23). Ця органела завжди тісно пов'язана з ендоплазматичним ретикулумом як за своїм розташуванням, так і за функціями.

Від ендоплазматичного ретикулуму, де він межує з апаратом Гольджі, відщипуються крихітні мембранні пакети – транспортні везикули з синтезованим білком, які вловлює апарат Гольджі. У ньому білки додатково модифікуються приєднанням полісахаридів і ліпідів для подальшого транспортування. На завершальній стадії готові конденсовані везикули транспортуються до лізосом або назовні клітини як секреторні везикули.

Таким чином, ядро, ендоплазматичний ретикулум і апарат Гольджі формують свого роду природну конвеєрну лінію з виробництва білків. Ядро, як зберігач генетичного коду еукаріотів, керує і регулює всю діяльність клітини через структурну та молекулярну мережу (рис. 4.23). Ця мережа включає утворені в ядрі рибосоми та шорсткий ендоплазматичний ретикулум, який нерозривно з'єднаний з ядерною мембраною.

Спочатку ДНК генів, що містить інструкції для виробництва білка копіюється в мРНК, які передаються через ядерні пори безпосередньо до рибосом ендоплазматичного ретикулуму. Синтезовані на рибосомах відповідні білки накопичуються в просвіті ендоплазми ретикулуму.

Після транспортування до апарату Гольджі, білкові продукти хімічно модифікуються та упаковуються в везикули, які клітина використовує різними способами. Одні везикули містять ферменти для перетравлення їжі всередині клітини (лізосоми), а інші секретують екзоферменти для пере-

травлення високомолекулярного субстрату поза клітиною. Також важливою функцією ферментів, що постачаються везикулами є синтез та відновлення клітинної стінки та мембрани.

4.2.7. Лізосоми та вакуолі

Лізосома є одним із типів везикул, що походить від апарату Гольджі та містить різноманітні гідролітичні ферменти. Лізосоми беруть участь у внутрішньоклітинному перетравленні поживних частинок і в захисті проти вторгнення інших мікроорганізмів.

Вакуолі – ще один тип везикул, які є мембранними торбинками, що містять розчинені або тверді частинки для перетравлення, виділення або зберігання. Вони утворюються в клітинах найпростіших і містять поживні частки та інші речовини, які були захоплені. Вміст харчової вакуолі перетравлюється шляхом злиття вакуолі з лізосомою та утворення фагосоми. Інші види вакуолей використовуються для зберігання резервної їжі, такої як жири та глікоген. Найпростіші, що мешкають у прісноводних середовищах, регулюють осмотичний тиск за допомогою скоротливих вакуолей, які регулярно викидають надлишок води, яка дифундувала в клітину.

Для еукаріотичної клітини характерна здатність поглинати їжу в вигляді розчинених речовин або твердих частинок. Загальновідомим прикладом є поглинання твердих частинок амебами. Поглинання рідких поживних речовин здійснюється шляхом піноцитозу. Здатність еукаріотів захоплювати оформлені тверді частинки, у тому числі живі клітини, мало фундаментальне біологічне значення. Зазвичай тверді частинки, поглинені шляхом фагоцитозу амебою, перетравлюються нею та повністю лізуються. У ряді випадків, однак, результатом поглинання цілих клітин може бути внутрішньоклітинний симбіоз. Ймовірно, таким шляхом утворилися хлоропласти та мітохондрії. Прокаріоти не здатні до ендоцитозу.

4.2.8. Мітохондрії

Уся діяльність клітини не може відбуватися без постійного постачання енергії, основна частина якої у більшості еукаріотів виробляється мітохондріями. Мітохондрія складається з гладкої суцільної зовнішньої мембрани, що утворює зовнішній контур, і внутрішньої складчастої мембрани (рис. 4.24 а). Складки на внутрішній мембрані (кристи) мають різну структуру в різних еукаріотичних клітин. Мітохондрії рослин, тварин і грибів мають пластинчасті кристи, у водоростей і найпростіших – трубчасті, пальцеподібні виступи або сплощені диски.

В мембранах крист розташовані ферменти та носії електронів для формування трансмембранного потенціалу протонів та генерації АТФ. Простір навколо крист заповнений матрицею, що містить рибосоми, ДНК і пул ферментів та інших сполук, які беруть участь у метаболічному циклі

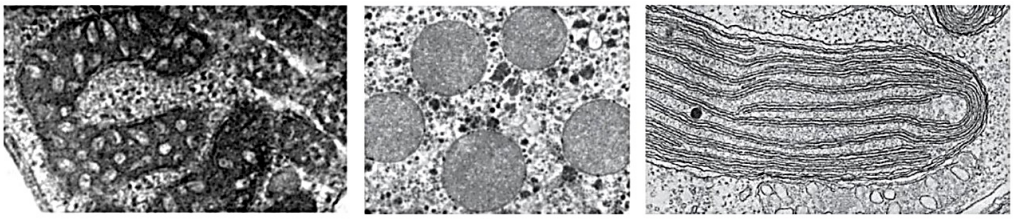


Рис. 4.24. Мітохондрії *Toxoplasma gondii* (а), гідрогеносоми *Trichomonas vaginalis* (б), хлоропласт діатомової водорості (в)

цієї органели. Мітохондрії (як і хлоропласти) унікальні серед органел тим, що вони діляться незалежно від клітини, містять кільцеві молекули ДНК, мають 70S рибосоми, що свідчить про їх симбіотичне походження від прокаріотів.

4.2.9. Гідрогеносоми

Деякі еукаріотичні мікроорганізми, як і багато прокаріотичних, ведуть анаеробний спосіб життя. У таких клітин відсутні мітохондрії, а замість них деякі містять гідрогеносоми (рис. 4.24 б). Хоча гідрогеносоми подібні за розміром до мітохондрій, у них відсутні ферменти циклу трикарбонових кислот та кристи. Мікробні еукаріоти, які мають гідрогеносоми, наприклад, паразити людини трихомонади та різні протисти, що мешкають в рубці жуйних тварин або в безкисневих грязях і озерних відкладеннях, отримують енергію в процесі ферментативних реакцій. Основною біохімічною реакцією генерації АТФ у гідрогеносомі є окиснення пірувату до H_2, CO_2 та ацетату. Утворений ацетат, який гідрогеносома не здатна окиснювати, виділяється в цитоплазму клітини хазяїна. Деякі анаеробні еукаріоти містять у цитоплазмі симбіотичні археї, які споживають напрацьований гідрогеносомою H_2 та виробляють метан.

4.2.10. Хлоропласти

Хлоропласти – це органели, що містяться в клітинах водоростей і рослин, які здатні перетворювати енергію сонячного світла в АТФ за допомогою реакцій фотосинтезу. Фотосинтетична роль хлоропластів робить їх важливими первинними виробниками кисню та органічних поживних речовин, якими живляться всі інші організми (крім хемолітотрофних бактерій і архей). Відповідно до симбіотичної теорії хлоропласти походять від ціанобактерій і багато в чому схожі на них. Є відмінності між хлоропластами різних водоростей, але більшість складається з двох мембран (рис. 4.22 в). Вони формуються з зовнішньої та внутрішньої мембран, складених в маленькі дископодібні мішечки – тилакоїди. Ці структури містять пігмент хлорофіл, а іноді й додаткові пігменти. Навколо тилакоїдів знаходиться ос-

новна речовина – строма. Фотосинтетичні пігменти трансформують енергію квантів світла в АТФ, яка використовується у стромі в реакціях циклу Кальвіна для синтезу вуглеводів.

4.2.11. Цитоскелет

В еукаріотичних клітинах область, оточена клітинною мембраною, називається цитоплазматичним матриксом. Для утримання форми в клітинах без стінок він містить внутрішній структурний каркас. Матрикс переплетений гнучким каркасом з молекул – цитоскелетом. Цей каркас закріплює органели в матриксі, забезпечує його рух та підтримку форми клітин. Основними елементами цитоскелету є мікрофіламенти та мікротрубочки.

Мікрофіламенти – це тонкі нитки, що складаються з білка актину, які прикріплюються до клітинної мембрани, та утворюють мережу в цитоплазмі. Деякі мікрофіламенти відповідають за циклічний рух цитоплазми, інші за рухливість амеб, шляхом випускання псевдоподій, в які переноситься цитоплазма.

Мікротрубочки – це довгі порожнисті трубки, що зберігають форму еукаріотичних клітин, таких як найпростіші, у яких відсутня клітинна стінка, та відповідають за рух війок і джгутиків. Вони можуть також служити альтернативною транспортною системою для молекул. Мікротрубочки відіграють важливу роль у мітозі, вони приєднуються до хромосом і при поділі розподіляють їх по дочірнім клітинам.

4.2.12. Війки та джгутики

Рухливість дозволяє мікроорганізму знаходити життєво необхідні поживні речовини, мігрувати до позитивних подразників, таких як сонячне світло, а також уникати шкідливих речовин і подразників. Війки та джгутики є зовнішніми структурами еукаріотичних клітин, які пов’язані з рухливістю.

Пересування за допомогою джгутиків поширене у найпростіших, водоростей і деяких клітин грибів, а війки зустрічаються тільки у найпростіших (рис. 4.22). Джгутики еукаріотів значно відрізняються від джгутиків прокаріотів. Вони приблизно в 10 разів товщі, мають іншу будову і вкриті потовщеною клітинною мембраною.

Хоча війки та джгутики служать для переміщення мікроорганізмів, вони візуально відрізняються. Війки – це короткі волосоподібні структури довжиною від 5 до 20 мкм, тоді як джгутики довжиною від 100 до 200 мкм.

Війки та джгутики структурно однакові. Раніше вважалося, що враховуючи їхню різницю в розмірі та розташуванню на клітинах, вони відрізняються за будовою. Однак, з’ясувалось, що усі війки та джгутики є мембранними циліндриками діаметром близько 0,2 мкм. Джгутик та війки

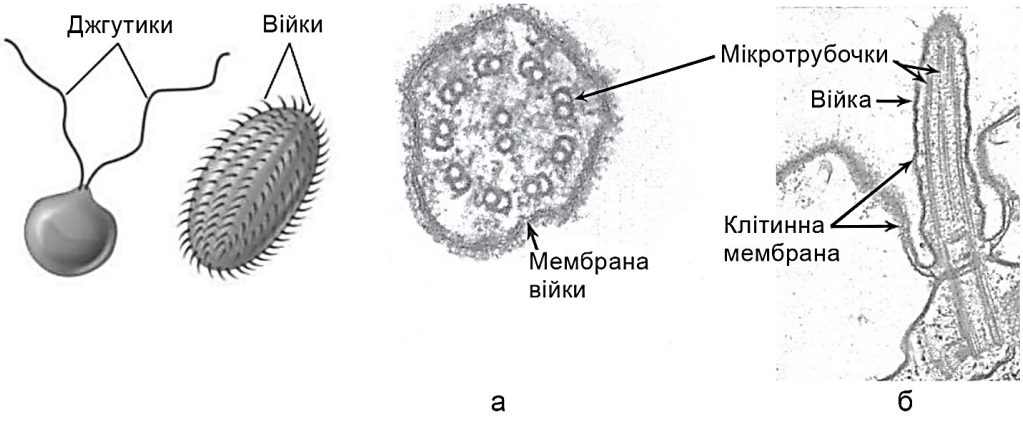


Рис. 4.25. Будова війок і джгутиків: (а) поперечний розріз війки найпростіших показує типове розташування 9+2 мікротрубочок як у війках, так і в джгутиках; (б) поздовжній розріз через війку, що показує поздовжню орієнтацію мікротрубочок і базальне тіло

еукаріотів – це вкритий оболонкою циліндр, що містить рівномірно розташовані порожнисті трубочки субфібрили, які розташовані по всій їх довжині. На поперечному розрізі видно дев'ять пар тісно з'єднаних субфібрил, що оточують одну центральну пару, розташованих по колу навколо двох центральних субфібрил (рис. 4.25). Схема розташування 9+2 є типовою для джгутиків і війок. Кожна пара з'єднана з іншою парою мікротрубочками, схожими на ті, що є в цитоплазмі.

Нагадаємо, що бактеріальні та архейні джгутики мають один молекулярний двигун, вбудований у клітинну мембрану. На противагу їм, кожен еукаріотичний джгутик або війка має сотні маленьких, АТФ-залежних двигунів.

Джгутики еукаріотів, як і прокаріотів, можуть переміщувати клітину, штовхаючи її вперед або тягнучи за допомогою ривків або плавних рухів. Розташування та кількість джгутиків використовують для ідентифікації джгутикових найпростіших і деяких водоростей.

У війчастих найпростіших вії розташовані рядами на поверхні клітини, де здійснюють регулярні веслоподібні або хвилеподібні рухи, чим забезпечують переміщення клітини. У деяких клітин війки беруть участь у процесі живлення, заганяючи поживні частки в рот.

Війки та джгутики рухаються зі швидкістю приблизно від 10 до 40 помахів за секунду та швидко рухають мікроорганізми. Джгутикові протисти *Cryptomonas stigmatica* переміщуються зі швидкістю 260 мкм/с (приблизно 40 довжин клітини за секунду); війчасті протисти *Paramecium caudatum* плавають приблизно 270 мкм/с.

4.2.13. Ендосимбіотична гіпотеза

Клітинні органели еукаріотів мають багато фундаментальних загальних рис із прокаріотичними клітинами. Вони містять кільцеві молекули ДНК, їх рибосоми відносяться до типу 70S, а мембрани містять компоненти електронтранспортного ланцюга (флавіни, хінони, Fe-S-білки, цитохроми) і виконують функцію дихального чи фотосинтетичного перетворення енергії.

Відповідно до симбіотичної гіпотези, мітохондрії походять від аеробних гетеротрофних бактерій, а хлоропласти – від ціанобактерій та примітивних еукаріотичних клітин, що стали їх хазяїнами. Надалі відбулася значна спеціалізація, завдяки якій функція генерації АТФ еукаріотичної клітини була передана органелам клітини.

Зовнішня мембрана еукаріотичної клітини на відміну від прокаріотичної не містить компонентів електронтранспортного ланцюга. З іншого боку, клітинні органели певною мірою самостійні. Мітохондрії та хлоропласти мають власну ДНК, щоправда, значна частина інформації, необхідної для синтезу їх білків, знаходиться в хромосомі ядра еукаріотичної клітини.

Питання для самостійного контролю

1. Охарактеризуйте принципові відмінності клітинної організації еукаріотів та прокаріотів.
2. У чому різниця в будові мембран бактерій і архей?
3. У чому подібність і відмінність у будові та функціях клітинної та зовнішньої мембрани грамнегативних мікроорганізмів?
4. Проаналізуйте відмінності в будові клітинних стінок грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів.
5. Назвіть особливості клітинної стінки архей?
6. Перерахуйте включення та запасні речовини та назвіть їх основні
7. Опишіть будову джгутиків $Гр^+$ і $Гр^-$ бактерій.
8. Опишіть функції поверхневих структур клітини.
9. Які є форми спокою у прокаріотів і чому вони мають більшу стійкість ніж вегетативні клітини?
10. Які переваги дає міксобактеріям соціальна поведінка?
11. Які переваги дає міксобактеріям наявність соціальної поведінки.
12. Які органели містять мікробні еукаріоти?
13. Чим відрізняється поділ клітин мікробних еукаріотів від прокаріотів?
14. Чим відрізняються мітохондрія та гідрогеносома структурно і метаболічно?
15. Які основні процеси відбуваються в хлоропласті?
16. Які докази підтверджують ідею про походження хлоропластів і мітохондрій?
17. Опишіть основні функції ретикулуму, комплексу Гольджі та лізосом.
18. Що формує цитоскелет еукаріотичної клітини?

РОЗДІЛ 5
РІСТ І КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

5.1. Ріст і розмноження

Розмноження – фундаментальна особливість усіх живих організмів. Відомі способи розмноження поділяються на два головні типи – статеве і нестатеве. Коли мікроорганізми забезпечені поживними речовинами і необхідними факторами зовнішнього середовища, вони здійснюють процеси метаболізму, ростуть і діляться (розмножуються). При цьому від поділу до поділу в клітині відбувається серія подій, які змушують її ділитися на дві дочірні, так званий цикл поділу клітини.

Для клітин прокаріотів процес поділу клітини складається з трьох окремих, але коротких фаз: спочатку фаза росту, під час якої маса клітини збільшується, потім фаза хромосомної реплікації, та, нарешті, хромосоми діляться і клітини фізично розділяються на дві незалежні нові клітини. У прокаріотів клітинний цикл поділяється на періоди B, C і D. Період B триває від кінця поділу клітини до початку реплікації ДНК. Реплікація ДНК відбувається протягом періоду C. Період D відноситься до стадії між закінченням реплікації ДНК і розділенням бактеріальної клітини на дві дочірні. Загальна тривалість клітинного циклу визначається періодом B, оскільки періоди C і D відносно фіксовані в часі. Тривалість періоду B визначається переважно умовами навколишнього середовища та збільшенням маси клітини.

Коли ДНК реплікується та переміщується на протилежні сторони клітини, утворюється серединна клітинна перегородка. У бактерій процес поділу хромосоми розпочинається в одній точці початку реплікації ДНК, тоді як у архей – синхронно в багатьох ділянках хромосоми. Крім того білки розпізнавання, що беруть участь в процесі ініціації у архей, гомологічні білкам еукаріотів, що свідчить про подібність між реплікацією ДНК архей та еукаріотів. Клітинний цикл (час генерації) різних видів бактерій може варіювати від півгодини до кількох діб.

В еукаріотичних мікроорганізмів клітинний цикл поділяється на чотири окремі фази: фаза G1 (підготовка до синтезу ДНК), фаза S (реплікація ДНК), фаза G2 (підготовка до мітозу, відома як інтерфаза) і фаза M (мітоз і цитокінез). M-фаза сама по собі складається з двох тісно пов’язаних процесів: мітозу, під час якого ядро клітини ділиться, і цитокінезу, під час якого цитоплазма клітини ділиться з утворенням двох дочірніх клітин. Активація кожної фази залежить від належного протікання та завершення попередньої фази. Клітини, які тимчасово або оборотно припинили поділ, входять в стан спокою, який називається фазою G0.

Під час інтерфази клітина росте, накопичуючи поживні речовини, необхідні для мітозу, копіює свою ДНК і деякі свої органели. Під час мітотичної фази (метафази) репліковані хромосоми, органели та цитоплазма поділяються між двома новими дочірніми клітинами.

Способи розмноження. У прокаріотів найбільш поширений спосіб розмноження – бінарний поділ (на дві рівні клітини), причому у грампозитивних він переважно відбувається побудовою септи (перегородки), а у грамнегативних – перетяжкою (рис. 5.1). Інші типи розмноження – брунькування та множинний поділ. При брунькуванні, яке іноді відбувається за допомогою додаткових виростів, можна виділити материнську та дочірню клітини (нерівний поділ). Множинний поділ відзначено у деяких ціанобактерій, коли з однієї клітини утворюється безліч дрібних беоцитів, які іноді рухливі. Нитчасті ціанобактерії здатні розмножуватися з допомогою гонідій та гормогоній.

Рис. 5.1. Бактерії *Escherichia coli* (а) у стадії поділу шляхом перетягування клітини, *Staphylococcus aureus* (б) – шляхом побудови перегородки

Для деяких метанотрофів характерним є розмноження шляхом утворення екзоспор. Складні форми розмноження зустрічаються в актиноміцетів. Це може бути проста фрагментація міцелію, утворення екзоспор на поверхні субстратного міцелію або конідіо- та спорангіоспор на спеціальних гіфах. Зверніть увагу, що утворення ендоспор у бактерій не є способом розмноження, оскільки з одної клітини утворюється одна ендоспора. У бактерій і архей розмноження не пов'язане зі статевим процесом.

У еукаріотичних мікроорганізмів розмноження часто пов'язано зі статевим процесом або з парасексуальним циклом. Статевий процес може відбуватись у формі копуляції, кон’югації або автогамії. Результатом статевого розмноження є збільшення різноманітності генетичного матеріалу нащадків. Цьому сприяє процес мейозу, обов’язковий у життєвому циклі тих видів, яким притаманний статевий процес.

Мейоз або редукційний поділ – це вид поділу еукаріотичних клітин, характерний тільки для статевих клітин, унаслідок якого хромосомний набір зменшується вдвічі, клітини переходять із диплоїдного стану в гаплоїдний. Мейоз складається з двох послідовних поділів, аналогічних мітотичним (з деякими відмінностями), інтерфаза між якими вкорочена. При копуляції відбувається злиття статевих клітин – гамет, утворених у процесі мейозу. При цьому ядра зливаються (каріогамія) та утворюється синкаріон, який об’єднує генетичний матеріал обох копулюючих гамет.

Вважається, що еволюція статевого розмноження почалась 2 млд. років тому у прокаріотів, які почали обмінюватися ділянками нуклеїнових кислот через процеси кон'югації, трансформації та трансдукції, а еукаріоти наслідували його від Останнього спільного еукаріотичного предка (Last Common Eukaryotic Ancestor – LECA).

Життєздатність нащадків, що з'являються у процесі статевого розмноження, значно більша, так як при цьому відбувається рекомбінація генів. Батьківські генотипи реорганізуються, і частини їх розподіляються у потомстві, що відрізняє статеве розмноження від нестатевого, де новоутворені організми є ідентичними до батьківських. Процеси рекомбінації забезпечують механізми стійкості до помилок, що можуть виникати на молекулярному рівні під час мейозу.

Ріст. У одноклітинних форм організмів поняття «ріст» переважно вживається в розумінні росту популяції (збільшення кількості клітин чи біомаси), оскільки розмір окремих клітин за час від поділу до поділу змінюється незначно. Ріст культури оцінюють за *часом генерації* – проміжком часу, за який число клітин подвоюється, та *швидкістю росту* – числом подвоєнь за одиницю часу.

Розрізняють збалансований ріст, коли збільшення всіх речовин та структур відбувається пропорційно. Якщо в середовищі є брак чи надлишок якихось компонентів, то ріст стає незбалансованим, тобто окремі продукти метаболізму можуть переважати. Цим прийомом користуються в біотехнології для спрямованого синтезу необхідних сполук.

Кількісна оцінка росту мікроорганізмів вимагає визначення числа клітин або біомаси в конкретний момент. Ці методи поділяють на прямі та непрямі. Прямі методи передбачають безпосередній підрахунок клітин під мікроскопом – у рахункових камерах чи фіксованих мазках. При цьому підраховуються як живі, так і мертві клітини, до того ж такий підрахунок можливий тільки для досить великих за розмірами мікроорганізмів, які не утворюють агрегати. До непрямих методів належать висіви на щільні поживні середовища, осадження на мембранних фільтрах і визначення параметрів, що пропорційно залежать від кількості клітин (біомаса, мутність суспензії, загальний азот, білок, поглинання кисню та виділення вуглекислого газу).

5.2. Поживні речовини та поживні середовища

Мікробна клітина містить у середньому (% за масою): вуглецю – 50, азоту – 14, фосфору – 3 та інші елементи. Для росту мікроорганізмів як у лабораторних умовах, так і в природі необхідна наявність поживних речовин для енергетичних та конструктивних процесів. Вимоги різних груп мікроорганізмів до джерел енергії та хімічних елементів визначаються їх метаболічними потребами та можливостями.

Основними біогенними елементами є вуглець, азот, фосфор, кисень, водень, сірка (табл. 5.1). Це компоненти білків, вуглеводів та жирів, а також

нуклеїнових кислот. Такі елементи потрібні у значних кількостях і тому їх відносять до макроелементів. До них відносять також калій, магній, натрій, кальцій і залізо, що зазвичай присутні в клітинах у вигляді йонів і виконують різні ролі. Наприклад, K^+ необхідний для активності великої кількості ферментів, зокрема ферментів білкового синтезу; Ca^{2+} визначає стійкість бактеріальних ендоспор до нагрівання; Mg^{2+} стабілізує рибосоми, багато ферментів і клітинні мембрани; Fe^{2+} та Fe^{3+} є частиною цитохромів та кофакторами білків-переносників електронів.

Таблиця 5.1

Склад синтетичного середовища для бактерій *Escherichia coli* та *Leuconostoc mesenteroides*

Основні компоненти	Незамінні сполуки
K_2HP0_4	16 Амінокислот
NH_4Cl	5 Вітамінів
$MgS0_4 \times 7H_20$	Нікотинова кислота
$FeS0_4 \times 7H_20$	Пантотенова кислота
$CaCl_2 \times 2H_20$	*p*-Амінобензойна кислота
$MnSO_4 \times nH_2O$	Фолієва кислота
Глюкоза	Гуанін
Мікроелементи	Урацил

Примітка: Основні поживні компоненти є базовими як для *Escherichia coli,* так і для *Leuconostoc mesenteroides,* а незамінні сполуки необхідно додавати для *L. mesenteroides*, оскільки вони не можуть їх синтезувати.

До мікроелементів, необхідних у мікромолярних кількостях, відносять йони таких металів, як хром, кобальт, мідь, молібден, марганець, нікель, селен, вольфрам, ванадій, цинк, що зазвичай входять до складу ферментів та кофакторів. Наприклад, Co^{2+} є компонентом вітаміну B_{12}, Cu^{2+} входить до складу цитохромоксидази, Mn^{2+} активує ферменти, каталізує перенесення фосфатних груп, Mo^{2+} входить до складу нітрогенази та нітратредуктази, Ni^{2+} є компонентом уреази, гідрогенази, Zn^{2+} входить до складу карбоангідрази, ДНК- і РНК-полімераз та ін.

Необхідні для мікроорганізмів кількості мікроелементів містяться у звичайній водопровідній воді. Деякі групи мікроорганізмів виявляють специфічні потреби. Наприклад, для діатомей необхідна наявність великої кількості сполук кремнію, з яких вони будують свої клітинні стінки.

Переважну більшість прокаріотичних мікроорганізмів (біля 99%) поки не вдається вирощувати в культурі саме тому, що не відомі специ-

фічні потреби в необхідних компонентах середовища для їх метаболізму. Так звані некультивовані мікроорганізми виявляють методами метагеномного аналізу шляхом порівняння генетичних послідовностей, але вивчити їх властивості стане можливим лише за можливості їхнього культивування.

Для позначення поживних потреб організму використовують терміни «прототроф» та «ауксотроф». Ауксотроф вимагає додавання в середовище факторів росту (певних органічних сполук, які сам мікроорганізм не може синтезувати), а прототроф, відповідно, не потребує таких факторів оскільки сам їх синтезує. Фактором росту в принципі може бути будь-яка речовина, яку мікроорганізм не може сам утворювати. Ауксотрофи часто є патогенами чи симбіонтами. Наприклад, молочнокислі бактерії потребують набору багатьох амінокислот.

Частіше ауксотрофність проявляється за вітамінами (кофакторами ферментів), оскільки вони відіграють важливу роль у метаболізмі. Так, пара-амінобензойна кислота є попередником фолієвої кислоти – кофактора ферментів, що переносять метильну групу; вітамін Н бере участь у метаболізмі жирних кислот; вітамін B_{12} – у перенесенні C_1-фрагментів; ліпоєва кислота переносить ацильні групи; пантотенова кислота – попередник коферменту А; вітамін B_2 – попередник ФМН і ФАД, переносників електронів; вітамін B_1 є кофактором 2-оксоглутаратдегідрогенази; вітамін B_6 – у перетвореннях аміно- та кетокислот; вітамін К є переносником електронів та бере участь у синтезі сфінголіпідів.

Якщо мікроорганізм не синтезує конкретні вітаміни, їх потрібно додати до поживного середовища. Зазвичай, як джерело комплексу вітамінів для мікроорганізмів використовують дріжджовий автолізат (автоліз дріжджів проводять при температурі 50 °С), до якого додають вітамін B_{12}, тому що в дріжджовому автолізаті його мало.

Для мікроорганізмів, які використовують у своєму метаболізмі йони двовалентного заліза, фактором росту вважаються сидерофори, що транспортують Fe^{2+} у клітину за аеробних умов середовища. Спектр споживаних органічних речовин, що вони окиснюють, у деяких мікроорганізмів дуже широкий, наприклад, у *Pseudomonas*, *Actinomyces*, в інших – досить вузький, наприклад, у облігатних метилотрофів.

У той самий час є мікроорганізми, здатні використовувати складні неприродні сполуки: пластики, барвники, пестициди. У деяких мікроорганізмів потреби в харчуванні настільки складні, що вони ростуть тільки всередині іншого організму, наприклад, внутрішньоклітинні паразити бделовібріони, рикетсії, хламідії.

Мікроорганізмам для росту необхідна різна кількість поживного субстрату в середовищі. Так, одні мікроорганізми ростуть лише при низьких концентраціях поживних речовин (від часток до 100 мг/л), тоді як звичайно вживані концентрації (1–10 г/л) лімітують їх ріст.

Різноманітні поживні середовища, що використовуються в мікробіологічній практиці для культивування мікроорганізмів, поділяються за складом, фізичним станом та призначенням.

За складом середовища ділять на натуральні та синтетичні. Синтетичні середовища мають певний хімічний склад і для кожної сполуки відома точна концентрація. Такі середовища застосовують для вивчення обміну речовин у мікроорганізмів. Натуральні середовища містять продукти тваринного чи рослинного походження, що мають складний та непостійний склад. Такі середовища використовують для накопичення біомаси мікроорганізмів. Багаті на різні органічні речовини натуральні середовища дозволяють задовольнити поживні потреби багатьох груп гетеротрофних мікроорганізмів, тому вони широко використовуються мікробіологами для первинного виділення з природних субстратів.

Найбільш поширені натуральні середовища на основі м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) та солодового сусла. МПБ – це кип'ячений екстракт м'ясного фаршу з додаванням пептону та кухонної солі у певних концентраціях, багатий на азотовмісні органічні сполуки, але бідний за вуглеводами. Солодове сусло, виготовлене шляхом настоювання розмеленого ячмінного солоду у водопровідній воді при нагріванні, навпаки, містить переважно вуглеводи.

За фізичним станом середовища ділять на рідкі, щільні та сипкі. Рідкі середовища є розчинами або суспензією інгредієнтів у воді. Для приготування щільних середовищ у рідке середовище додають ущільнюючі агенти: агар, желатин чи силікагель. Желатин – це білок із сполучної тканини тварин, що утворює гель за 25 °С. Його недоліком є те, що він плавиться за температури оптимального росту багатьох мікроорганізмів, до того ж його гідролізують мікробні протеолітичні екзоферменти.

Найбільш зручним і вживаним ущільнювачем поживних середовищ є агар, що плавиться при 100 °С і застигає при 45 °С. Агар – це складний полісахарид, що входить до складу морських бурих водоростей. Більшість мікроорганізмів не гідролізують його ферментами. Широко застосовується м'ясо-пептонний агар та сусло-агар (з 2% агару). Силікагель – це неорганічна сполука кремнію, що застосовується як тверда основа для синтетичних середовищ.

Сипучі середовища готують з мінерального або органічного наповнювача, який зволожують рідким середовищем. Як наповнювач використовують дерев’яну стружку, керамзит, зерно, висівки, тверді відходи сільського господарства та харчової промисловості. На таких середовищах, що імітують природні умови в гетерогенних місцях проживання (наприклад, грунт), добре розвиваються міцеліальні форми мікроорганізмів.

За призначенням середовища ділять на універсальні, елективні та індикаторні (диференціально-діагностичні). Універсальні середовища дозволяють підтримувати ріст більшості виявлених мікроорганізмів. Їх вико-

ристовують для накопичення мікробних клітин та початкового визначення видової різноманітності у змішаних популяціях.

Елективні середовища дозволяють накопичити бажані мікроорганізми за рахунок створення умов, сприятливих для мікроорганізмів певної групи. Такими середовищами користуються для отримання накопичувальних культур, які Сергій Виноградський запропонував застосовувати як перший етап виділення чистої культури з природних місць проживання. Ріст у накопичувальній культурі призводить до переважання у змішаній популяції представників певної групи мікроорганізмів, тоді як інші мікроорганізми в цих умовах не можуть активно розмножуватися.

Індикаторні середовища призначені для швидкого виявлення певних мікроорганізмів або виявлення певних особливостей обміну речовин за рахунок індикатора – речовини, що реагує зміною кольору на проявлення будь-якої властивості організму. Індикаторні (диференціально діагностичні) середовища найчастіше застосовують у санітарній та медичній мікробіології.

Для успішного культивування мікроорганізмів окремих груп необхідно підтримувати оптимальні для них значення ряду фізико-хімічних параметрів (pH, температура, освітленість, активність води тощо). В дослідженнях з цільового пошуку конкретних мікроорганізмів необхідно пам'ятати, що вміст поживних субстратів у природних місцях перебування мікроорганізмів, як правило, суттєво нижчий концентрації цих речовин у середовищах для лабораторних досліджень.

5.3. Накопичувальні та чисті культури мікроорганізмів

Через малі розміри мікроорганізмів робота в лабораторії проводиться не з однією особиною, а з популяцією організмів або культурою. Культура мікроорганізмів, що складається з клітин одного виду, носить назву чистої культури. У змішаній культурі вирощують мікроорганізми двох або більше видів. В природних місцях проживання мікроорганізми в більшості випадків ростуть у вигляді змішаних популяцій, тому на першому етапі ізоляції мікроорганізмів зазвичай користуються запропонованим С. Виноградським методом отримання накопичувальних культур. Накопичення бажаних мікроорганізмів при цьому відбувається за рахунок створення для них специфічних сприятливих умов культивування. При цьому інші організми, які також присутні в пробі, в цих умовах або не розмножуються, або ростуть повільно.

5.4. Періодичне культивування

При рості в рідких середовищах у закритих посудинах певного об'єму мікроорганізми знаходяться в закритій системі. Таке культивування називають періодичним, причому вся популяція проходить різні фази росту. Графічне зображення цього процесу називається кривою росту (рис. 5.2).

Кожна фаза періодичної культури характеризується певними фізіологічними параметрами популяції клітин в культурі.

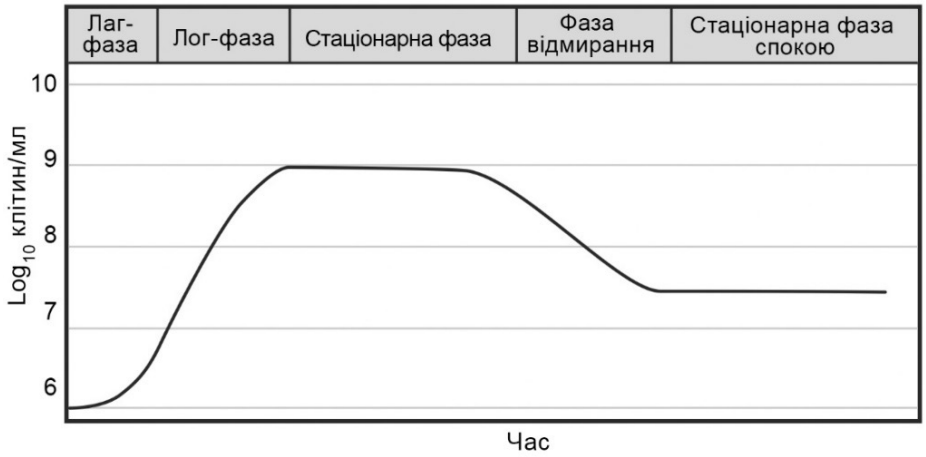


Рис. 5.2. Крива росту мікроорганізмів у закритій системі

Лаг-фаза – фаза адаптації клітин посівного матеріалу, внесених в свіже середовище, до умов цього середовища. Кількість клітин в лаг-фазі залишається незмінною. При цьому відбувається індукція синтезу мРНК відповідних необхідних ферментів та їх синтез. На завершення цієї фази клітини починають активно ділитися.

В експоненційній (логарифмічній) фазі росту клітини ростуть і діляться з максимальною для заданих умов швидкістю. Експоненційний ріст зображується на напівлогарифмічному графіку у вигляді прямої лінії. Зазвичай у біохімічних та фізіологічних дослідженнях культуру мікроорганізму використовують саме у цій фазі.

У міру вичерпання субстратів та накопичення продуктів метаболізму швидкість росту знижується і культура переходить у стаціонарну фазу, протягом якої процеси поділу та відмирання клітин у популяції перебувають у динамічній рівновазі. Для бактерій ця фаза досягається при концентрації в середньому близько 10^9 кл/мл, для водоростей та найпростіших – 10^6 кл/мл.

Коли вичерпання поживних речовин і накопичення продуктів метаболізму подолають певні порогові значення, культура переходить у фазу відмирання, яка іноді має логарифмічний характер. При цьому частина клітин популяції не відмирає, а переходить у довготермінову стаціонарну фазу спокою. Зазвичай життєздатні клітини залишаються в культурі протягом місяців або навіть років.

Фази росту бактерій, показані на рис. 5.2, відображають процеси в популяції клітин, а не в окремих клітинах. Таким чином, термін фаза росту має відношення лише до клітинних популяцій, а не до окремих клітин.

В експоненційній фазі збільшення кількості клітин N_t, відбувається в геометричній прогресії: $2^\circ \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow ... \rightarrow 2^n$ і через деякий час t визначається за формулою

$$N_t = N_0 \times 2^n,$$

де N_0 – початкова кількість клітин; n – число поділів.

Час генерації – це час між двома поділами (наприклад, у *Escherichia coli* – 20 хв), а константа швидкості росту – кількість поділів за годину (у *Escherichia coli* – 3). Найбільш швидкорослі фотобактерії подвоюються кожні 8 хв. Якщо масу такої клітини прийняти рівною 10^{-12} г, то при необмеженому рості через 48 год може утворитися біомаса, що у 4000 разів більше маси Землі, в той час як корова масою 500 кг за цей час продукує 1,0 кг біомаси.

Якщо розглядати популяцію не як набір індивідуальних особин, а як систему, що саморозмножується, швидкість зміни щільності такої системи пропорційна самій щільності, тобто, зміна слідує кінетиці реакцій першого порядку. При цьому припускається, що в експоненційній фазі росту всі клітини живі та ріст клітинної маси суворо пропорційний збільшенню кількості клітин.

Під урожаєм (або виходом) біомаси X розуміють різницю між максимальною X_{max} та вихідною X_0 масою бактерій:

$$X = X_{max} - X_0 \text{ (г сухої речовини).}$$

Важливе значення має економічний коефіцієнт Y, тобто. відношення врожаю клітин до кількості спожитого субстрату S, г:

$$Y = X/S.$$

Клітини в популяції знаходяться в різних фазах клітинного циклу, тобто в різному фізіологічному стані. Іноді в дослідженнях необхідно, щоб усі клітини у популяції ділилися одночасно (синхронно). Для цього використовують різні прийоми одержання синхронних культур, а саме: відбір клітин одного розміру шляхом фільтрації або диференціального центрифугування; різка зміна температури інкубації; вплив світла та ін.

5.5. Безперервне культивування

Для періодичного та безперервного культивування мікроорганізмів використовують ферментери, в яких контролюється процес вирощування (рис. 5.3), та термогойдалки. Проточна система культивування шляхом зміни швидкості протікання дозволяє в ферментері зафіксувати культуру в певній фазі (зазвичай експоненційній). При цьому склад середовища та умови росту зберігаються постійними. Подача свіжого середовища та видалення частини суспензії (протік) відбувається з тією ж швидкістю, з якою росте культура. Використовують два різні типи безперервних культур – хемостат і турбідостат.

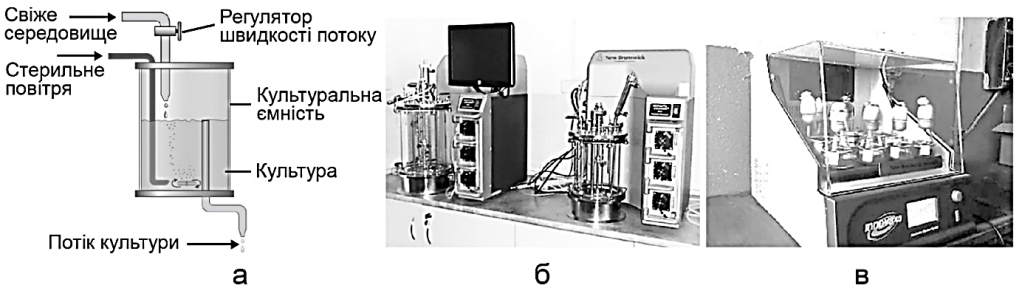


Рис. 5.3. Обладнання для культивування мікроорганізмів: (а) схема безперервної системи культивування; (б) ферментери; (в) термогойдалка

У хемостаті фіксується та підтримується один з хімічних параметрів процесу (концентрація субстрату, кисню), який є лімітуючим фактором.

Робота турбідостату заснована на підтримці постійної густини бактеріальної суспензії. Фотоелемент вимірює щільність суспензії, що витікає, і автоматично змінює швидкість потоку. Чим щільнішою стає культура, тим швидше подається свіже середовище. У ємності для культивування всі поживні речовини містяться у надлишку, а швидкість росту бактерій наближена до максимальної.

5.6. Ріст на поверхні. Біоплівки

Ріст мікроорганізмів у рідкому середовищі у вигляді суспензії називається планктонним ростом. Ріст планктону є природним станом для багатьох мікроорганізмів. Однак, ріст прикріплених до поверхні клітин є іншою досить поширеною формою існування в мікробному світі. Мікроорганізми, прикріплені до поверхні, часто утворюють популяцію клітин – біоплівку.

Біоплівка – це популяція клітин, покритих полісахаридною матрицею, яка прикріплена до поверхні (рис. 5.4). Ріст біоплівки дозволяє мікроорганізмам проявляти властивості, відмінні від планктонних клітин та має важливе значення в медицині та біотехнології. Формування біоплівки починається з прикріплення мікробних клітин планктону до поверхні, яке опосередковується фімбріями або пілями, а подальша колонізація поверхні – виробництвом липких позаклітинних полісахаридів.

Мікробна колонізація та ріст на поверхні викликає зміни в біоплівці, що призводять до змін у метаболізмі клітин та змушують розвивати в ній складні системи комунікації та диференціації. Зміни умов навколишнього середовища, наприклад, обмеження поживних речовин, сприяють розсіюванню мікроорганізмів із зрілої біоплівки та колонізації нових місць. Біоплівки забезпечують складні мікробні взаємодії, яких не спостерігається у планктонних бактерій. Утворення біоплівки дозволяє збуднику захворювання кістозним фіброзом *Pseudomonas aeruginosa* персистувати (персистенція – це тривале збереження збудника в організмі) та чинити опір видаленню з організму.

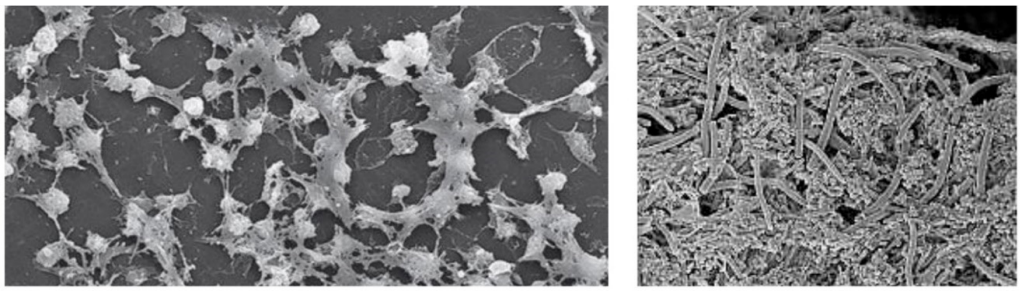


Рис. 5.4. Скануючі електронні мікрофотографії біоплівки клітин *Staphylococcus aureus* (а), що утворилася на постійному катетері та біоплівка зубної бляшки (б)

Бактерії в біоплівці також більш стійкі до антибіотиків, оскільки вони створюють бар'єр для проникнення антибіотика та сприяють метаболічній диференціації. Біоплівки також забезпечують фізичний бар'єр, що захищає клітини від поїдання протистами та дозволяє їм залишатися в безпечному та сприятливому середовищі існування.

В певних умовах біоплівки з різними організмами утворюють багатошарові структури, що називаються мікробними матами або килимками. Мати, що складаються з різних фототрофних і хемотрофних бактерій, поширені у витоках гарячих джерел, морських припливно-відливних зонах.

Біоплівки впливають на багато аспектів нашого життя, включаючи здоров'я людини. Вони причетні до важких для лікування інфекцій людських суглобів, імплантованих медичних пристроїв, таких як штучні серцеві клапани та катетери, відповідають за формування карієсу зубів та захворювання ясен. Біоплівки спричиняють закупорку труб, що використовуються для транспортування рідин. Утворення біоплівки на обшивці кораблів зменшує їх швидкість і енергетичну ефективність.

5.7. Ріст мікроорганізмів у природному середовищі

Умови природних середовищ складні та постійно змінюються. На мікроорганізми впливають градієнти поживних речовин та безліч інших факторів довкілля. Крім того, мікроорганізми не існують поодинці. Природні середовища існування містять як мікро-, так і макроорганізми, які вступають в симбіотичні відносини один з одним.

Більшість мікроорганізмів живе під впливом негативних факторів навколишнього середовища та дефіциту поживних речовинах, що затримує їх ріст. Мікроорганізми населяють оліготрофні середовища, в яких рівень поживних речовин низький, а деякі з них живуть в умовах «бенкету або голоду». Для мікроорганізмів в оліготрофних або поживно-лабільних середовищах першорядне значення має здатність виживати в умовах голоду.

У процесі еволюції мікроорганізми адаптувалися численними реакціями на голодування та стреси від дії негативних факторів навколишнього середовища. Деякі бактерії (наприклад, родів *Bacillus* і *Clostridium*) реагують на обмеження поживних речовин очевидними морфологічними, структурними та метаболічними змінами та переходом в стан спокою шляхом утворення ендоспор. Ендоспори не тільки мають високу стійкість до різноманітних стресових факторів (наприклад, високих температур і радіації), але й метаболічно перебувають у стані спокою.

Інші мікроорганізми переходять в стан спокою без значної перебудови клітини. Багато еукаріотичних мікроорганізмів і деякі бактерії утворюють цисти. Вони і не діляться активно, і не є мертвими.

Клітини повинні зберігати свою цілісність під час зупинки росту, щоб бути готовими реагувати на поліпшення умов. Тривале голодування викликає використання клітинних компонентів в якості поживних речовин. Багато клітин, що затримують ріст, зменшуються в розмірах. Це відбувається через втрату мембранних ліпідів, рибосом та запасних поживних речовин, оскільки їх компоненти утилізуються клітиною. Додатковою перевагою зменшення розміру клітин є збільшення співвідношення площі поверхні до об'єму, що у свою чергу, сприяє більш ефективному транспортуванню поживних речовин.

Білки, що утворюються у відповідь на голодування, допомагають вижити кількома способами. Білок голодування Dps зв’язує та захищає ДНК клітин, що голодують. Білки шаперони запобігають денатурації білків і відновлюють пошкоджені білки. Через ці та багато інших механізмів мікроорганізми важче знешкодити. Вони більш стійкі до голодування, шкідливих перепадів температури, окисного та осмотичного пошкодження та хімічних токсикантів. Ці зміни настільки ефективні, що деякі представники бактеріальної популяції роками переживають зупинку росту. Є докази того, що *Salmonella enterica serovar typhimurium* та деякі інші бактеріальні збудники стають більш вірулентними при голодуванні, що має велике практичне значення в медичній і промисловій мікробіології.

Після тривалого часу спокою клітини можуть перейти в життєздатний стан, але не культивований. Як тільки з'являються відповідні умови, життєздатні, але не культивовані мікроорганізми відновлюють ріст.

У популяції бактеріальних або архейних клітин, що ростуть в сприятливих умовах, часто спостерігається цікаве явище – утворення персистер (персистенція – це тривале збереження збудника в організмі). Персистери – це клітин, що зупиняють ріст та ідентифікуються за їхньою здатністю виживати під впливом антибіотиків, навіть якщо вони не мають генів стійкості до антибіотиків. У клітинах, що не ростуть, мішень антибіотика недоступна або неактивна та не зазнає впливу антибіотика.

Персистери представляють значний інтерес через їхню здатність викликати рецидиви інфекції після лікування антибіотиками. Основні питан-

ня про утворення персистер полягають у тому, коли і як це відбувається. Дані досліджень свідчать про те, що в деяких випадках невелика кількість клітин у популяції, що ростуть, спонтанно стають персистерними, навіть коли доступні поживні речовини. Ці зміни можна розглядати як спробу мікробної спільноти підготуватися до майбутніх можливих умов голоду. Також є докази того, що персистери виникають у відповідь на різні пускові механізми, причому голодування, ймовірно, є найважливішим.

5.8. Вплив фізичних і хімічних факторів на ріст мікроорганізмів

Мікроорганізми поширені повсюдно, тому вони піддаються впливу різних хімічних та фізичних природних факторів (температура, вміст кисню, хлоридів, активність води, pH, гідростатичний тиск, радіація), що призводить до необхідності вироблення відповідних захисних механізмів. Деякі мікроорганізми здатні існувати в умовах широкого спектру значень різних факторів. Проте, навіть якщо мікроорганізм забезпечений оптимальним набором необхідних поживних речовин, це не гарантує його ріст, якщо хімічні і фізичні фактори середовища не є сприйнятними.

5.8.1. Температура

По відношенню до температури мікроорганізми ділять на психрофіли, психротрофи, мезофіли, термофіли, екстремальні термофіли (рис. 5.5).

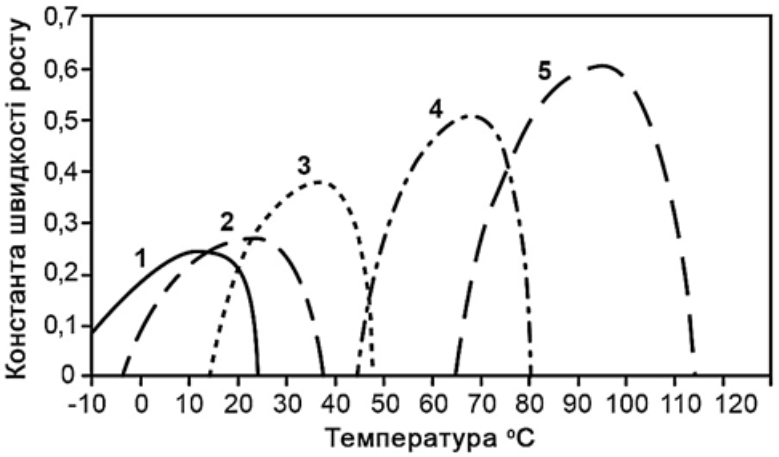


Рис. 5.5. Залежність швидкості росту мікроорганізмів від температури:
1 – психрофіли; 2 – психротрофи; 3 – мезофіли; 4 – термофіли; 5 – екстремальні термофіли

Межа життєздатності організму визначається наявністю рідкої води. Клітини деяких мікроорганізмів залишаються життєздатними при мінусових температурах, якщо у воді є антифриз. Оскільки місць перебування,

де створюються екстремально низькотемпературні умови, не так багато, більшість організмів має температурну межу вищу 0 °С. Існувати ж (зберігати життєздатність) мікроорганізми можуть навіть при -273 °С. Тому таким глибоким заморожуванням часто користуються для зберігання культур під рідким азотом або в ліофілізованому стані. Нижні межі росту обмежені температурою «застигання» мембрани, коли вона втрачає свої функції, а верхні – тепловою денатурацією життєво важливих білкових молекул.

До низькотемпературних місць проживання відносяться регіони Арктики, Антарктики, тундра, глибини океанів, де температура має постійне значення близько 4 °С. Високотемпературні місця – гейзери, вулканічні джерела, гарячі джерела, «чорні курці» (вихід вулканічних гарячих газів з розломів земної кори в глибинах океанів), де температура під високим тиском може досягати 360 °С.

В екстремальних за температурою проживання умовах, в цілому, переважають адаптовані, в першу чергу нефототрофні прокаріоти.

У табл. 5.2 наведено групи мікроорганізмів в залежності від температурних меж росту. Крива залежності швидкості росту від температури – певна для кожного організму (рис. 5.5).

Таблиця 5.2

Групи мікроорганізмів з різними температурними межами росту

Група	Температура росту, °С		
	Мінімальна	Оптимальна	Максимальна
Психрофіли	-36	< 20	25
Психротрофи	< 0	20–30	40
Мезофіли	15	25…30	40
Термофіли	40…50	55–65	70…80
Екстремальні термофіли	50…60	–	

До психрофільних мікроорганізмів відносять представників родів *Pseudomonas, Vibrio, Achromobacter, Flavobacterium, Cytophaga*, дріжджі, міцеліальні гриби, деякі водорості.

У таких мікроорганізмів виявлено особливий склад мембран зі зниженою точкою замерзання. Вони містять більше ненасичених жирних кислот, коротколанцюгових і розгалужених, і менше циклічних жирних кислот. У психрофілів білки менш стабільні за температури вище 20 °С.

Мікроорганізми багатьох видів здатні рости при 0 °С, хоча їх температурний оптимум перебуває в інтервалі 20–30 °С. Ці мікроорганізми відносять до психротрофних, і саме вони зазвичай відповідають за псування охолоджених продуктів харчування. Відношення до підвищеної температури росту для різних груп організмів представлено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Крайні вищі температурні межі життєдіяльності різних організмів

Організм	Життєдіяльність до t, °С
Еукаріотичні мікроорганізми	
Найпростіші	47
Водорості	56
Ацидотермофільні червоні водорості	70
Гриби	58
Прокаріотичні організми	
Фототрофи	84
Хемолітотрофи	113
Хемоорганогетеротрофи	100
Гіпертермофільні археї *Pyrodictium occultum*	110
Гіпертермофільні археї *Pyrolobus fumarii*	113

У термофілів білки стабільні при високих температурах, мембранні ліпіди містять більше тугоплавких насичених жирних кислот і більший відсоток гліколіпідів, усі ДНК і РНК – ГЦ-типу, рибосоми також більш термостабільні.

У зв'язку з розвитком біотехнології термофільні мікроорганізми становлять особливий інтерес, оскільки за культивування при високій температурі зменшується ймовірність росту небажаних мікроорганізмів. Термофіли значно швидше ростуть, причому серед них є автотрофні мікроорганізми, що дозволяє використовувати дуже прості середовища. Термофільні мікроорганізми є джерелом термостабільних ферментів для біотехнології. Так, термофільний мікроорганізм *Thermus aqaticus*, виділений з гарячих джерел, росте при температурі 70 °С, утворює термостабільну полімеразу (Tag-полімеразу), що використовується в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) для копіювання ДНК.

Стійкість мікроорганізмів до низьких і високих температур ставить питання про застосування спеціальних методів стерилізації та зберігання продуктів.

5.8.2. Відношення мікроорганізмів до кисню

За своїм відношенням до кисню всі мікроорганізми поділяються на дві великі групи: аероби, що ростуть у присутності O_2 та використовують його, і анаероби, здатні рости за його відсутності. Насправді, ставлення мікроорганізмів до молекулярного кисню значно складніше (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Відношення мікроорганізмів до кисню

Група мікроорганізмів	Використання кисню	Системи захисту від кисню	Тип енергетичного метаболізму	Приклад
Аероби				
Облігатні аероби	Потребують кисень	Мають	Аеробне дихання	*Micrococcus luteus*
Факультативні аероби	Не потребують O_2, але ростуть краще	Мають	Аеробне чи анаеробне дихання, чи бродіння	*Escherichia coli*
Мікроаерофіли	Потребують O_2 у концентрації нижче атмосферної	Мають	Аеробне дихання	*Spirillum volutans, Beggiatoa spp.*
Анаероби				
Аеротолерантні	Не потребують O_2	Мають	Бродіння	*Streptococcus pyogenes, Lactococcus lactis*
Облігатні анаероби	Не потребують, O_2 токсичний, пригнічує ріст	Не мають	Бродіння та анаеробне дихання	Метаногени, сульфідогени, ацетогени

В цілому слід відзначити, що для аеробних мікроорганізмів необхідно створювати умови для максимального насичення середовища киснем (перемішування середовища, барботування тощо), так як розчинність O_2 у воді невелика (при 20 °С – 6,2 мг/л), або вирощування здійснюють у тонкому шарі середовища. Для анаеробів, навпаки, важливо видалити кисень із середовища і надалі підтримувати анаеробні умови.

Усі типи відношення до кисню характерні для бактерій та найпростіших. Гриби в основному аероби, але деякі види, як правило, дріжджові анаморфи – факультативні анаероби. Існує невелика кількість суворо анаеробних видів. Водорості – майже завжди облігатні аероби.

Значення кисню визначається його роллю кінцевого акцептора електронів під час здійснення аеробного дихання, сильного окиснювача для деяких субстратів, наприклад, метану або ароматичних сполук за допомогою моно- та диоксигеназ, наприклад, при синтезі стероїдів у дріжджів.

Токсична дія O_2 на мікроорганізми полягає в інактивації чутливих до окиснення білків (наприклад, сульфгідрильних груп нітрогенази), а також в утворенні надактивних форм кисню. Перекисний аніон і супероксидний

радикал, що утворюються найчастіше, видаляються спеціальними ферментами. Каталаза розкладає перекис у реакції $2H_2O_2 > 2H_2O + O_2$, а пероксидаза – в реакції $RH_2 + H_2O_2 > R + H_2O$, де R – окиснений субстрат пероксидазної реакції. Супероксидний радикал видаляється ферментом супероксиддисмутазою:

$$2{\bullet}O_2^- + 2H^+ > H_2O_2 + O_2$$

Під дією світла пігмент-фотосенсибілізатор переходить у збуджений стан і передає енергію на молекулу кисню з утворенням синглетного кисню $\bullet O_2$, який взаємодіє з органічними молекулами, в першу чергу, з ненасиченими жирними кислотними залишками фосфоліпідів та ліпопротеїнів. Функцію «гасіння» синглетного кисню у клітині виконують каротиноїди. Саме тому нефотосинтезуючі мікроорганізми, що ростуть на світлі, мають інтенсивне жовте або червоне забарвлення.

У аеробів та факультативних анаеробів у клітинах присутні супероксиддисмутаза, каталаза та пероксидаза. У багатьох облігатних анаеробів цих ферментів немає. Аероби також мають ферменти, чутливі до кисню (наприклад, нітрогеназу). У таких випадках у клітинах є різні механізми захисту від токсичної дії кисню.

Незважаючи на токсичність кисню для облігатних анаеробів, ці мікроорганізми можуть існувати в аеробних місцях перебування, але в спільнотах з аеробними або факультативноаеробними організмами, які поглинають O_2.

Отже, різне відношення мікроорганізмів до кисню (облігатні аероби, факультативні аероби, мікроаерофіли, аеротолерантні анаероби чи облігатні анаероби) залежить від того, використовують вони кисень чи не використовують, мають системи захисту від перекису водню та активних форм кисню чи не мають (табл. 5.4).

Показником наявності кисню в середовищі може бути окисно-відновний потенціал Eh, який змінюється від -500 до +800 мВ. Чим більше його негативне значення, тим найбільш відновним є середовище (анаеробні умови).

5.8.3. Показник кислотності середовища

Показник кислотності середовища (pH) змінюється від 0 до 14 (рис. 5.7). У кислому середовищі у водних розчинах переважають йони гідроксонію H_3O^+, в лужному – гідроксилу OH^-. Концентрація водневих йонів впливає на йонний стан, отже, на доступність для клітин багатьох метаболітів, так як в незарядженому стані вони легше проникають через мембрану. У табл. 5.5 наведено субстрати, що відображають всю шкалу значень pH, та мікроорганізми, здатні до активного існування за цих умов.

По відношенню до оптимальних для росту значень pH мікроорганізми поділяють на ацидофільні (0,0–5,5), нейтрофільні (5,5–8,0) і алкалофіль-

ні (8,5–11,5). Більшість бактерій та найпростіших – нейтрофіли; гриби та водорості загалом віддають перевагу нижчим значенням pH, ціанобактерії ростуть при високих pH.

Таблиця 5.5

Приклади середовищ з відповідними значеннями pH та мікроорганізмів з відповідними оптимальними pH

Група	Субстрат	pH	Мікроорганізми
Ацидофіли	Вулканічні води та ґрунти	0,5–1,0	Археї
	Шлунковий сік	1,5	*Helicobacter pylori*
	Лимонний сік	2,0	*Cephalosporium, Saccharomyces, Candida, Bacillus, Acidithiobacillus, Sulfolobus, Thermoplasma,* Термофільні водорості
	Шахтні води	2,0–2,5	
	Розведений оцет	3,0	
	Ревень, персик	3,5	
	Кислий грунт	4,0	
	Томати	4,5	
	Сир	5,0	
	Кислотні дощі	5,3	
	Квашена капуста	5,5	Більшість мікроорганізмів
	Горох	6,0	
	Креветки	6,5	
Нейтрофіли	Чиста вода	7,0	
Алкалофіли	Морська вода	7,8	
	Лужні грунти	8,8	Ціанобактерії
	Лужні озера	10,0	*Nitrosomonas, Nitrobacter*, *Bacillus*, *Ectothiorhodospira*
	Мильні розчини	10,5	
	Нашатирний спирт	11,0	
	Насичений розчин вапна	12,0	Уробактерії

Незважаючи на екстремальні для деяких мікроорганізмів pH у навколишньому середовищі, значення внутрішньоклітинного pH досить постійне. У рослинних клітин реакція цитоплазми слабо кисла (5,0–6,0), у тварин – 7,0. У алкало- та ацидофільних мікроорганізмів pH цитоплазми підтримується на рівні 7,5. Стабільності внутрішньоклітинного pH сприяє мала проникність мембрани для протонів. Однак, оскільки протони повільно дифундують по градієнту, клітина використовує енергозалежні механізми викиду протонів.

Алкалофілами є, наприклад, деякі види *Bacillus*, архей, фототрофні пурпурові бактерії. Деякі з них є продуцентами гідролітичних ферментів (протеаз та ліпаз), що зберігають свою активність за лужних умов, тому їх використовують в пральних порошках для видалення білкових і жирових плям.

При невеликому закисненні бактерії використовують антипорт протонів з Na^+ і K^+. При стрибкоподібному падінні pH включається синтез спеціальних шаперонів (білків кислотного шоку). Вони запобігають кислотній денатурації білків і відновлюють конформацію вже денатурованих білків.

У процесі росту мікроорганізми можуть змінювати pH середовища, утворюючи кислі чи лужні продукти. Наприклад, *E. coli* реагує на підвищення кислотності синтезом декарбоксилаз амінокислот. Аміни, що утворюються в результаті цього, підлужують середовище. Навпаки, підвищення pH середовища стимулює синтез дезаміназ амінокислот, що веде до підкислення середовища. Такі механізми зазвичай є у pH-толерантних мікроорганізмів.

5.8.4. Активність води

Для метаболізму важливу роль відіграє активність води (a_w), яка рівна відношенню тиску парів розчину до тиску парів чистої води. Активність води залежить як від її наявності, тобто від ступеня висушування, так і від кількості розчинених у ній речовин.

Одні мікроорганізми здатні рости лише в рідкому середовищі, а інші, названі ксерофілами, ростуть при низьких значеннях a_w. У природі такі місця проживання є в пустелях і горах. До того ж, там активність води може різко змінюватись протягом доби (у нічний час випадає роса, тоді a_w=1). У табл. 5.6 наведено приклади мікроорганізмів, що живуть при різних значеннях активності води у відповідних місцях їх перебування.

Оскільки мікроорганізми відокремлені від середовища напівпроникною мембраною, у гіпотонічних розчинах вода прагне проникнути по градієнту концентрацій розчинених речовин усередину клітини, і потрібно докласти певної сили (осмотичний тиск), щоб запобігти надходженню води в клітину. У клітинах грампозитивних бактерій осмотичний тиск може досягати в розведених розчинах 20 атм і більше.

У гіпертонічних розчинах має місце зворотне явище (відсмоктування води з клітин), що викликає плазмоліз. Одномолярний розчин будь-якої сполуки, якщо вона не дисоціює, створює тиск 22,4 атм, 10% розчин сахарози (0,29 М) – 6,5 атм, 10% розчин NaCl (1,72 М) – 77 атм). Високі концентрації кухонної солі та цукрів давно використовуються для консервування харчових продуктів.

Організми, здатні жити в середовищах з високим вмістом цукру, називають осмофілами, а ті, що здатні рости в дуже сухих середовищах (які

стають сухими через брак води, а не через розчинені речовини), називають ксерофілами. Приклади цих організмів наведено в таблиці 5.6.

Таблиця 5.6

Субстрати з різними значеннями активності води та мікроорганізми, що мешкають на/в них

a_w	Субстрат	Мікроорганізми
1,000	Чиста вода	*Caulobacter, Spirillum*
0,995	Кров та тканини людини	*Streptococcus, Escherichia*
0,980	Морська вода	*Pseudomonas, Vibrio*
0,950	Хліб	Грампозитивні палички
0,900	Шинка, кленовий сироп	Грампозитивні коки
0,850	Салямі	*Saccharomyces rouxii*
0,800	Фруктові джеми	*Penicillium*
0,750	Солона риба, солоні озера	*Halobacterium, Halococcus*
0,700	Сухофрукти, цукерки	Ксерофітні гриби

У природі осмотичні ефекти становлять інтерес головним чином у середовищах існування з високою концентрацією солей. Високі концентрації різних солей є в Мертвому морі, Куяльницькому лимані, солоних озерах, содових озерах, солеварнях. Морська вода містить близько 3% хлориду натрію (NaCl) плюс невелику кількість інших мінералів та елементів. Мікроорганізми, що населяють морське середовище, майже завжди потребують NaCl і оптимально ростуть при a_w морської води 0,98 (табл. 5.6). Такі організми називають галофілами.

Потреба галофілів у NaCl є абсолютною і не може бути замінена іншими солями, такими як хлорид калію (KCl), хлорид кальцію ($CaCl_2$) або хлорид магнію ($MgCl_2$).

Хоча галофілам для росту потрібен певний рівень NaCl, оптимум NaCl варіює залежно від організму та залежить від середовища існування (рис. 5.6). Наприклад, морські мікроорганізми зазвичай найкраще ростуть при 1–4% NaCl, організми з гіперсолоних середовищ (середовищ, більш солоних, ніж морська вода) найкраще ростуть при 3–12% NaCl, а організми з надзвичайно гіперсолоних середовищ потребують ще вищих рівнів NaCl.

На відміну від галофілів, галотолерантні організми (виділені з суміші прісної та морської води), можуть переносити певний рівень розчинених речовин, але найкраще ростуть за їх відсутності. Галофіли, здатні рости в дуже солоному середовищі, віднесено до екстремальних галофілів (рис. 5.6). Ці організми потребують дуже високого рівня NaCl, зазвичай 15–30%, для оптимального росту та часто взагалі не здатні рости за нижчих кон-

центрацій NaCl. Наприклад, для морських бактерій *Aliivibrio fischeri* оптимальною є концентрація NaCl близько 5%, для екстремальних галофілів – від 15 до 30%.

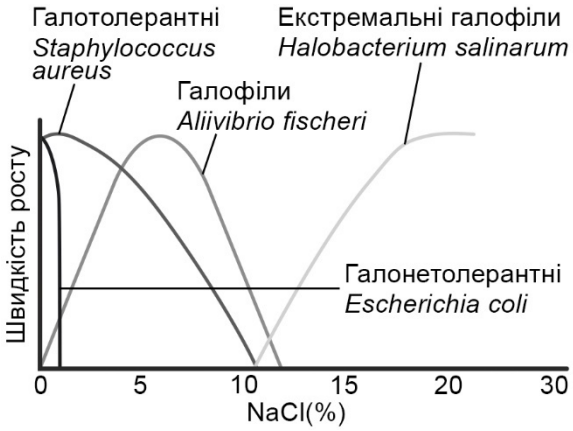


Рис. 5.6. Групи мікроорганізмів за відношенням до NaCl

Певні особливості галофільних мікроорганізмів дозволяють їм існувати при високих концентраціях солей. Відомо, що багато внутрішньоклітинних компонентів цих мікроорганізмів потребують високих концентрацій Na^+ і K^+. Наприклад, у *Halobacterium cutirubrum* активність аспартаттранскарбамілази при 3,5 М NaCl в 4 рази вище, ніж при 2 М NaCl. Білки галофілів містять багато аспартату та глутамату, тобто вони більш «кислі». В білках встановлюються нові гідрофобні взаємодії, що призводять до більш щільної упаковки глобул.

На поверхні клітин працює механізм «білкового щита» (S-шари), з якого назовні експонуються групи COOH амінокислот, що утримують Na^+. Ці групи формують «гідратовану» оболонку за рахунок електростатичного орієнтування диполів води. Галофіли здійснюють активний транспорт йонів із клітини, таким чином підтримуючи деякий «осмостаз». Іноді клітини можуть активно викачувати з клітини Na^+, замінюючи його на K^+ (табл. 5.7).

Коли організм переноситься з середовища з високою активністю води (a_w) в середовище з низькою активністю води, він підтримує позитивний водний баланс, збільшуючи внутрішню концентрацію розчиненених речовин. Це можливо або шляхом закачування розчинених речовин у клітину з навколишнього середовища, або шляхом синтезу цитоплазматичних розчинених речовин.

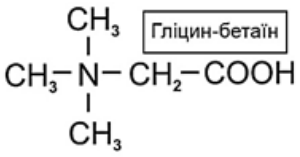
Утримування води у галофілів здійснюється шляхом синтезу внутрішньоклітинних осморегуляторів (осмолітів), нейтральних по відношенню до метаболітів клітини. Іноді такі речовини утворюються у значних

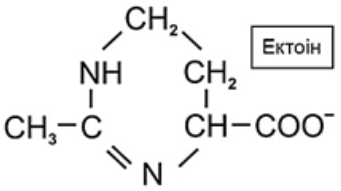
Таблиця 5.7

Концентрації деяких йонів усередині та поза клітинами галофільної *Halobacterium cutirubrum*

Йон	Концентрація (М)	
	у середовищі	у клітині
Na^+	3,30	0,80
K^+	0,05	5,30
Mg^{2+}	0,13	0,12
Cl^-	3,30	3,30

кількостях. Наприклад, *Dunaiella viridis* накопичує гліцерол до 30% від маси клітини. Цю властивість застосовують для промислового одержання гліцеролу. Для мікроорганізмів відомі різні осморегулятори: цукроспирти, глікозилгліцериди, бетаїни, гліцерол, деякі амінокислоти (табл. 5.8).





Таблиця 5.8

Приклади осмолітів, які утворюють мікроорганізми

Організм	Осморегуляторів	Мінімальна a_w
Нефототрофні бактерії	Гліцин-бетаїн, пролін, глутамат	0,97–0,90
Прісноводні ціанобактерії	Сахароза, трегалоза	0,98
Морські ціанобактерії	α-Глікозил-гліцерол	0,92
Морські водорості	Маннітол, пролін, глікозиди, диметилсульфон пропіонат	0,92
Ціанобактерії солених озер	Гліцин-бетаїн	0,90–0,75
Галофітні аноксигенні фототрофні бактерії	Гліцин-бетаїн, трегалоза, ектоїн	0,90–0,75
Екстремально галофільні археї	K^+ (закачують всередину з обміном на Na^+)	0,75
Dunaliella (галофітна зелена водорість)	Гліцерол	0,75
Ксерофільні дріжджі	Гліцерол	0,83–0,70

Гліцинбетаїн, аналог амінокислоти гліцину, широко поширений серед галофільних бактерій. Інші поширені сумісні розчинені речовини включають цукри, такі як сахароза та трегалоза, диметилсульфоніопропіонат (що виробляється морськими водоростями) та гліцерин, поширену розчинену речовину в ксерофільних грибах, організмах, які ростуть при найнижчій відомій активності води (табл. 5.8).

Іноді такі речовини утворюються у значних кількостях. Наприклад, *Dunaiella viridis* накопичує гліцерол до 30% від маси клітини. Цю властивість застосовують для промислового одержання гліцеролу.

На відміну від цих органічних розчинених речовин, KCl є осмолітом екстремально галофільних архей, таких як *Halobacterium*, та кількох екстремально галофільних бактерій.

Осморегулятори добре утримують воду, тому можливе їх застосування в косметичній промисловості у складі зволожуючих кремів (ектоїн з галофільних аноксигенних фототрофів).

5.8.5. Гідростатичний тиск

Більшість мікроорганізмів, які живуть на поверхні та не зазнають суттєвих змін тиску, ростуть при одній атмосфері. Але є місця, де тиск значно вищий атмосферного. Показано, що клітини мікроорганізмів можуть витримувати глибокий вакуум (10^{-10} – 10^{-12} атм), щоправда, це не активно життєдіяльні клітини, а спори. Для *Bacillus subtilis* та *Escherichia coli* виявлено, що вони краще ростуть при тиску нижче атмосферного.

В океанах фотична зона, куди ще проникає світло, розташована на глибині до 300 м. На глибинах до 1000 м зосереджена основна біологічна активність (99%), а в решті 75% водної товщі спостерігається всього 1% біологічної активності.

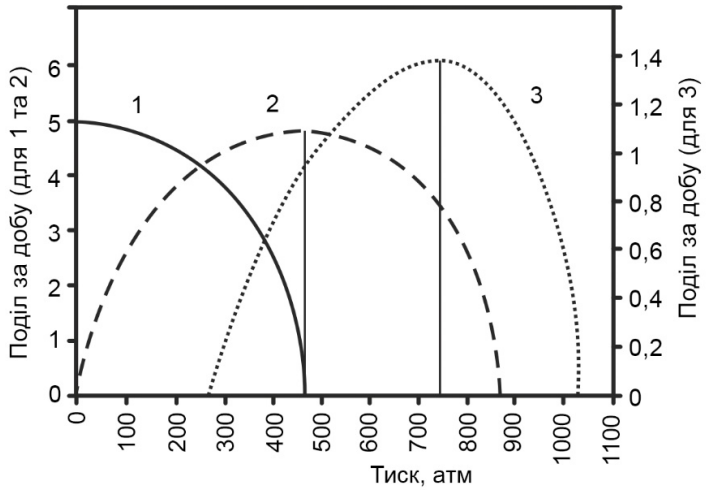


Рис. 5.7. Групи мікроорганізмів по відношенню до гідростатичного тиску:
1 – баротолерантні; 2 – помірні барофіли; 3 – екстремальні барофіли

По відношенню до високого тиску мікроорганізми поділяються на барочутливі (п'єзочутливі) організми (зазвичай із газовими вакуолями), які при підвищенні тиску перестають рости; баротолерантні (п'єзотолерантні), що витримують до 400 атм, але здатні рости також при звичайному тиску; барофільні (п'єзофільні), які для росту потребують підвищеного тиску (рис.5.7). Помірні барофіли витримують тиск до 850 атм, а екстремальні – понад 1000 атм.

Мікроорганізми виявлені в найглибшому місці Світового океану – Маріанській западині (10935 м) при тиску більше 1000 атм. Найвищий штучно створений тиск, при якому ще зберігались мікроорганізми, – 1400 атм.

5.8.6. Електромагнітне випромінювання

Електромагнітні випромінювання поділяються в залежності від довжини хвилі на іонізуюче випромінювання (γ- та рентгенівські промені з довжиною хвилі < 200 нм), ультрафіолетове випромінювання, видиму область, інфрачервоне випромінювання та радіохвилі(рис. 5.8). За характером дії випромінювання поділяються на ті, що здійснюють: фізіологічну, летальну, мутагенну, теплову та механічну дію.

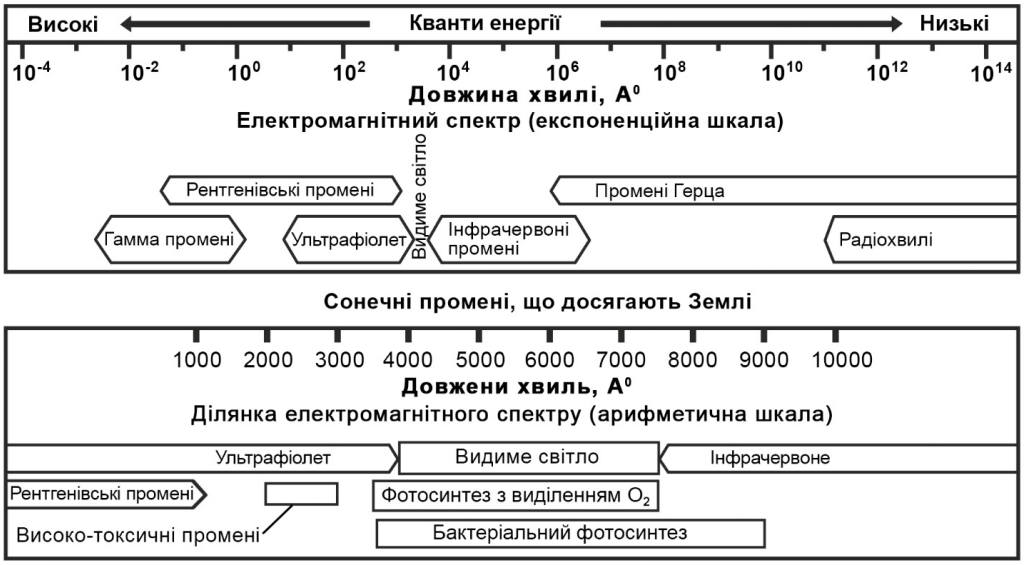


Рис. 5.8. Спектри електромагнітного випромінювання та характер його дії на організми

Фізіологічну дію мають ближній ультрафіолет, видиме світло та інфрачервоні промені, відповідно 350-400-800-1100 нм (рис. 5.8). Це насамперед процес конверсії сонячної енергії в хімічну. Різні фототрофні мікроорганізми поглинають світло різної довжини хвилі.

Існують фотозалежні синтези у нефотосинтезуючих мікроорганізмів, наприклад, утворення каротиноїдів у мікобактерій. У нефототрофних мікроорганізмів акцепторами світла вважають також порфірини та флавіни. Однак світло таких довжин хвиль не завжди впливає позитивно на клітину. Так, під дією інфрачервоних променів може відбуватися перегрів клітини, а видиме світло в аеробних умовах призводить до утворення синглетного кисню, що спричиняє фотоокиснення клітинних ферментів. Як захист мікроорганізми синтезують каротиноїди, що служать «гасниками» синглетного кисню.

Ультрафіолет залежно від довжини хвилі та дози може викликати як летальний, так і мутагенний ефект. При цьому спостерігається пошкодження насамперед молекул ДНК (особливо при 260 нм). У молекулі виникають тимінові димери, які інгібують реплікацію. Ці пошкодження можуть бути усунені двома шляхами: фотореактивацією та темновою репарацією. В першому випадку на пошкоджене місце «сідає» фермент, що активується синім (видимим) світлом, і виправляє структуру ДНК, ліквідуючи зв'язки між тиміновими основами в димерах.

В іншому випадку працюють ферменти ендонуклеаза (вирізає пошкоджену ділянку), полімераза (синтезує правильну структуру з комплементарного ланцюга) та лігаза (зшиває синтезовані послідовності), для яких світло не потрібно. Ультрафіолет з 325–400 нм також шкідливий для мікроорганізмів, оскільки поряд з утворенням тимінових димерів відбувається руйнування триптофану та утворюються його токсичні фотопродукти, що діють як хімічні мутагени.

Іонізуюче випромінювання представлене дуже короткими хвилями з високою енергією. Низькі рівні такого випромінювання можуть викликати у мікроорганізмів мутації, а високі майже завжди призводять до загибелі. Наслідком іонізуючого опромінення є розриви водневих зв'язків, окиснення подвійних зв'язків, руйнування кільцевих структур, полімеризація деяких молекул. Присутність кисню посилює ці ефекти, можливо, через утворення радикалів гідроксилу (OH^-), але головною причиною є деструкція та пошкодження ДНК.

Мікроорганізми суттєво різняться за стійкістю до радіації. Є мікроорганізми, виділені з опромінених продуктів і води атомних реакторів *(Pemococcus radiodurans, Shizosaccharomyces pombe, Boda marina* – джгутикові найпростіші). Стійкість, мабуть, пов'язана з високою ефективністю репараційних систем. Однак для більшості мікроорганізмів ультрафіолетове та іонізуюче випромінювання у певних дозах є згубними, тому такі випромінювання використовують при стерилізації.

Слід зазначити, що в природі мікроорганізми зазнають на собі впливу не одного, а одразу багатьох факторів, наприклад, у екосистемах «чорних курців» – температури, тиску, високого вмісту сульфідів та важких металів.

5.8.7. Контроль росту мікроорганізмів

Як зазначалося вище, для культивування мікроорганізмів при наукових дослідженнях чи виробництві продуктів харчування або інших корисних продуктів з використанням мікроорганізмів-продуцентів їх необхідно забезпечити як оптимальним набором поживних речовин, так і оптимальними хімічними та фізичними умовами середовища.

З іншого боку, існує протилежна необхідність в контролі росту мікроорганізмів, коли їх ріст не бажаний і коли вони своїм ростом приносять шкоду. Наприклад, при зберіганні продуктів харчування необхідно обмежити доступ мікроорганізмів та пригнітити їх ріст для того, щоб запобігти псуванню. В інших випадках край необхідною є стерилізація, яка передбачає повне знищення всього живого як на поверхні, так і всередині об'єкта.

Оскільки мікроорганізми поширені повсюдно, то повітря, вода, різні компоненти поживних середовищ, посудини, інструменти та робочі поверхні – все це містить мікроорганізми. Присутність сторонніх організмів може суттєво спотворювати результати мікробіологічних досліджень, перешкоджати виділенню та підтримці чистої культури. Тому всі застосовувані в роботі об'єкти повинні бути простерилізовані та захищені від подальшого забруднення. Стерилізація є край необхідним заходом в медицинській практиці.

Стерилізуючими агентами можуть бути речовини або фізичні фактори, що діють згубно, а також процеси, що відокремлюють живі мікроорганізми від об'єкта. Способи стерилізації ділять на термічні та холодні.

Термічна стерилізація. Основним агентом термічної стерилізації є висока температура. У мікробіології широко використовують кілька методів термічної стерилізації: прожарювання в полум'ї, стерилізація «сухим жаром» та автоклавування. Прожарювання в полум'ї застосовують для стерилізації невеликих металевих інструментів (мікробіологічних петель, пінцетів, ножиць, голок) безпосередньо перед їх використанням.

Стерилізацію високою температурою (сухим жаром) широко застосовуєть у мікробіології для обробки скляного лабораторного посуду та деяких в'язких рідин (вазелінова олія, гліцерол) та порошків (тальк, крейда). Підготовлені об'єкти поміщають на полиці сухожарової шафи та після досягнення температури 160–170 °С витримують 2 год. Стерилізують тільки чистий, сухий посуд, загорнутий у щільний папір.

Автоклавування – це спосіб стерилізації насиченою водяною парою високої температури під тиском вище атмосферного. При підвищенні тиску температура пари зростає та може перевищувати 100 °С. У мікробіології найчастіше використовують автоклавування під надлишковим тиском 0,5 та 1,0 атмосфери. Стерилізацію проводять у спеціальному обладнанні – автоклаві. Шляхом автоклавування зазвичай стерилізують поживні середовища та розчини в різних ємностях. При виборі режиму стерилізації

враховують термостійкість компонентів поживних середовищ та розчинів. Термостійкі об'єкти, в яких можуть бути спори, автоклавовують 1–2 год при 1,0–2,5 атм.

Холодна стерилізація. Методи холодної стерилізації застосовують у тому випадку, якщо об'єкт не витримує нагрівання. Фільтруванням стерилізують синтетичні середовища та розчини, до складу яких входять термолабільні або леткі компоненти. Нітроцелюлозні фільтри з діаметром пор 0,2–0,7 мкм затримують клітини мікроорганізмів. Самі фільтри стерилізують автоклавуванням.

Стерилізація за допомогою газів ефективна при обробці оптичного, радіоелектронного обладнання та виробів з термолабільних пластмас. Найчастіше застосовують такі гази, як оксиди етилену та пропілену, метилбромід, озон, пари формальдегіду та глутарового альдегіду.

Стерилізацію опроміненням використовують для обробки приміщень, обладнання, об'єктів медичної та харчової промисловості. Як діючі агенти застосовують різні види випромінювань (ультрафіолетове, рентгенівське, α-, β- та **γ**-випромінювання) з дозами не менше 2–3 мрад. У мікробіологічній лабораторії повітря та робочі поверхні стерилізують тривалим опроміненням ультрафіолетом (λ=260 нм впродовж 12–24 год). Стерилізацію опроміненням застосовують також при виготовленні одноразового пластикового посуду, медичних матеріалів, шприців та інструментів для мікробіологічних досліджень.

Хімічні агенти, які контролюють ріст мікроорганізмів. Для практичних цілей важливо здійснювати контроль за ростом мікроорганізмів та пригнічувати ріст небажаних форм. Тому буває необхідно убити мікроорганізми чи призупинити їх ріст. Агенти, що викликають такі наслідки, називають відповідно бактерицидними та бактеріостатичними. Характер дії антимікробного агента часто залежить від концентрації.

Речовини однієї групи призводять до пошкодження поверхневих клітинних структур. Наприклад, 70%-й етанол коагулює білки, спричиняючи бактерицидну дію. Феноли, крезоли, нейтральні мила та різні поверхнево-активні речовини порушують вибіркову проникність цитоплазматичної мембрани.

Друга група поєднує речовини, що діють як ферментні отрути та порушують нормальний метаболізм (наприклад, важкі метали – мідь, ртуть, свинець). Вони зв'язуються з SH-групами білків, порушуючи їхню просторову структуру. Ціанід і CO діють як дихальні отрути, блокуючи цитохромоксидазу. 2,4-Динітрофенол є роз'єднувачем процесів окиснення та фосфорилювання. Арсенат інгібує субстратне фосфорилювання. Антиміцин А порушує процес перенесення електронів по дихальному ланцюгу, інгібуючи цитохром с-редуктазу. Фторацетат блокує роботу циклу трикарбонових кислот.

Інша група включає аналоги нормальних метаболітів, які конкурують із ними за каталітичний центр ферменту. На цьому ґрунтується терапевтична дія сульфаніламідних препаратів. Наприклад, у бактерій парааміно-бензойна кислота є попередником тетрагідрофолату. При включенні структурного аналога (сульфаніламіду) утворюється нефункціонуючий фермент і ріст бактерій зупиняється.

Питання для самостійного контролю

1. Назвіть відмінності в клітинному циклі про- та еукаріотичних мікроорганізмів.
2. У чому переваги статевого розмноження над нестатевим.
3. Назвіть способи розмноження прокаріотичних організмів.
4. На які групи поділяються мікроорганізми щодо кількості та якості поживного субстрату в середовищі проживання?
5. Назвіть види поживних середовищ.
6. Які особливості періодичного культивування мікроорганізмів?
7. Чим відрізняються безперервні культури мікроорганізмів, які функціонують у режимі хемостату та турбідостату?
8. Назвіть особливості мікроорганізмів-галофілів.
9. Як ацидо- та алкалофільні мікроорганізми пристосувалися до існування при екстремальних значеннях pH середовища?
10. На які групи діляться мікроорганізми стосовно температурних меж і чим вони різняться між собою?
11. Чому екстремальні барофіли характеризуються зниженою фізіологічною активністю?
12. Чим зумовлена токсична дія кисню на мікроорганізми?
13. Назвіть способи захисту від активних форм кисню.
14. Яку дію надає випромінювання з різною довжиною хвилі на мікроорганізми?
15. Наведіть приклад природного місцеперебування мікроорганізмів, в якому поєднуються екстремальні значення різних фізико-хімічних факторів середовища.
16. Наведіть групи хімічних антимікробних агентів та охарактеризуйте механізми їх дії.
17. Як клітини мікроорганізмів адаптуються до умов голодування?
18. Що таке клітини-персистери та які проблеми пов’язані з ними?
19. Що таке біоплівка? Перелічіть два способи життя в біоплівці, вигідні для мікроорганізмів.
20. Які практичні проблеми пов’язані з утворенням мікроорганізмами біоплівок?

РОЗДІЛ 6
МЕТАБОЛІЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ

На рівні клітини метаболізм усіх живих істот на Землі підпорядковується принципам біохімічної єдності, сформульованими голандським вченим А. Клюйвером. Відповідно до цих принципів усі земні організми мають однакові «будівельні блоки», єдину «енергетичну валюту» (АТФ), універсальний генетичний код та в основі своїй – ідентичні головні метаболічні шляхи. Таким чином, для всього живого біохімічні та молекулярно-генетичні механізми та інструменти – універсальні. Це дозволяє вивчати фундаментальні закони функціонування всіх, у тому числі високоорганізованих істот, використовуючи як моделі клітини мікроорганізмів.

6.1. Типи метаболізму

Способи метаболізму мікроорганізмів надзвичайно різноманітні. За здатністю виконувати певні функції мікроорганізми поділяються на метаболічні (функціональні) групи. Для визначення типу метаболізму мікроорганізму прийнято характеризувати його за способами енергетичного та конструктивного метаболізму (джерелами енергії, електронів та вуглецю для процесів синтезу).

Джерела енергії. Джерелами енергії для мікроорганізмів можуть бути світло або відновлені хімічні сполуки. Мікроорганізми, що живуть за рахунок енергії світла та перетворюють її в макроергічні зв'язки молекул аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ), називаються фототрофами, а процес – фотосинтезом. Хемотрофи використовують енергію хімічних зв'язків для утворення АТФ. Такий процес називають хемосинтезом. Терміни «фотосинтез» та «хемосинтез» позначають лише процеси утворення енергоємних сполук (АТФ, відновлювальних еквівалентів), хоча часто їх застосовують у ширшому сенсі, маючи на увазі також подальше використання АТФ для побудови органічних сполук із CO_2.

Джерела електронів. Енергетичні процеси клітин з різними типами метаболізму базуються на процесах перенесення електронів для формування трансмембранного потенціалу протонів та утворення АТФ, для чого потрібні відповідні донори (джерела) та акцептори електронів. Для цього хемоорганотрофи використовують органічні сполуки як донор (джерело) електронів, а хемолітотрофи і фототрофи (як правило) – неорганічні сполуки. **Акцептором електронів** в еукаріотичних мікроорганізмів слугує молекулярний кисень, а прокаріотичні здатні використовувати крім молекулярного кисню окиснені форми сполук, у тому числі йони тривалентного заліза, вуглекислий газ, елементарну сірку, нітрат, сульфат, фумарат.

Джерела вуглецю. Автотрофні мікроорганізми використовують CO2 як джерело вуглецю в синтезі необхідних органічних сполук, а гетеротрофні мікроорганізми використовують готові органічні речовини. Вуглекислий

газ гетеротрофи можуть використовувати як додаткове джерело вуглецю при гетеротрофній фіксації CO_2, проте здійснювати біосинтез тільки за рахунок цього процесу гетеротрофи не здатні.

Для більш повного позначення типу метаболізму застосовують складні терміни, перша частина яких позначає природу джерела енергії (фото- або хемо-), друга вказує на донора електронів (літо- або органо-), а третя свідчить про джерело вуглецю для конструктивного обміну (авто- або гетеро-). Комбінація цих ознак дає вісім варіантів типів метаболізму (рис. 6.1).

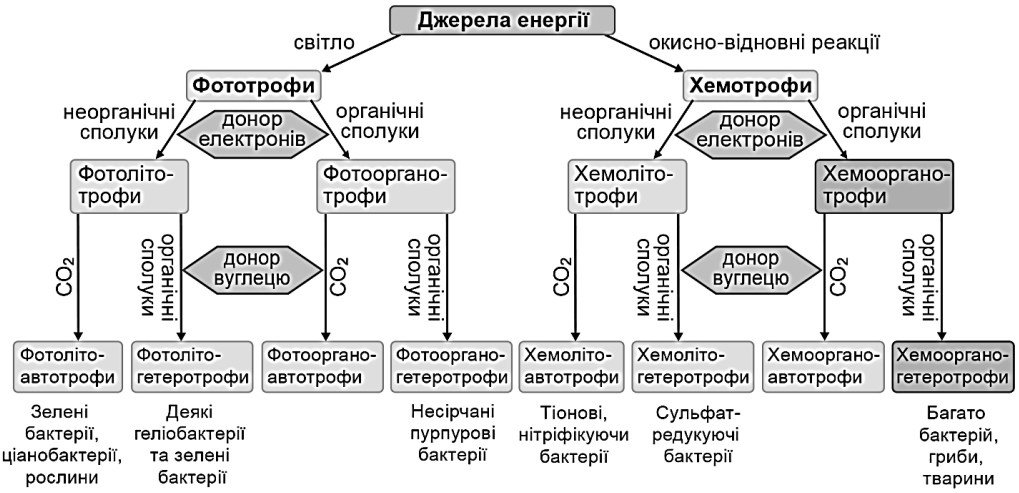


Рис. 6.1. Схема типів метаболізму мікроорганізмів

Найбільш поширеними з них є хемоорганогетеротрофія та фотолітоавтотрофія. У першому випадку готові органічні речовини окиснюються для отримання енергії та використовуються як джерело вуглецю у конструктивному метаболізмі. Цей тип метаболізму мають усі тварини та мікроорганізми, відповідальні за деструкцію складних природних органічних речовин.

Фотолітоавтотрофи утворюють органічні речовини із CO_2 за рахунок використання світлової енергії або неорганічних сполук як донорів електронів. Такий тип метаболізму здійснюють вищі рослини, водорості та ціанобактерії, у яких донором електронів при фотосинтезі служать молекули води, а також пурпурові та зелені сірчані бактерії, що використовують відновлені неорганічні сполуки сірки та заліза як донори електронів.

Фотолітогетеротрофія характерна для деяких зелених бактерій та геліобактерій, які потребують органічних речовин для конструктивного обміну, а енергію для росту отримують у процесі фотосинтезу з неорганічними донорами електронів (сполуками сірки).

Хемолітогетеротрофи отримують енергію та електрони при окисненні неорганічних речовин (наприклад, молекулярного водню), а для побудо-

ви компонентів клітини вимагають готових органічних сполук. У цю групу входять багато сульфатредукторів.

Фотоорганогетеротрофами, що здійснюють фотосинтез з використанням органічних речовин як донорів електронів та використовують готові органічні сполуки для біосинтезу, є несірчані пурпурові бактерії.

Унікальним способом життя, властивим лише прокаріотам, є відкрита С. Виноградським хемолітоавтотрофія, при якій енергію та електрони мікроорганізми отримують шляхом окиснення неорганічних сполук, які йдуть на синтез органічних речовин із CO_2. Здатність до хемолітоавтотрофії мають тіонові, нітрифікуючі бактерії, деякі водневі та залізобактерії.

Найбільш рідкісними типами живлення вважаються хемоорганоавтотрофія та фотоорганоавтотрофія. У цих випадках при хемо- або фотосинтезі окиснюються органічні речовини, які не можуть бути використані у конструктивному метаболізмі. Зазвичай це чужі природі сполуки (ксенобіотики) або незасвоювані речовини. З цієї причини мікроорганізму доводиться здійснювати енерговитратні реакції відновлення вуглецю CO_2 для синтезу органічних сполук та використовувати їх в біосинтетичних процесах.

Таким чином, тварини та рослини здатні тільки до хемоорганогетеротрофії та фотолітоавтотрофії, відповідно, тоді як у мікроорганізмів представлені всі типи метаболізму, до того ж багато їх здатні до перемикання на інший тип метаболізму залежно від умов існування.

Наведена загальноприйнята класифікація (рис. 6.1) не вичерпує всієї різноманітності способів метаболізму мікроорганізмів. Вона враховує лише джерело одного з біогенних елементів – вуглецю. Однак життя неможливе без інших біогенних елементів. Крім того, перелічені типи метаболізму можуть реалізовуватись як в аеробних, так і в анаеробних умовах, а один і той же мікроорганізм може володіти різними типами метаболізму, використовуючи їх у залежності від умов середовища.

Міксотрофія. Багато мікроорганізмів виявляють здатність до міксотрофії, тобто змішаного типу метаболізму. Під цим терміном розуміють можливість використання автотрофного та гетеротрофного шляхів асиміляції вуглецю та паралельне окиснення неорганічних і органічних сполук для отримання енергії. Наприклад, у деяких сульфобацил, здатних здійснювати окремо автотрофний або гетеротрофний метаболізм, максимальний рівень АТФ у клітинах забезпечується міксотрофним ростом, за якого донорами електронів в аеробних умовах служать Fe^{2+}, S° і органічні речовини, а джерелами вуглецю є як готові органічні сполуки, так і CO_2, що фіксується в циклі Кальвіна. Відомо про здатність до міксотрофії у деяких ціанобактерій.

Наявність міксотрофного обміну пояснюють «напруженістю» енергетичного метаболізму у разі окиснення лише неорганічних речовин

(літотрофного росту), коли мікроорганізм змушений «добирати» енергію, використовуючи ще й органічні сполуки. З іншого боку, однією з причин неможливості тривалого гетеротрофного існування вважають малоефективну роботу транспортних систем, що переносять у клітину органічні сполуки, які призводять до необхідності використовувати додатково неорганічні донори електронів та автотрофно фіксувати CO_2.

Для розгляду схеми метаболізму окремого організму необхідно згадати наведені нижче деякі важливі для цього терміни та поняття.

6.2. Ферменти

Ферменти (ензими) – це біологічні каталізатори, що здійснюють біохімічні реакції як *in vivo*, так і *in vitro*. За хімічним складом ферменти можуть належати до простих чи складних білків. В останньому випадку молекула складається з білкової частини (апоферменту) та сполуки небілкової природи (кофактору). У білковій частині ферменту каталітичні функції виконують відносно невеликі ділянки молекули – активні центри, які визначають специфічність біохімічної реакції, що каталізується даним ферментом.

Активний центр являє собою поєднання певних амінокислот, які можуть знаходитись у поліпептидному ланцюгу як поруч, так і в різних його частинах. Якщо амінокислоти просторово віддалені одна від одної, формування активного центру відбувається шляхом згортання молекули ферменту в глобулярну структуру. Крім активного центру деякі ферменти мають алостеричний центр, що регулює роботу активного центру. За характером каталізованих реакцій розрізняють оксидоредуктази, трансферази, гідролази, ліази, ізомерази, лігази.

6.3. Відновлювальна сила

Відновлювальна сила – це здатність сполуки віддавати електрони і протони під час окисновідновних реакцій. При цьому електрон (протон) переноситься від донора до акцептора. Коли електрон (протон) додається до сполуки, вона відновлюється, оскільки додавання електрона (протона) знижує ступінь її окиснення. Навпаки, коли електрон (протон) забирається із сполуки, вона окиснюється. Реакції відщеплення протонів і електронів від субстрату, що окиснюється, і перенесення їх на інший субстрат, що відновлюється, каталізують дегідрогенази – ферменти класу оксидоредуктаз.

Залежно від хімічної природи акцептора, з яким взаємодіють ці ферменти, їх розподіляють на анаеробні дегідрогенази, що каталізують реакції, в яких акцептором електронів (протонів) є сполука, відмінна від кисню.

Аеробні дегідрогенази, що каталізують реакції, в яких акцептором електронів (протонів) може бути кисень (оксидази) або інший акцептор (дегідрогенази цієї групи належать до флавопротеїнів, а продукт реакції – перекис водню).

Дегідрогенази, що забезпечують транспортування електронів від субстрату до акцептора електронів – це цитохроми дихального ланцюга, а дегідрогенази, які каталізують пряме введення в молекулу субстрату, що окиснюється, одного або двох атомів кисню – оксигенази.

Функцію первинних акцепторів водню (електронів і протонів), що відщеплюються від відповідних субстратів, виконують дегідрогенази двох типів: *піридинзалежні*, що містять коферменти нікотинамідаденіндинуклеотид ($НАД^+$) (рис. 6.2) або нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат ($НАДФ^+$), і *флавінзалежні* дегідрогенази, простетичною групою яких є флавінаденіндинуклеотид (ФАД) або флавінмононуклеотид (ФМН).

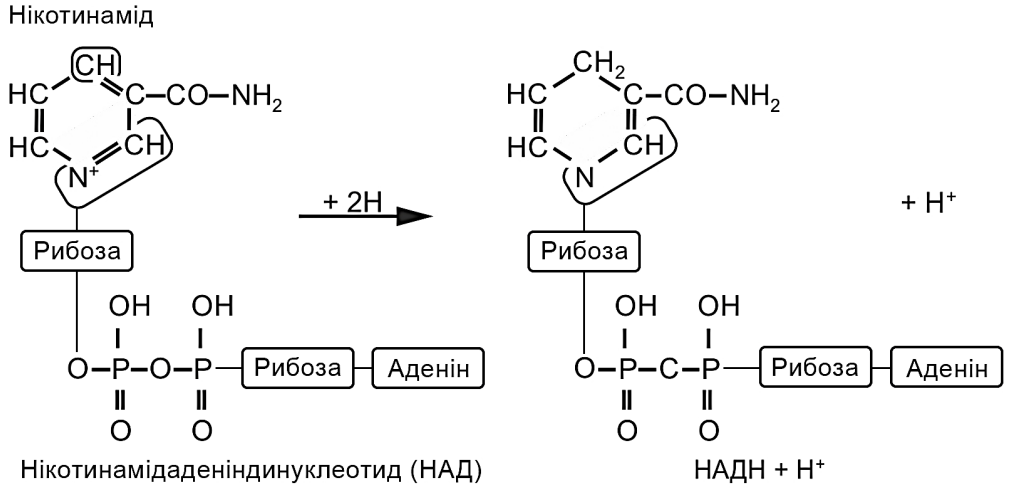


Рис. 6.2. Окиснена і відновлена форми нікотинамідаденідинуклеотиду (НАД)

Такі коферменти як НАД збільшують різноманітність окисновідновних реакцій, які можливі в клітині завдяки взаємодії з багатьма різними донорами та акцепторами електронів, причому кофермент є окисновідновним посередником, що обслуговує різні задіяні ферменти. Наприклад, видалені електрони від донора ферментом, що окиснює цей донор, використовуються для відновлення $НАД^+$ до НАДН. Після цього НАДН дифундує від ферменту та приєднується до іншого ферменту, який, окиснюючи НАДН до $НАД^+$, відновлює акцептор електронів (рис. 6.3). Переміщення електронів за допомогою $НАД^+$/НАДН є поширеним у катаболізмі мікроорганізмів. Однак, крім $НАД^+$/НАДН, багато інших окисновідновних коферментів можуть брати участь як електронні човники.

6.4. Енергетичні молекули

Аденозинтрифосфорна кислота (АТФ) – «енергетична валюта», універсальний переносник енергії. Більшість енергозалежних реакцій пов'я-

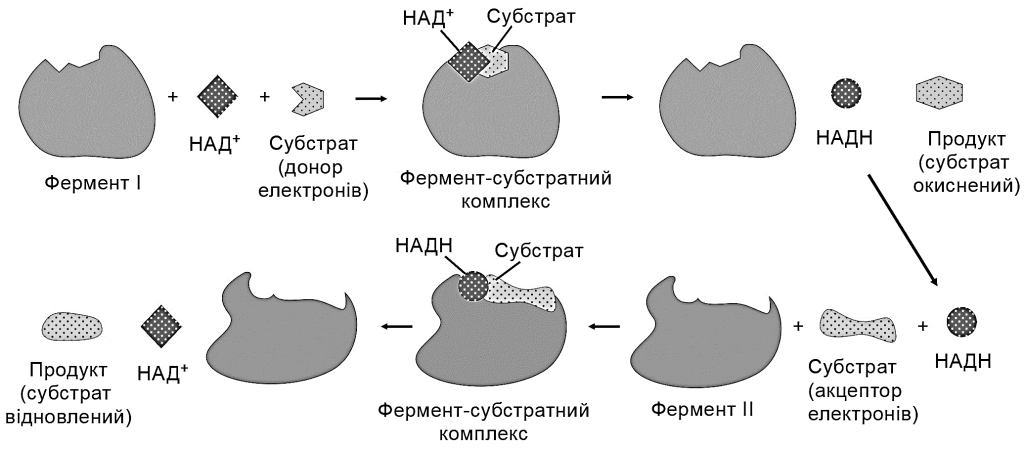


Рис. 6.3. Окисновідновні реакції з залученням НАД

зані з використанням АТФ – високоенергетичної молекули, що містить два макроергічні зв'язки (рис. 6.4). Гідроліз одного моля АТФ дає близько 32 кДж вільної енергії. Інші сполуки з макроергічними зв'язками – це *піро-фосфат* (ФФ), *креатинфосфат, фосфоенолпіруват, ацил-КоА, ГТФ, ЦТФ*. Запасання енергії може також здійснюватися у формі поліфосфатів.

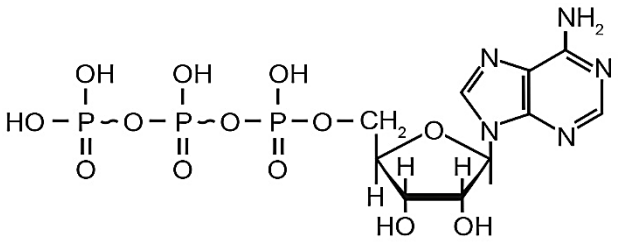


Рис. 6.4. Аденозинтрифосфорна кислота

Формою запасання (консервації) енергії є енергізований стан мембрани або *трансмембранний потенціал протонів* ($\Delta\mu н^+$). Він може забезпечувати процеси проникнення речовин у клітину, рух джгутиків, зворотний транспорт йонів та синтез АТФ. Проте органічні речовини не можуть синтезуватись за рахунок $\Delta\mu н^+$. Для створення трансмембранного потенціалу клітини використовують процеси окиснення органічних та неорганічних сполук і процеси аноксигенного та оксигенного фотосинтезу.

Існують два принципово різні механізми синтезу АТФ в клітині: субстратне фосфорилювання – в біохімічних реакціях окиснення субстрату та мембранне фосфорилювання – трансформація енергії різниці потенціалів протонів на мембранах в енергію АТФ, про що описано далі у цьому розділі.

6.5. Схема обміну речовин хемоорганогетеротрофного мікроорганізму

Функціональні можливості окремого конкретного мікроорганізму залежать від наявності набору біохімічних реакцій, джерел енергії, вуглецю та донорів і акцепторів електронів. Розглянемо схему обміну речовин на прикладі хемоорганогетеротрофного мікроорганізму, який використовує високомолекулярний полісахарид, побудований з глюкози, наприклад, крохмаль чи целюлозу (або їх мономер глюкозу) та кисень для їх окиснення (рис. 6.5). Етапи обміну речовин у такого хемоорганогетеротрофного мікроорганізму включають:

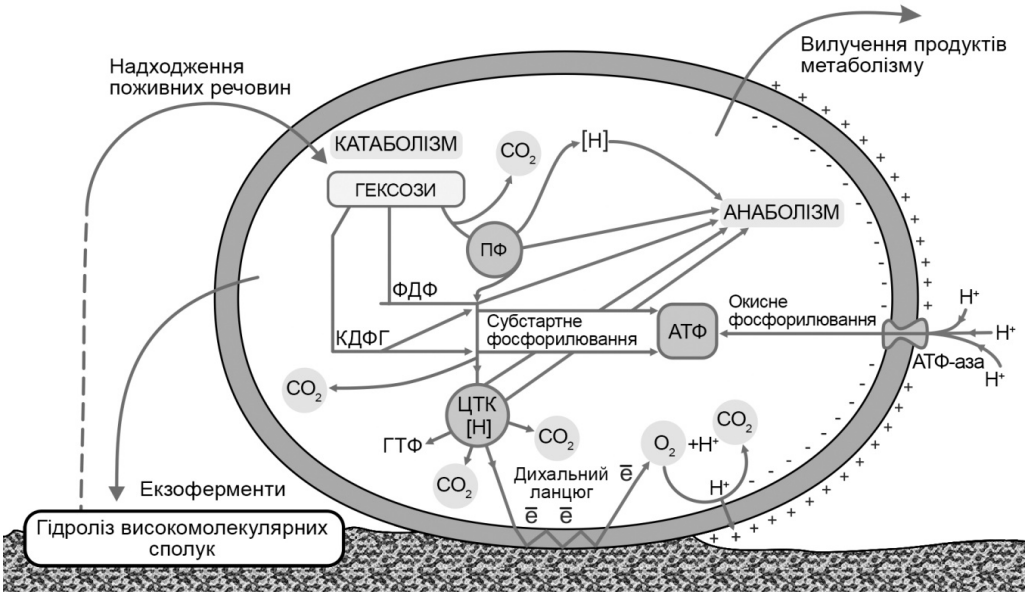


Рис. 6.5. Етапи обміну речовин хемоорганотрофного мікроорганізму

1. Розщеплення високомолекулярних субстратів позаклітинними гідролазами до низькомолекулярних сполук, що потім надходять в клітину.
2. Транспортування речовин у клітину.
3. Катаболізм гексоз до пірувату та субстратне фосфорилювання.
4. Декарбоксилювання пірувату.
5. Цикл трикарбонових кислот.
6. Генерування трансмембранного потенціалу протонів.
7. Утворення АТФ (окисне фосфорилювання).
8. Біосинтез сполук та збирання структурних компонентів.
9. Вилучення продуктів метаболізму з клітини.

6.6. Розщеплення високомолекулярних субстратів позаклітинними гідролазами

У прокаріотів високомолекулярні речовини не можуть проникати в клітину, оскільки клітинна стінка та клітинна мембрана є істотною перешкодою для них. Тому на першому етапі метаболізму такі сполуки спочатку розщеплюються поза клітиною на оліго- та мономери відповідними позаклітинними гідролазами, що синтезуються в клітині, виділяються у зовнішнє середовище (рис. 6.6) або розташовуються на зовнішній стороні

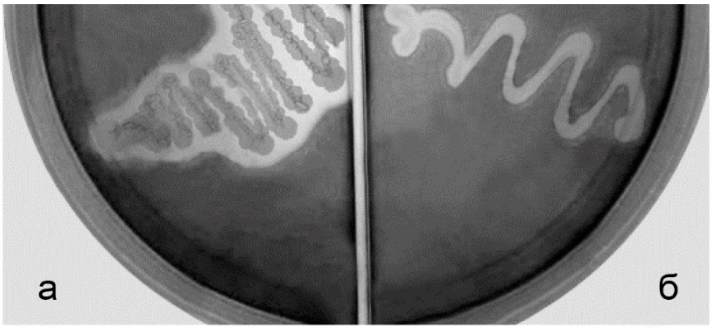


Рис. 6.6. Зони гідролізу (світлі зони) крохмалю позаклітинними гідролазами (а) свідчать про виділення мікроорганізмами позаклітинної амілази, навпаки відсутність зон гідролізу (б) демонструє відсутність цього ферменту

клітинної стінки або клітинної мембрани. У грамнегативних бактерій ці ферменти можуть бути локалізовані у периплазматичному просторі. Високомолекулярні речовини в цьому випадку проникають у їх периплазму через пори, утворені білками-поринами, що знаходяться в зовнішній мембрані. Низькомолекулярні продукти гідролізу (наприклад, крохмалю – це мальтоза, целюлози – целобіоза, білків – пептиди) транспортуються в клітину через клітинну мембрану.

6.7. Транспортування речовин у клітину

У прокаріотичних мікроорганізмів, грибів і водоростей речовини проникають у клітину тільки в розчиненому стані. Деякі найпростіші здатні поглинати з навколишнього середовища нерозчинені речовини шляхом ендоцитозу твердих шматочків або крапель рідини, що не змішуються з водою. При ендоцитозі ділянка клітинної мембрани втягується всередину та замикається навколо частки їжі, утворюючи вакуолю. Усередині клітини вакуоль зливається з лізосомою, яка містить набір гідролітичних ферментів. У травній вакуолі, що утворилася, відбувається гідроліз високомолекулярних речовин і часток їжі до низькомолекулярних сполук.

У мікроорганізмів, які часто мешкають у бідних на поживні речовини середовищах існує кілька різних способів надходження речовин у клітину

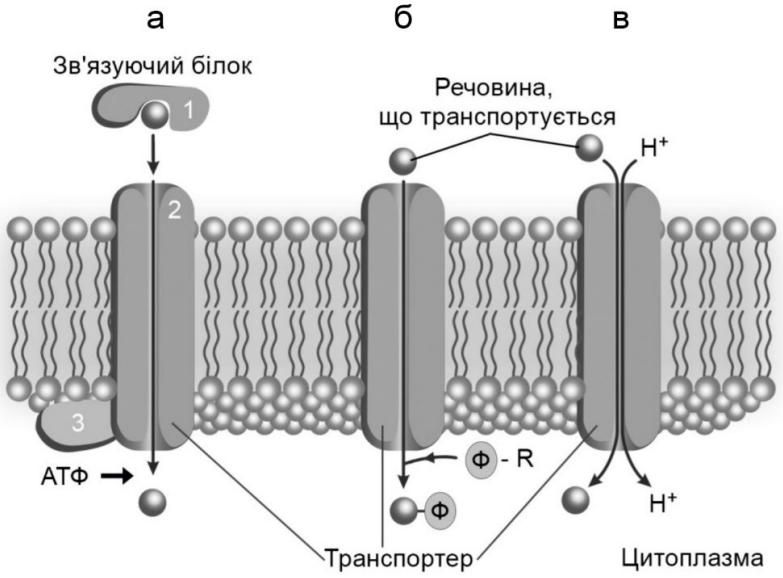


Рис. 6.7. Типи транспортних систем. (а) Транспортна система АВС – перенесення речовини забезпечується зв'язуючим білком з використанням енергії АТФ (три білки системи АВС позначені цифрами 1, 2, 3); (б) групова транслокація – перенесення речовини з її хімічною модифікацією фосфоенолпіруватом; (в) простий транспорт – транспорт за рахунок протон-рушійної сили

(рис. 6.7). Усі незаряджені молекули (H_2O, розчинені гази) можуть надходити в клітину шляхом *дифузії*. Це проникнення речовин в клітину відбувається за градієнтом концентрації, що не вимагає витрат енергії та відбувається до тих пір, поки не настане рівновага між вмістом даної речовини поза та всередині клітини.

Багато речовин проникають у клітину завдяки транспортерам (пермеазам), наприклад, є пермеази для всіх катіонів. Транспортери – це білкові комплекси, що розташовані в мембрані.

В прокаріотичних клітинах відомо три основні механізми активного транспорту: *простий транспорт*, за якого бере участь лише трансмембранний транспортний білок; *групова транслокація*, що використовує низку білків у процесі транспорту та *транспортні системи АВС*, які складаються з трьох компонентів – білків, що зв'язують транспортовану речовину, трансмембранного транспортера та білка, що гідролізує АТФ (рис. 6.7). Кожна з цих транспортних систем є енергетично залежною, будь-то від рушійної сили протонів, АТФ або якоїсь іншої енергетичної сполуки.

Трансмембранний транспортер практично всіх транспортних систем складається з поліпептиду, що містить 12 доменів. Вони утворюють канал, через який розчинена транспортована речовина проходить в клітину. Транслокація пов'язана з конформаційними змінами цього транспортного білка,

які відбуваються, коли він зв'язує специфічну для нього розчинену речовину. Фактично це як двері, що відчиняються при контакті з специфічною речовиною, при цьому вона потрапляє в клітину.

Прості транспортні реакції забезпечуються енергією протонрушійної сили. При синпорті розчинена речовина та протони спільно транспортуються в одному напрямку, а при антипорті розчинена речовина та протон транспортуються в протилежних напрямках (рис. 6.7 в). Класичним прикладом простого транспортера є поглинання дисахариду лактози за допомогою лакпермеази, добре вивченого симпортера в *Escherichia coli*. Шляхом простого транспорту в клітину надходять фосфат, сульфат і кілька різних органічних сполук.

Групова транслокація відрізняється від простого транспорту тим, що, по-перше, транспортована речовина хімічно модифікується під час процесу транспортування, а по-друге, процес забезпечується сполукою, багатою енергією (фосфоенолпіруватом), а не рушійною силою протонів (рис. 6.7 б). Найкраще вивчені системи групової транслокації у *E. coli* транспортують глюкозу, манозу та фруктозу. Під час поглинання ці сполуки фосфорилюються системою фосфотрансфераз, яка складається з п'яти білків, що працюють узгоджено, транспортуючи будь-який цукор. Перед транслокацією цукру білки в системі фосфотрансферази (на рис. 6.8 б вона позначена як R-Ф) самі по черзі фосфорилюються та дефосфорилюються каскадним способом, поки останній фермент не фосфорилює цукор, який при цьому потрапляє в цитоплазму. Енергія для фосфотрансферазної системи надходить від фосфоенолпірувату.

В *транспортних системах ABC* (від **A**TP-**b**inding **c**assette) грамнегативні бактерії використовують периплазматичний зв'язуючий білок разом із трансмембранним транспортером і АТФ-гідролізуючим компонентом (рис. 6.7 а). У різних бактерій виявлені більше 200 різних транспортних систем АВС, що каталізують поглинання широкого спектру органічних і неорганічних сполук. Характерною властивістю периплазматичних зв'язуючих білків є їх надзвичайно висока субстратна спорідненість. Як тільки його специфічний субстрат зв'язується, периплазматичний зв'язуючий білок взаємодіє з відповідним трансмембранним транспортером, щоб транспортувати субстрат у клітину за рахунок енергії АТФ.

Хоча грампозитивні бактерії та більшість архей не мають периплазми, вони також мають транспортні системи АВС. У грампозитивних бактерій білки, що зв'язують субстрат, прикріплені до зовнішньої поверхні клітинної мембрани. Як тільки ці білки зв'язуються зі своїм субстратом, вони взаємодіють з трансмембранним транспортером і каталізують поглинання субстрату з використанням АТФ. Системи АВС також присутні у різноманітних архей і в основному використовуються для транспортування цукрів.

6.8. Катаболізм гексоз до пірувату та субстратне фосфорилювання

Транспортовані в клітину органічні сполуки підлягають розщепленню та утилізації. Розкладання цукрів має найважливіше значення в мікробному енергетичному обміні гетеротрофних мікроорганізмів. Центральним амфіболітом вважається глюкоза, оскільки вона перша з органічних речовин утворюється при автотрофній асиміляції CO_2 і використовується в подальшому для біосинтезу інших сполук та з неї ж як з енергетичного субстрату розпочинається катаболізм. Тому саме на прикладі глюкози розглянемо катаболізм гексоз і енергетичні процеси, які з ним пов'язані.

Перенесена в клітину активована при транспорті шляхом фосфорилювання молекула глюкози (рис. 6.8) може включатися в реакції катаболізму гексоз трьома шляхами: фруктозодифосфатним (ФДФ), 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатним (КДФГ) і пентозофосфатним окиснювальним циклом (ПФ).

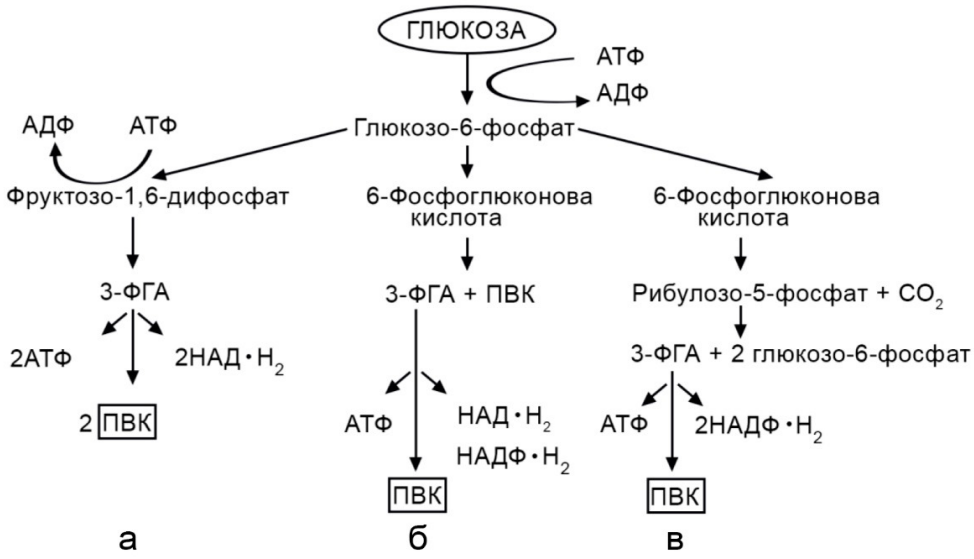


Рис. 6.8. Схема шляхів катаболізму глюкози в прокаріотів: (а) фруктозодифосфатний; (б) 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатний; (в) пентозофосфатний окиснювальний цикл; ПВК – піровиноградна кислота

ФДФ шлях (гліколіз) або шлях Ембдена-Мейергоф-Парнаса, широко поширений як у прокаріотів, так і в еукаріотів. У ньому з молекули глюкози утворюються дві молекули пірувату, 2 НАД·H_2 та 2 АТФ (рис. 6.9).

2-Кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатний (КДФГ) шлях або шлях Ентнера-Дудорова, властивий переважно прокаріотам і призводить до утворення двох молекул пірувату, одної молекули АТФ та двох відновлених піридиннуклеотидів на одну молекулу глюкози (рис. 6.10).

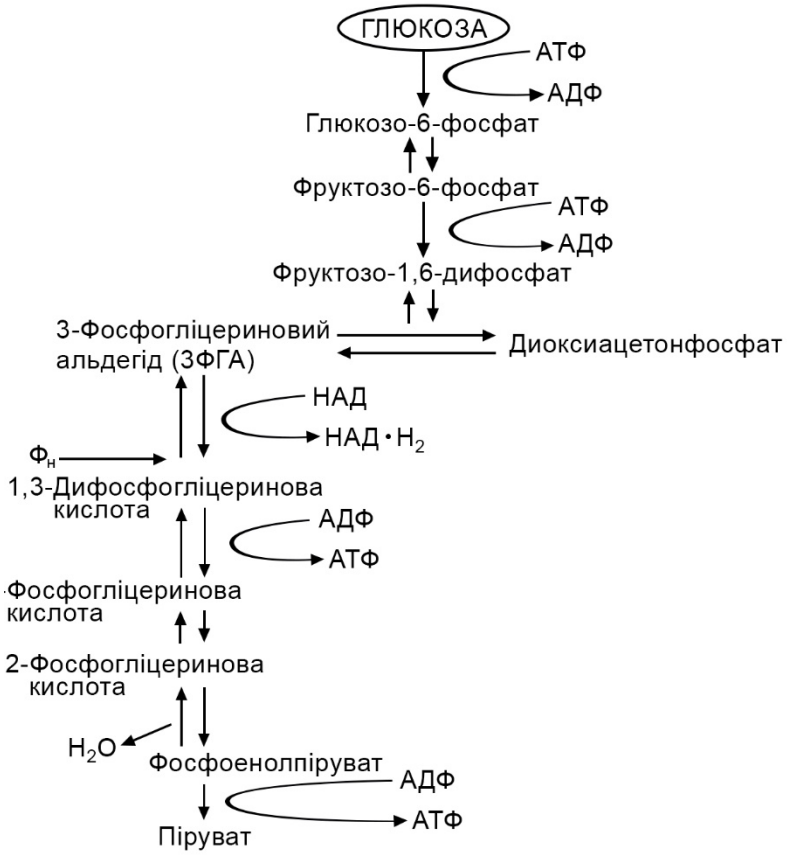


Рис. 6.9. Фруктозодифосфатний шлях окиснення глюкози (шлях Ембдена-Мейергофа–Парнаса)

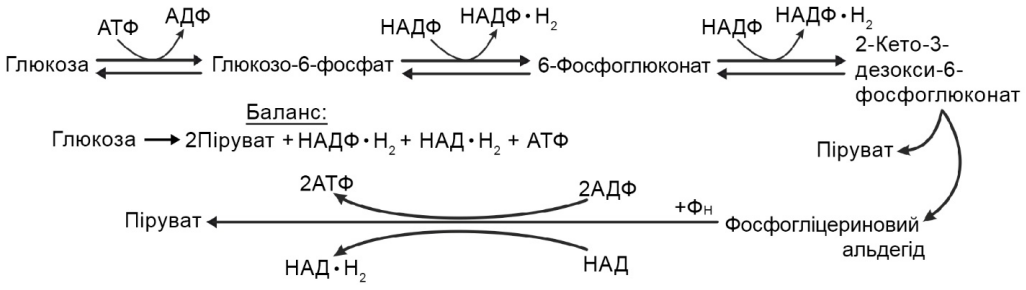


Рис. 6.10. 2-Кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатний шлях окиснення глюкози (шлях Ентнера-Дудорова)

Пентозофосфатний окиснювальний цикл, названий також шляхом Варбурга-Діккенса-Хорекера, переважно поширений у рослин, а в більшості мікроорганізмів відіграє допоміжну роль та забезпечує клітину різними попередниками (рибозофосфатом, еритрозофосфатом, НАД·H_2) для біосинтетичних процесів (рис. 6.11).

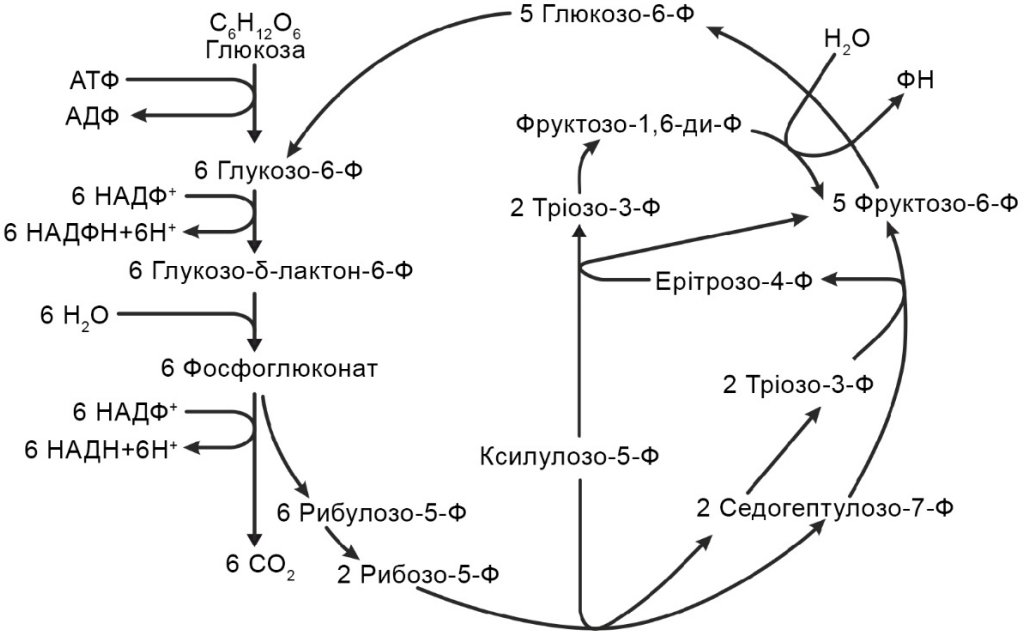


Рис. 6.11. Пентозофосфатний окиснювальний цикл глюкози (шлях Варбурга-Діккенса-Хорекера)

Перші дві реакції субстратного фосфорилювання відбуваються на шляхах ФДФ та КДФГ на етапах перетворення 1,3-дифосфогліцерату до 3-фосфогліцерату та фосфоенолпірувату до піровату з сумарним виходом 2 молекул АТФ на молекулу глюкози. Третьою є реакція циклу трикарбонових кислот, це перетворення сукциніл-КоА в сукцинат, що супроводжується генерацією АТФ на субстратному рівні, про що мова буде йти нижче.

Таким чином, на початкових основних шляхах (ФДФ та КДФГ), що є спільними для процесів бродіння та дихання, гексоза (6 вуглецевих атомів) окиснюється до 2 молекул піровату (2 молекули з 3 вуглецевих атоми), який вступає в біосинтетичні реакції, бере участь в процесах бродіння або окснюється в подальших реакціях до CO_2.

6.9. Декарбоксилювання піровиноградної кислоти

У подальшому піруват декарбоксилюється з утворенням ацетил-КоА за участю складно організованого піруватдегідрогеназного комплексу – піруватдекарбоксилази. У ході цієї реакції відбувається окисне декарбокси-

лювання пірувату, у результаті якого карбоксильна група від'єднується у вигляді CO_2, а ацетильна група входить в склад ацетил-КоА. Далі ацетил-КоА бере участь у процесах бродіння або надходить в цикл трикарбонових кислот, де повністю окиснюється до CO_2.

6.10. Цикл трикарбонових кислот

У аеробно та анаеробно дихаючих мікроорганізмів основним окиснювальним механізмом є цикл трикарбонових кислот названий циклом Кребса (рис. 6.12). За один оберт циклу з ацетил-КоА утворюється 2 молекули CO_2, 4 відновних еквіваленти та одна молекула АТФ.

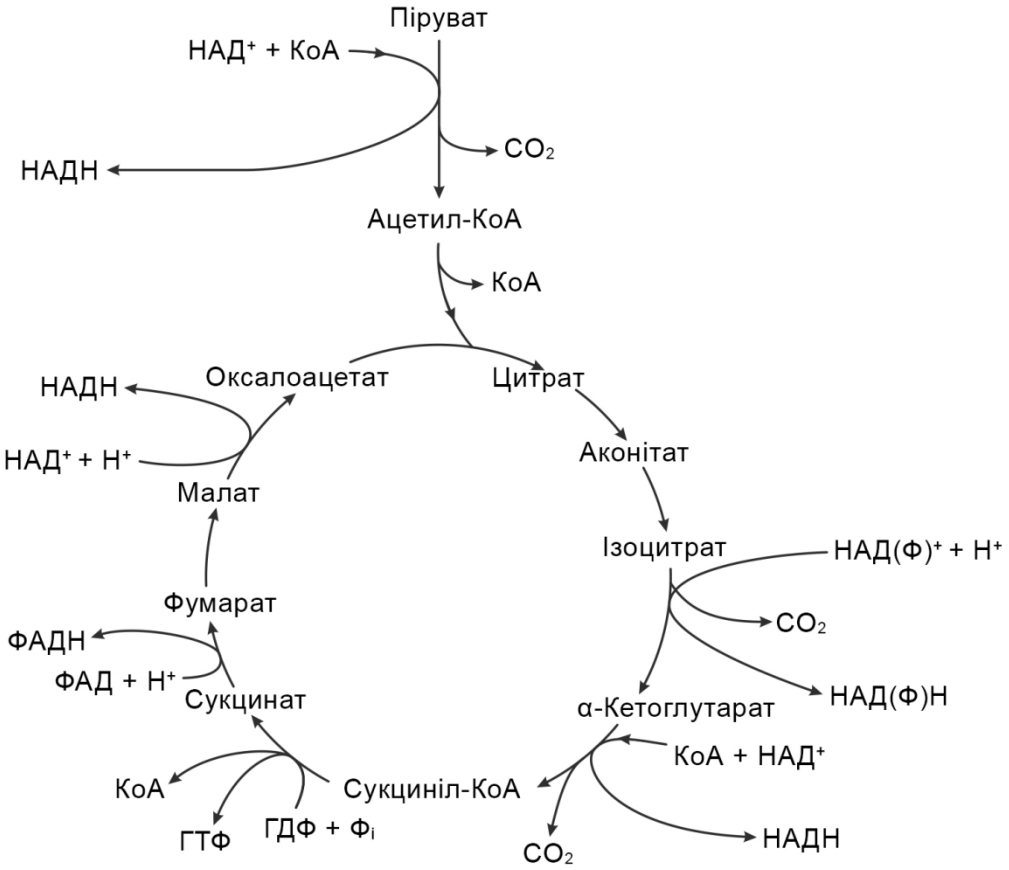


Рис 6.12. Цикл трикарбонових кислот

Молекула ацетил-КоА включається в цикл трикарбонових кислот у реакції з оксалоацетатом, що каталізується цитратсинтетазою, та призводить до утворення цитрату та вільного КоА. Цитрат за допомогою ферменту аконітази перетворюється на цис-аконітат та ізоцитрат, який через оксалосукцинат декарбоксилюється з перетворенням в α-кетоглутарат, що

піддається подальшому декарбоксилюванню та утворенню сукциніл-КоА. Перетворення сукциніл-КоА в сукцинат супроводжується реакцією субстратного фосфорилювання та утворенням в результаті молекули АТФ. Сукцинат перетворюється в фумарат, малат та завершується цикл регенерацією оксалоацетату, який може розпочинати новий цикл. Зрештою, окиснення ацетил-КоА в ЦТК призводить до утворення двох молекул CO_2, однієї молекули АТФ, 3 $НАДН_2$, 1 $ФАДН_2$, з яких шість атомів H_2 пов'язані молекулами піридиннуклеотидів та два атоми – з молекулами флавопротеїнів.

У деяких бактерій цикл трикарбонових кислот розірваний. Найчастіше буває відсутній етап перетворення α-кетоглутарату в сукцинат. У такому вигляді ЦТК не може функціонувати в системі енергопродукуючих реакцій клітини. У цьому випадку головна функція розірваного ЦТК – біосинтетична, поставляти прекурсори для процесів синтезу.

Отже, цикл трикарбонових кислот виконує функцію кінцевого окиснення органічних речовин, утворює відновлювальні еквіваленти для окисного фосфорилювання, молекули АТФ в реакції субстратного фосфорилювання та забезпечує біосинтетичні процеси клітини різними попередниками, такими як оксалоацетат, сукцинат, α-кетоглутарат та ін.

У результаті катаболізму молекула глюкози повністю окиснюється до CO_2, а відщеплений водень відновленими переносниками (НАДН, НАДФН, $ФАДН_2$) транспортується до системи переносу електронів для утворення трансмеибранного градієнту протонів та АТФ.

6.11. Генерування трансмембранного потенціалу протонів

Основні енергетичні процеси клітини протікають в мембранах і пов'язані з транспортом електронів, викачуванням з клітини протонів та формуванням трансмембранного градієнту протонів (μH^+) або у деяких бактерій натрію ($\Delta\mu Na^+$). Законсервована енергія різниці потенціалу протонів на мембрані трансформується в енергію АТФ або використовується бепосередньо, наприклад, в процесах транспорту речовин.

Утворені на різних етапах окиснення глюкози НАДН, НАДФН та $ФАДН_2$, переносять електрони та протони до електронтранспортного ланцюга (дихальний ланцюг), який у прокаріотів знаходиться у клітинній мембрані, а в еукаріотів – у мембрані мітохондрій.

Мітохондріальний електротранспортний ланцюг (ЕТЛ) складається з череди носіїв електронів, що працюють разом для перенесення електронів від донорів, таких як НАДН і $ФАДН_2$, до кінцевого акцептора, наприклад, у аеробів до O_2. Склад переносників електронів в ЕТЛ варіює у різних видів мікроорганізмів.

Електрони переносяться від носіїв з більш негативним потенціалом відновлення до тих, що мають більш позитивний потенціал, і в кінці – на O_2 (у аеробів) з приєднанням H^+ та утворенням молекули води. Кожен переносник відновлюється, коли приймає електрони, а потім повторно окисню-

ється, коли віддає електрони до наступного носія у ланцюжку (рис. 6.13). Електрони рухаються між носіями вниз по градієнтному потенціалу, схоже як вода тече вниз гірським струмком.

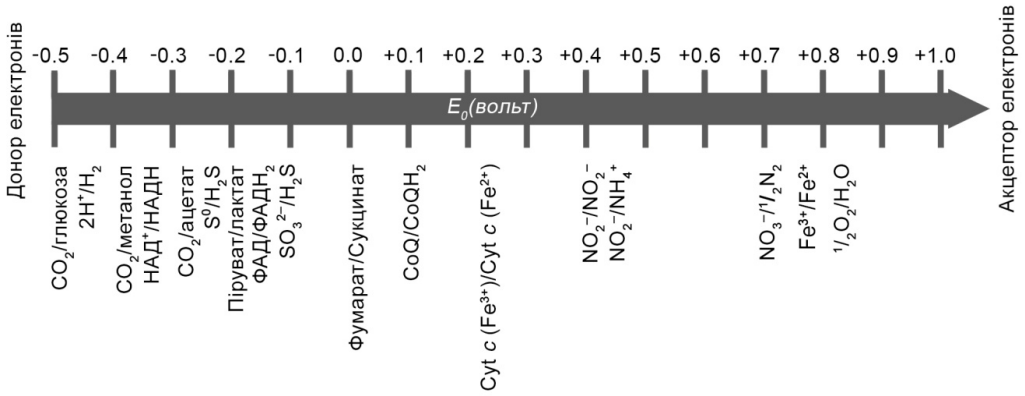


Рис. 6.13. Різниця потенціалів між донором та акцептором електронів

При транспортуванні електронів з клітини через мембрану виносяться протони, що створює на ній градієнт протонів. Вивільнення протонів відбувається, коли електрони переносяться від носіїв, таких як ФМН і кофермент Q (Q), що переносить електрони та протони до таких компонентів, як білки негемового заліза (FeS) і цитохроми (Цит), які транспортують лише електрони.

У мітохондрій на завершальному етапі цитохромоксидаза передає електрони на кисень (рис. 6.14). Кількість протонів, що переміщуються через мембрану в кожному місці на пару електронів транспортування, може

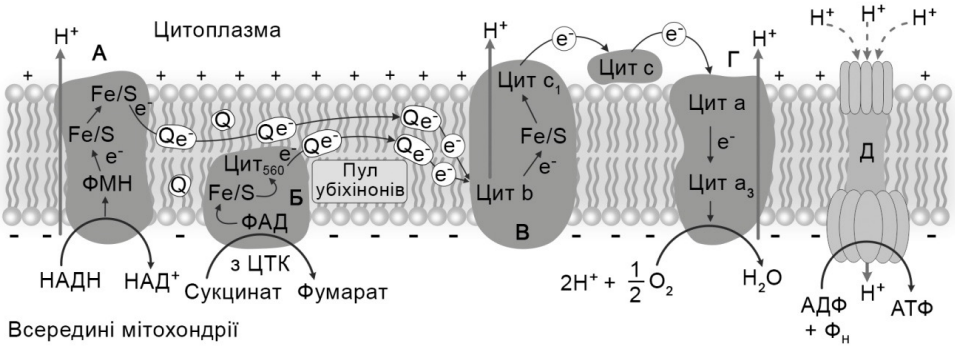


Рис. 6.14. Перенесення електронів по ЕТЛ мітохондрій та утворення градієнту протонів: А – комплекс I; Б – комплекс II; В – комплекс III, Г –комплекс IV; Д – АТФ-синтетаза; ФМН – флавінмононуклеотид; ЦТК – цикл трикарбонових кислот; ФАД – флавінаденіндинуклеотид; Fe/S – залізосірчаний білок; Цит – цитохром

відрізнятися для різних видів. Поточний підсумок полягає в тому, що під час окиснення НАДН 10 протонів виділяються назовні.

У хемоорганотрофних еукаріотів носії електронів знаходяться в мембрані мітохондрії. ЕТЛ (рис. 6.14) складається з чотирьох великих мультибілкових комплексів і двох додаткових носіїв – коензиму Q і невеликого білка цитохрому *c*, які з'єднують комплекс I з комплексом III і комплекс III з комплексом IV, відповідно. Комплекс IV називають термінальною оксидазою, оскільки він відповідальний за останній етап передавання електронів на O_2. При перенесенні електронів протони виносяться з клітини на зовнішню сторону мембрани мітохондрій у еукаріот (клітинної мембрани у бактерій і архей) та формують градієнт протонів на мембрані.

ЕТЛ бактерій та архей, які розташовані в клітинній мембрані, подібно до мітохондрій, також генерують градієнт протонів. Носії ЕТЛ у деяких грамнегативних бактерій можуть знаходитись у периплазматичному просторі та навіть у зовнішній мембрані.

Також на відміну від мітохондріальних, бактерійні та архейні ЕТЛ можуть бути розгалуженими, складатися з різних носіїв електронів та використовувати різні термінальні оксидази. Електрони можуть входити в ланцюжок у кількох точках та виходити через кілька термінальних оксидаз.

У аеробних мікроорганізмів кінцевим акцептором електронів є O_2, а у анаеробних – NO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-}, S^0, фумарат та інші (табл. 8.1). Бактерійні та архейні ЕТЛ також можуть бути коротшими, що призводить до перенесення меншої кількості протонів через мембрану та, відповідно, запасання меншої кількості енергії. Хоча мікробні ЕТЛ (див. рис. 8.1, 8.2) відрізняються деталями конструкції від мітохондріальної, вони функціонують, використовуючи однакові фундаментальні принципи.

6.12. Утворення АТФ (окисне фосфорилювання)

Енергія різниці потенціалів на мембранах може перетворюватися на енергію АТФ (рис. 6.15). Ці процеси каталізуються H^+-АТФ-синтетазою в мембранах або Na+-АТФ-синтетазою у «натрієвих мембранах» алкалофільних бактерій.

АТФ-синтетаза (синонім АТФ-синтаза), що утворює АТФ за рахунок «прокачування» H^+ через «протонну помпу» (у алкалофільних бактерій, відповідно Na^+), міститься в мембрані поряд із переносниками електронів ЕТЛ (рис 6.14). За рахунок утвореної різниці концентрацій на мембрані клітини протони прокачуються в клітину через АТФ-синтетазу, вмонтовану в мембрану, яка при цьому каталізує перетворення АДФ в АТФ, а мембрана розряджається (рис 6.16).

Частина енергії трансмембранного потенціалу витрачається безпосередньо на синтез АТФ, а частина – на транспорт речовин у клітину, рух джгутиків та ін.

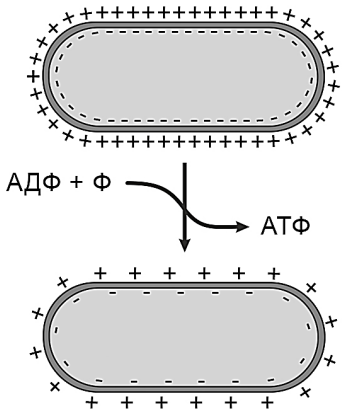


Рис. 6.15. Трансмембранний потенціал протонів

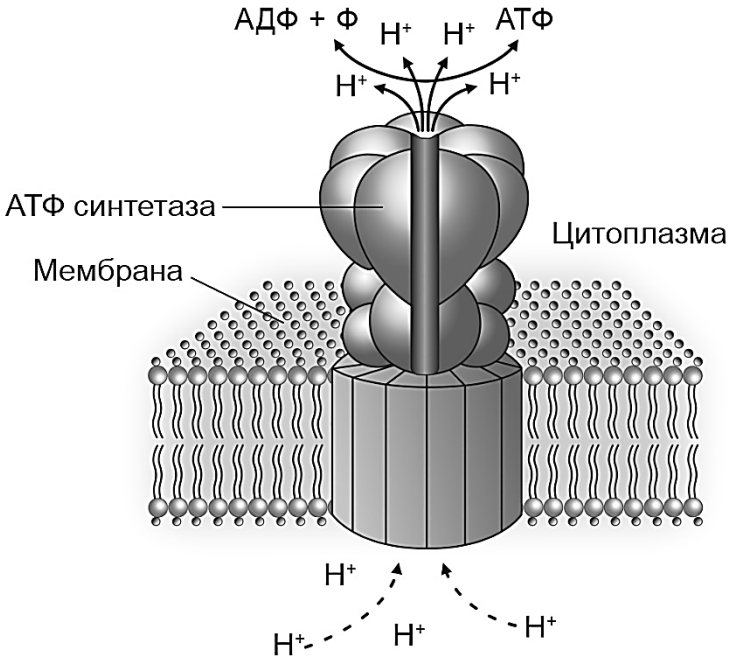


Рис. 6.16. АТФ-синтетаза (протонна помпа)

АТФ-синтетази складаються з двох компонентів, мультибілкового комплексу, який фактично каталізує утворення АТФ, та інтегрований в мембрану мультибілковий комплекс, що здійснює транслокацію протонів через мембрану. Необхідно зауважити, що структура білків АТФ-синтетази є висококонсервативною в усіх формах клітинного життя.

На два електрони, які потрапляють в електронтранспортний ланцюг утворюється 2 або 3 молекули АТФ в залежності від складу переносників. Зверніть увагу, АТФ-синтетаза працює і в зворотному напрямку як АТФ-аза, формуючи градієнт протонів у мікроорганізмів, що не мають ЕТЛ (наприклад, молочнокислі бактерії). Зворотність дії АТФ-синтетази пояснює, чому суворо ферментативні бактерії, у яких відсутні електронтранспортні ланцюги та які не здатні здійснювати окисне фосфорилювання, все ж містять АТФ-синтетази.

Багато важливих реакцій у клітині, такі як обертання джгутиків і деякі способи транспорту речовин, поєднуються з енергією потенціалу протонів, а не безпосередньо з АТФ. Таким чином, АТФ-синтетаза організмів, нездатних до дихання, функціонує в клітині однонаправлено, генеруючи рушійну силу протонів з АТФ, утвореного фосфорилюванням на рівні окиснення субстрату під час бродіння.

Необхідно відзначити, що відновлені піридиннуклеотиди (НАДН, НАДФН та $ФАДН_2$) можуть служити не тільки переносниками електронів і протонів, а й бути відновними еквівалентами в окисновідновних реакціях, зокрема при фіксації CO_2 у хемолітотрофів і фототрофів. Для утворення відновника електрони у хемолітотрофів переносяться по ЕТЛ в зворотньому напрямку з витратою енергії АТФ, а у фототрофів електрони переносяться за рахунок енергії квантів світла в фотосистемі на НАД або НАДФ, які відновлюються до НАДН, НАДФН і використовуються для фіксації CO_2.

Основна відмінність ЕТЛ при анаеробному диханні полягає в тому, що кінцевим акцептором електронів слугують неорганічні чи органічні сполуки, але не кисень. У цьому випадку ланцюг укорочений, різниця потенціалів між донором і акцептором електронів менша ніж у аеробів, тому менше викачується протонів з клітини та менше утворюється АТФ.

Отже, хемоорганотрофні мікроорганізми окиснюють органічні сполуки, за участі ЕТЛ формують на мембрані градієнт протонів (трансмембранний потенціал $\Delta\mu_н+$), який АТФ-синтетазою трансформується в АТФ (окисне фосфорилювання). При формуванні градієнту протонів електрони переносяться по ЕТЛ на кисень (аеробне дихання), або на інші акцептори – не кисень (анаеробне дихання).

На рис. 6.17 представлено альтернативні енергогенеруючі системи. Так, хемолітотрофні мікроорганізми на відміну від хемоорганотрофів окиснюють неорганічні сполуки (відновлені сполуки сірки, азоту, H_2, метали). Формування на мембрані градієнту протонів за участі ЕТЛ та генерування АТФ-синтетазою АТФ (мембранне фосфорилювання) здійснюється за тим самим механізмом, що і в хемоорганотрофів. Більшість хемолітотрофів використовують кисень як акцептор електронів, тобто є аеробами, а деякі – інші акцептори (анаеробне дихання), наприклад, нітрит у анаммоксбактерій.

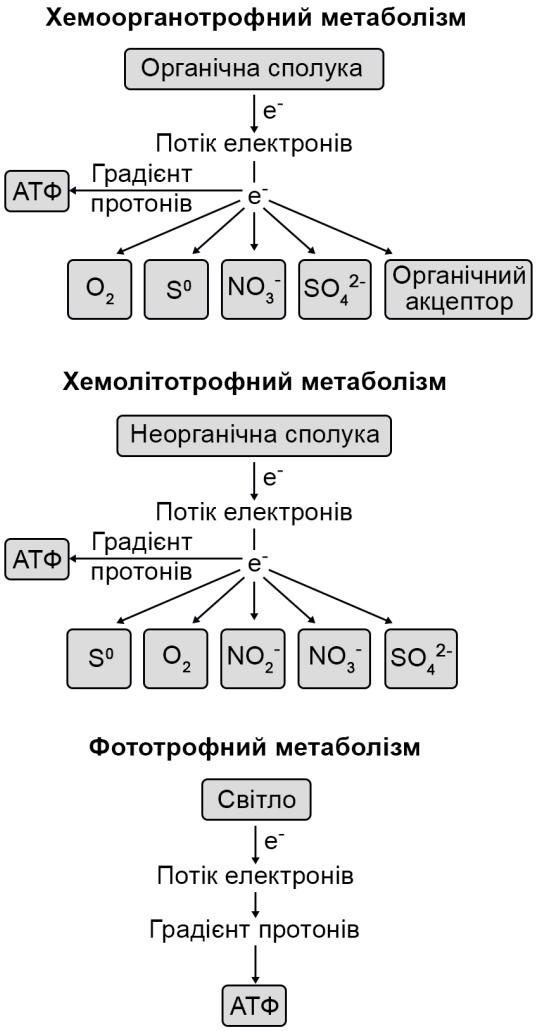


Рис. 6.17. Енергогенеруючі системи у мікроорганізмів

Фототрофні мікроорганізми (рис. 6.17) як і хемотрофи також формують на мембрані градієнт протонів, проте для цього вони використовують енергію квантів світла, яка забезпечує рух електронів через систему переносників та викачування протонів на зовнішній бік мембрани, формуючи трансмембранний потенціал. А генерування АТФ здійснюється як і в хемотрофів, за участі АТФ-синтетази. Це дає підстави вважати, що АТФ-синтетаза та протонрушійна сила трансмембранного потенціалу, сформованого на мембрані, є універсальними біологічними механізмами запасання (консервації) та трансформації енергії, який виник на ранньому етапі еволюції. А різноманітність типів метаболізму у мікроорганізмів забезпечується різними механізмами формування градієнту протонів на мембрані.

6.13. Біосинтез сполук та збирання структурних компонентів

Отримана енергія та органічні сполуки як будівельний матеріал, що утворилися на шляхах катаболізму, далі використовуються для процесів анаболізму – синтезу необхідних клітині низькомолекулярних та високомолекулярних речовин (рис. 6.5).

Більшість катаболічних шляхів містять стратегічні молекулярні проміжні продукти (амфіболіти, або прекурсори), що спрямовуються в анаболічні шляхи. Основні амфіболіти утворюються під час гліколізу (гліцеральдегід-3-фосфат і піруват) і в ЦТК (ацетил-КоА і різні органічні кислоти). Два метаболіти із циклу трикарбонових кислот – оксалоацетат та α-кетоглутарат є важливими проміжними продуктами в синтезі амінокислот, що відбувається шляхом амінування, тобто приєднання аміногрупи до вуглецевого скелета. Шляхи синтезу азотистих основ (пуринів, піримідинів) та коферментів НАД, НАДФ, ФАД походять від амінокислот і тому також залежать від проміжних продуктів ЦТК.

Амфіболіт гліцеральдегід-3-фосфат може бути відведений від гліколізу та використаний для синтезу амінокислот та тригліцеридів (жирів).

З точки зору синтезу піруват також відіграє ключову роль у забезпеченні проміжних продуктів для амінокислот. У разі недостатнього надходження глюкози піруват служить відправною точкою в синтезі глюкози з різних метаболічних проміжних продуктів, називаний глюконеогенезом.

Моносахариди, амінокислоти, жирні кислоти, азотисті основи та вітаміни, як будівельні блоки, з яких складаються різні макромолекули та органели клітини, походять із двох можливих джерел. Вони можуть потрапляти в клітину ззовні як поживні речовини, а можуть бути синтезовані різними шляхами.

Здатність організму синтезувати власні будівельні блоки визначається його генетипом і надзвичайно різниться у мікроорганізмів. Автотрофам для цього потрібен лише CO_2 як джерело вуглецю, а не органічні поживні речовини. Навіть деякі гетеротрофні організми (кишкова паличка, дріжджі) настільки метаболічно завершені, що можуть синтезувати всі клітинні речовини з глюкози. У той же час молочнокислі бактерії та паразити втратили синтетичні можливості та потребують для свого росту найважливіші поживні речовини – фактори росту. Незалежно від їх джерела всі необхідні сполуки повинні бути доступні для синтезу полімерів клітини. Деталі синтезу різняться залежно від типу макромолекул, але всі вони передбачають наявність спеціалізованих ферментів та витрату АТФ.

Роль глюкози в біоенергетиці настільки важлива, що її біосинтез забезпечується кількома альтернативними шляхами. Певні структури в клітині також залежать від достатнього постачання глюкози. Глюкоза – це головний компонент целюлозних клітинних стінок деяких еукаріотів і деяких запасних поживних речовин (крохмаль, глікоген). Один із посередників в

гліколізі, глюкоза-6-Ф, використовується для утворення глікогену. Пептидоглікан містить полімер з мурамової кислоти та глюкозаміну. Фруктоза-6-Ф з гліколізу використовується для утворення цих двох цукрів.

Вуглеводи дезоксирибоза, рибоза також є важливими будівельними блоками нуклеїнових кислот. В компонентах поверхневих структур клітини, таких як капсули та глікокалікс переважають полісахариди. Більшість реакцій полімеризації відбувається з витратами енергії.

Складові частини бактеріальної клітини синтезуються безперервно доки є поживні речовини. Коли анаболізм виробляє достатню кількість макромолекул, а реплікацією ДНК створюються її копії, клітина готується до поділу. Для цього потрібно подвоїти всі необхідні компоненти для збирання рибосом, клітинної мембрани, клітинної стінки, а у разі еукаріот, усіх органел клітини тощо.

6.14. Вилучення з клітини продуктів метаболізму та шкідливих речовин

У мікробіології ефлюкс (секреція) – це переміщення із клітини різноманітних сполук, таких як антибіотики, важкі метали, органічні забруднювачі, сигнали відчуття кворуму, вторинні метаболіти, відходи метаболізму. Механізми вилучення метаболітів і шкідливих речовин із клітини важливі для підтримання нормального гомеостазу та функціонування клітини. Ефлюксні насоси активно виводять ксенобіотики, зокрема антибіотики, тому відповідають також за механізми резистентності до них мікробних патогенів.

Разом з тим, мікроорганізми використовують в біотехнології для масштабного виробництва важливих активних амінокислот, органічних кислот, вітамінів, антибіотиків, ферментів і секреція їх із клітини в середовище в процесі культивування є економічно вигідною для промислового виробництва, оскільки спрощує подальшу екстракцію та очищення отримуваних метаболітів.

Механізми ефлюксного транспорту є активними або пасивними та подібні до тих, що беруть участь у поглинанні метаболітів. Пасивна секреція здійснюється або через ліпідний бішар клітинної мембрани (ліпідна дифузія), або за допомогою транспортерів (полегшена дифузія), що притаманно для більшості незаряджених молекул. Цим способом секретуються деякі низькомолекулярні метаболіти, зокрема кінцеві продукти бродіння, такі як спирти, кетони та органічні кислоти, які в недисоційованому вигляді здатні проникати через мембрану. Гідрофобні та з розгалуженим ланцюгом амінокислоти можуть також секретуватися через клітинну мембрану шляхом пасивної дифузії.

Усі мікроорганізми, за деякими винятками, мають висококонсервативні послідовності ДНК у своєму геномі, які кодують ефлюксні насоси. Ефлюксні насоси активно виводять речовини з мікроорганізму в процесі,

відомому як активне виведення, що є важливою частиною метаболізму ксенобіотиків. Цей механізм активного вилучення відповідає за різні типи резистентності бактеріальних патогенів до антибіотиків, оскільки мікроорганізми мають адаптовані ефлюксні насоси для виведення їх із клітини.

Ефлюксні системи функціонують завдяки енергозалежному механізму (активний транспорт) для викачування небажаних токсичних речовин за допомогою спеціальних насосів. Деякі ефлюксні системи є специфічними для лікарських засобів, тоді як інші можуть транспортувати кілька речовин.

Ефлюксні насоси – це білкові транспортери, локалізовані в цитоплазматичній мембрані клітин різних видів. Вони є активними переносниками, тобто для виконання своїх функцій їм потрібне джерело енергії. Деякі з них є первинними активними транспортерами, що використовують АТФ як джерело енергії, тоді як інші є вторинними активними транспортерами (уніпортерами, симпортерами або антипортерами), у яких транспортування пов'язане з трансмембранним градієнтом протонів.

Бактеріальні ефлюксні переносники класифікуються на п'ять основних надродин, виходячи з їх амінокислотної послідовності та джерела енергії, що використовується для експорту їх субстратів. З них лише одна надродина використовує енергію АТФ, а решта використовують протонний або натрієвий градієнт як джерело енергії. В еукаріотичних клітинах ефлюксні насоси є однією з основних причин стійкості до протипухлинних препаратів.

Питання для самостійного контролю

1. Сформулюйте принцип біохімічної єдності.
2. За якими критеріями характеризуються типи живлення?
3. Назвіть найбільш поширені типи живлення.
4. Що означає термін міксотрофія?
5. Наведіть етапи обміну речовин у мікроорганізмів.
6. Охарактеризуйте використання мікроорганізмами високомолекулярних субстратів.
7. Які відомі механізми проникнення речовин в клітину?
8. Назвіть і охарактеризуйте шляхи катаболізму гексоз.
9. Яке значення ЦТК в метаболізмі мікроорганізмів?
10. Охарактеризуйте функції ЕТЛ для енергетичного метаболізму.
11. Чим схожі та відмінні механізми формування трансмембранного потенціалу в хемотрофів і фототрофів?
12. Які реакції лежать в основі субстратного фосфорилювання?
13. У чому відмінні та схожі енергетичні механізми хемоорганотрофів та хемолітотрофів?
14. Назвіть відмінності механізмів аеробного і анаеробного дихання.
15. Охарактеризуйте механізм генерації АТФ.

РОЗДІЛ 7
ХЕМООРГАНОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ: БРОДІННЯ ТА СУБСТРАТНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ

Бродіння (в англомовній літературі «ферментація») – це анаеробний хемоорганотрофний тип метаболізму, який не потребує зовнішніх акцепторів електронів.

Бродінням називають анаеробний спосіб біологічного окиснення органічних сполук з утворенням АТФ шляхом фосфорилювання АДФ в біохімічних реакціях катаболізму гексоз. Відщеплений на етапі окиснення глюкози водень не накопичується в клітині, а переноситься на органічні молекули, які відновлюються та вилучаються з клітини як продукти метаболізму. У цьому випадку утворення АТФ відбувається як результат біохімічних реакцій окиснення глюкози – субстратного фосфорилювання без участі дихального ланцюга.

Таким чином, окисновідновний баланс в клітинах мікроорганізмів, що бродять, не змінюється, оскільки утворені в результаті продукти бродіння виводяться з клітини.

Дві реакції субстратного фосфорилювання, що відбуваються при катаболізмі глюкози по ФДФ та КДФГ шляхах на етапах перетворення 1,3-дифосфогліцерату до 3-фосфогліцерату та фосфоенолпірувату до піровату з сумарним виходом 2 молекул АТФ на молекулу окисненої глюкози, забезпечують енергією мікроорганізми, які здійснюють процеси бродіння, про що нижче буде йти мова у цьому розділі. Утворення АТФ в реакціях субстратного фосфорилювання здійснюється як в аеробних, так і анаеробних умовах і відбувається в цитоплазмі прокаріотів (а не в мембрані, як при диханні) і матриксі мітохондрій.

Багато мікроорганізмів, що мають ЕТЛ та утворюють АТФ в процесі дихання, такі як пекарські дріжджі, *Escherichia coli*, здатні до бродіння, але лише за умови коли відсутній акцептор електронів. Проте є багато інших організмів, таких як більшість молочнокислих бактерій, клостридії, які мають виключно ферментативний метаболізм.

У цих мікроорганізмів існує проблема підтримання окисно-відновного балансу в клітині, тому вони розробили різноманітні стратегії для її вирішення. Розглянемо існуючі механізми підтримання окисно-відновного балансу бродильними організмами.

У процесі катаболізму органічних сполук під дією дегідрогеназ одним із продуктів окисно-відновних реакцій є водень, зв'язаний з коферментом, що може призводити до зсуву окисно-відновного балансу в клітині. Будь-які організми, у тому числі ті, що бродять, мають підтримувати атомний і окисно-відновний баланс. Це означає, що загальна кількість атомів і електронів кожного типу в продуктах реакції повинна врівноважуватися з кількістю в субстратах.

Окисно-відновний баланс досягається шляхом виведення з організму продуктів метаболізму, таких як органічні кислоти або спирти, які виробляються як продукти бродіння. Однак багато реакцій важко збалансувати, для цього організми, що бродять, мають альтернативні механізми підтримання окисно-відновного балансу. У багатьох процесах бродіння окисно-відновний баланс підтримується утворенням молекулярного водню (H_2). Молекулярний водень, який виділяється в середовище як непотрібний продукт метаболізму бродильних організмів, є дуже потужним донором електронів для дихаючих організмів, які підтримують рівень H_2 у безкисневому середовищі надзвичайно низьким. Цей приклад з H_2 яскраво демонструє поширене явище в природі, коли відходи життєдіяльності одного організму є ресурсом для іншого організму.

Існує кілька типів бродіння, характерних для тих чи інших груп мікроорганізмів, що призводять до утворення різних кінцевих продуктів (рис. 7.1), за якими вони називаються: спиртове, молочнокисле, пропіоновокисле, мурашинокисле (змішане), маслянокисле, ацетонобутилове та інші.

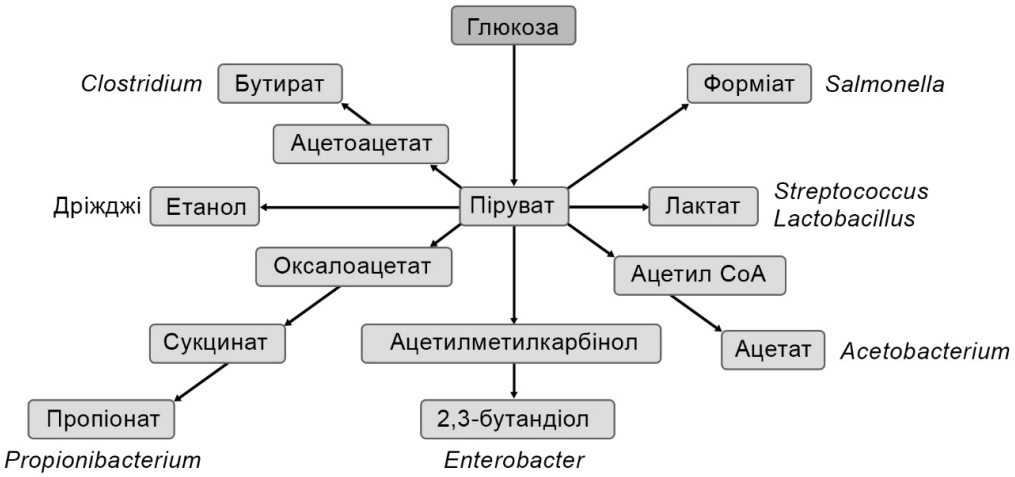


Рис. 7.1. Продукти бродіння та мікроорганізми, що їх утворюють

7.1. Спиртове бродіння

Історично першим було вивчено спиртове (етанольне) бродіння у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (рис. 7.2). Дріжджі окиснюють глюкозу по ФДФ шляху до піровату. Як і більшість грибів вони здійснюють аеробне дихання, проте за відсутності кисню не можуть використати відщеплений від глюкози водень для утворення АТФ в ЕТЛ тому вимушено передають його на ацетальдегід, що утворюється в реакції декарбоксилювання піровату. При цьому ацетальдегід відновлюється до етилового спирту. Таким

чином дріжджі зброджують глюкозу до етанолу та вуглекислоти у відповідності до реакції: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$ (рис. 7.3). Бактерії роду *Sarcina* утворюють етанол тим самим шляхом, що й дріжджі.

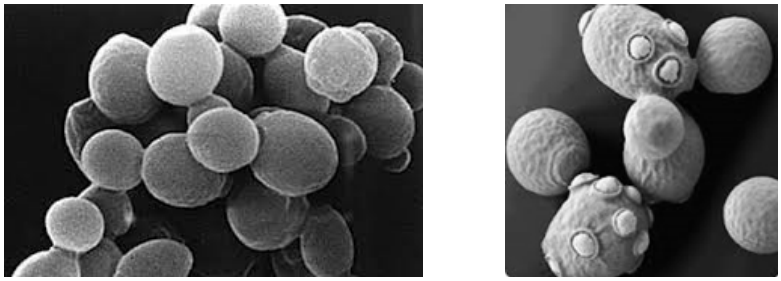


Рис. 7.2. Дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*

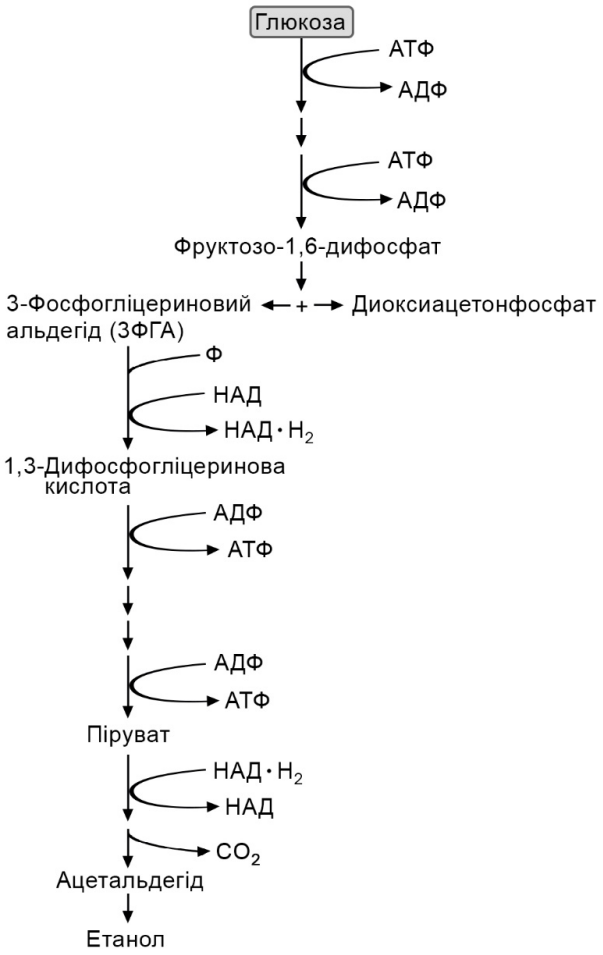


Рис. 7.3. Схема спиртового бродіння у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*

Дріжджі використовують для виробництва різних напоїв – вина, пива, коньяку, горілки, віскі. Необхідно відмітити, що такі виробництва, які базуються на використанні крохмальвмісних субстратів з картоплі та зерна злакових, потребують попереднього гідролізу крохмалю амілазами (рис. 6.4), оскільки самі дріжджі не синтезують цей фермент і не можуть самостійно гідролізувати крохмаль. Тому при виробництві цих напоїв з зерна злаків, його пророщують щоб ініціювати синтез амілаз для гідролізу крохмалю, а для гідролізу крохмалю з картоплі крохмаль попередньо гідролізують додаванням ферменту амілази, отриманого з інших мікроорганізмів біотехнологічним способом.

Етанол, утворений дріжджами у процесі бродіння, не є для них зовсім «байдужим», оскільки вже 1–2% етанолу може збільшувати плинність мембран, і вони перестають підтримувати градієнт протонів. Дріжджі відносяться до толерантних щодо спирту мікроорганізмів. Вони здатні витримувати до 12% етанолу. Найбільш екстремальними в цьому відношенні є дріжджі раси *sake* (до 18%). Їх використовують для приготування рисової горілки (саке).

Дріжджі не можуть існувати в анаеробних умовах постійно. Зазвичай, вони зупиняються в рості після 5–6 поділів, оскільки одна із стадій синтезу їх мембранних фосфоліпідів вимагає присутності кисню.

За наявності приблизно 0,02% кисню дріжджі перемикаються на аеробне дихання, при якому синтезується значно більше АТФ та утворюється в 20 разів більше біомаси. При цьому процес бродіння, навпаки, пригнічується. Це явище отримало назву ефект Пастера, який його відкрив і вивчив.

Вивчаючи спиртове бродіння дріжджів, німецький дослідник Карл Нейберг показав, що при додаванні деяких хімічних речовин можна отримати змінений склад продуктів бродіння, та виділив три форми спиртового бродіння. Нормальне дріжджове бродіння, коли утворюється етиловий спирт, – перша форма бродіння. При зв'язуванні ацетальдегіду бісульфітом акцептором водню стає диоксиацетонфосфат (ДОАФ), який відновлюється та дефосфорилюється до гліцеролу – друга форма бродіння. Цей прийом успішно використовується в біотехнології для одержання гліцеролу. При зміні pH середовища за допомогою $NaHCO_3$ або Na_2HPO_4 ацетальдегід перетворюється шляхом реакції дисмутації в етанол та ацетат, а акцептором водню знову стає ДОАФ, який відновлюється до гліцеролу – третя форма бродіння.

Деякі бактерії здійснюють процес спиртового бродіння за підвищених температур. Наприклад, паличкоподібна бактерія *Zymomonas mobilis* здатна зброджувати цукор за 45 °С. Ця бактерія зброджує сік агави (пульке), з якого шляхом перегонки одержують алкогольний напій текілу. *Zymomonas mobilis*, на відміну від дріжджів, катаболізує глюкозу з утворенням піровату за КДФГ-шляхом.

Типовими збудниками спиртового бродіння є деякі види дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae, S. uvarum, Schizosaccharomyces pombe* та ін.) та бактерій (*Zymomonas mobilis*, *Erwinia amylovora, Sarcina ventriculi*). Деякі клостридії та ентеробактерії здійснюють процеси бродіння, у яких етанол є одним із продуктів. В залежності від умов культивування співвідношення речовин (ацетат, етанол, CO_2, лактат) може значно варіювати. При гетероферментативному молочнокислому бродінні етанол утворюється як мінорний продукт (наприклад, у *Leuconostoc mesenteroides*).

Дріжджі, як факультативні аероби, які можуть отримувати енергію за рахунок субстратного фосфорилювання, все ж не можуть обійтись без молекулярного кисню, оскільки він необхідний їм в реакціях включення атомів кисню до деяких молекул (наприклад, стероїдів, окремих жирних кислот, каротиноїдів). Ці сполуки необхідні для початкових етапів окиснення деяких субстратів (наприклад, метану у метилотрофів та ароматичних молекул при їх розщепленні) за допомогою моно- та диоксигеназ. Слід зазначити, що ці реакції не дають енергії, але вони допомагають подальшому окисненні субстрату під час роботи оксидаз (наприклад, глюкозооксидази, цитохромоксидази).

7.2. Молочнокисле бродіння

Молочнокисле бродіння здійснюють філогенетично неспоріднені бактерії, що поєднуються в групу за ознакою утворення молочної кислоти (рис. 7.4). Це представники порядків *Lactobacillales* та *Bacillales* з філуму *Firmicutes* і члени родини *Bifidobacteriaceae* з філуму *Actinobacteria*. Вони різні за морфологією, але всі грампозитивні та нерухомі.

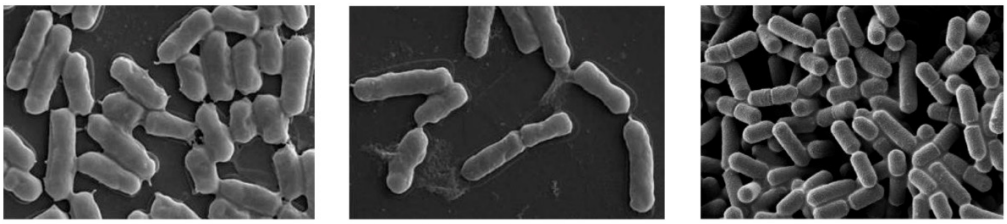


Рис. 7.4. Молочнокислі бактерії: (а) *Lactobacillus plantarum*, (б) *Lactobacillus fermentum,* (в) *Lactobacillus paracasei*

Серед них тільки споролактобацили здатні до спороутворення. Молочнокислі бактерії (МКБ) ростуть виключно на багатих середовищах із додаванням великої кількості факторів росту. Вони можуть використовувати лактозу, чим схожі з бактеріями кишкової групи. Ці мікроорганізми є різною мірою аеротолерантними, але АТФ генерують виключно шляхом субстратного фосфорилювання. У звичайних умовах вони не використову-

ють молекулярний кисень у своєму метаболізмі і живуть лише за рахунок бродіння. У них не виявлені каталаза та цитохроми.

Розрізняють два типи молочнокислого бродіння. При гомоферментативному молочнокислому бродінні цукор використовується шляхом гліколізу (рис. 7.5), при цьому утворюється до 90% молочної кислоти і лише 10% – інші продукти (ацетат, етанол, ацетоїн). У такий спосіб зброджують цукор багато лактококів та лактобацил.

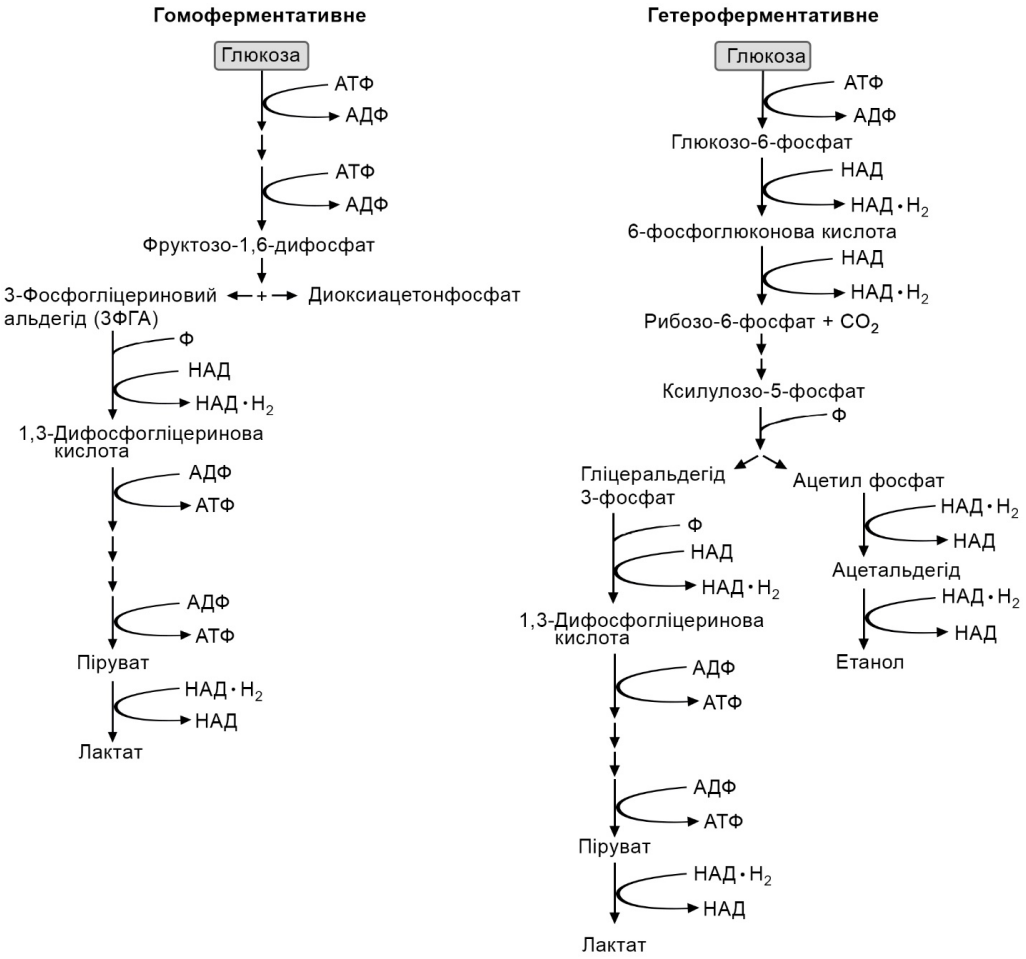


Рис. 7.5. Схеми гомоферментативного та гетероферментативного молочнокислого бродіння

Збудниками гомоферментативного молочнокислого бродіння є, наприклад, бактерії *Streptococcus cremoris, S. lactis, Lactobacillus bulgaricus, L. lactis* та ін. При гетероферментативному молочнокислому бродінні (рис. 7.5) цукор зброджується через пентозофосфатний шлях. При цьому утво-

рюються різноманітні продукти: молочна (близько 50%) та оцтова кислоти, етиловий спирт та гліцерол.

Такий тип бродіння здійснюють *Leuconostoc mesenteroides, Bifidobacterium bifidum, Lactobacillus brevis* та деякі інші мікроорганізми. Окремі гетероферментативні молочнокислі бактерії дуже чутливі до зміни умов середовища. Так, *Leuconostoc mesenteroides* за контакту з киснем утворює значну кількість полісахариду (відбувається ослизнення продукту). Більшість біфідобактерій перестають рости навіть за незначної концентрації кисню в середовищі.

Біфідобактерії характеризуються своєрідною морфологією клітин з булавоподібними або лопатоподібними здуттями на кінцях (рис. 7.6), при поділі утворюють V-подібні структури (вилочки). Вони відрізняються особливою модифікацією гетероферментативного молочнокислого бродіння без утворення етанолу та виділення CO_2, що відбувається у відповідності з схемою: 2 глюкоза → 2 лактат + 3 ацетат.

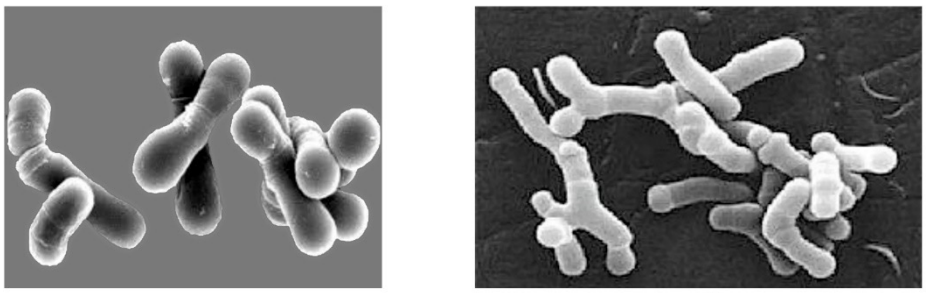


Рис. 7.6. Біфідобактерії: (а) *Bifidobacterium animalis,* (б) *Bifidobacterium longum*

Молочнокислі бактерії входять до складу нормальної мікробіоти людини та тварин та використовуються як пробіотики. Вони знаходять широке застосування в різних галузях господарської діяльності. Оскільки лактат – це природний консервант, що іноді знижує pH до 3, він перешкоджає розвитку мікробіоти гниття.

Властивість утворювати лактат при бродінні використовується при сквашуванні капусти, засолюванні огірків, приготуванні молочнокислих продуктів, силосуванні кормів, в заквасках для житніх сортів хліба та добавках у сирокопчені ковбаси, а також для отримання чистої молочної кислоти.

7.3. Пропіоновокисле бродіння

Первинні бродіння здійснюють мікроорганізми (н.п., дріжджі, молочнокислі бактерії), які розщеплюють та зброджують різні вуглеводи, білки

та жири до відновлених продуктів – кислот, спиртів, H_2 та CO_2. Продукти первинного бродіння уже як субстрати зброджують інші мікроорганізми, продуктами вторинного бродіння є в основному леткі жирні кислоти, (такі як бутират, пропіонат, ацетат), H_2 та CO_2. Прикладом вторинного бродіння є пропіоновокисле бродіння, збудниками якого є пропіоновокислі бактерії.

Цей тип бродіння здійснюють мікроорганізми, які відносяться до підпорядку *Propionibacterineae* філуму *Actinobacteria*. Вони виробляють пропіонову кислоту як основний продукт ферментації глюкози або лактату.

Пропіоновокислі бактерії (пропіонові бактерії) є неспороносними грампозитивними нерухомими паличками (рис. 7.7); утворюють колонії жовтого, помаранчевого або червоного кольору, ростуть як в аеробних, так і в анаеробних умовах; мешкають у рубці та кишківнику жуйних тварин; беруть участь у виготовленні твердих сирів (*Propionibacterium freudenreichii* і *Propionibacterium shermanii*); населяють морські та прісноводні відкладення, є представниками резидентної мікробіоти кишківника людини.

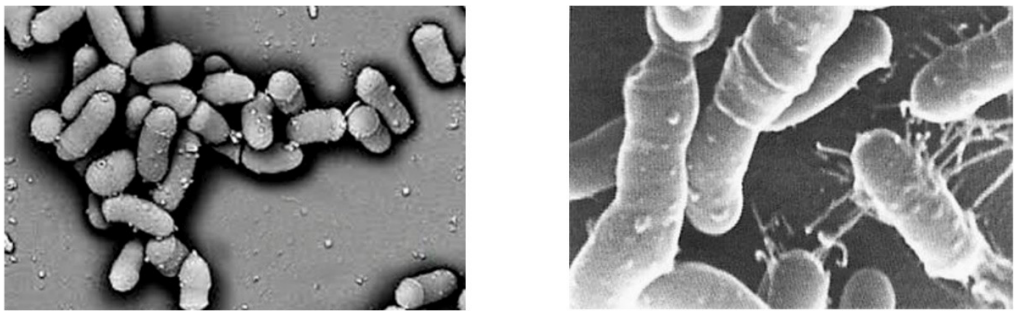


Рис. 7.7. Скануючі електронні мікрофотографії *Propionibacterium freudenreichii*

Пропіоновокисле бродіння включає стадію гетеротрофної фіксації CO_2, при якій C_3-кислота (піруват) добудовується до C_4-кислоти (оксалоацетат) шляхом приєднання молекули вуглекислого газу. Ця реакція «вбудована» у схему пропіоновокислого бродіння, у двох стадіях якого як кофактори беруть участь вітаміни біотин та B_{12}. За їх нестачі бродіння перетворюється на сукцинатне. Утворення пропіонової кислоти відбувається метилмалоніл-КоА-шляхом (рис. 7.8) за схемою: лактат → пропіонат + ацетат + CO_2.

Пропіоновокислі бактерії здатні рости в присутності невеликої кількості кисню, а також здійснювати анаеробне фумаратне дихання, оскільки мають короткий ЕТЛ і цитохроми та каталазу.

Пропіоновокисле бродіння використовується в сироварінні при дозріванні твердих сирів, яке триває два-три місяці. Пропіоновокислі бактерії перетворюють молочну кислоту в пропіонову та оцтову кислоти, що надають сиру гострий смак, а завдяки виділенню вуглекислого газу в сирній

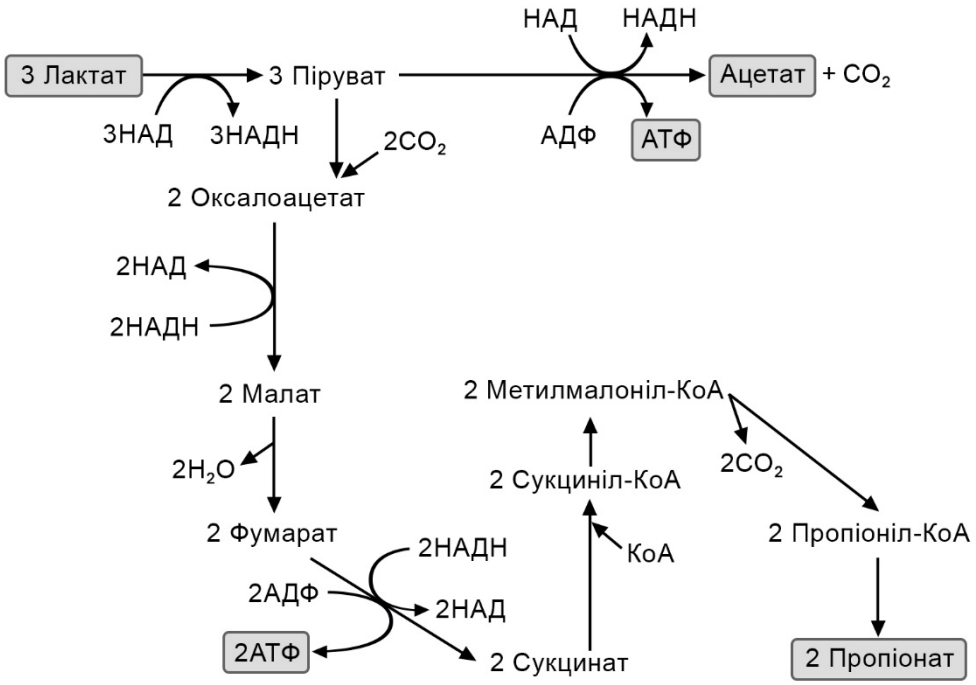


Рис. 7.8. Схема пропіоновокислого бродіння

масі утворюються пустоти («очі»). У зв'язку з тим, що пропіоновокислі бактерії здатні накопичувати у своїх клітинах великі кількості вітаміну B_{12}, їх також використовують для його промислового отримання. Ці бактерії додають у деякі хлібні закваски, а також використовують як пробіотики (*Propionibacterium freudenreichii*).

7.4. Мурашинокисле (змішане) бродіння

Цей вид бродіння призводить до утворення складної суміші органічних кислот – форміат, ацетат, лактат, сукцинат, етилового спирту та ін. продуктів (табл. 7.1), звідси і назва – змішане бродіння. Характерний, але не головний продукт бродіння мурашина кислота (форміат), завдяки якому цей тип бродіння має ще одну назву – мурашинокисле бродіння.

Змішане бродіння здійснюють бактерії, об'єднані в порядок *Enterobacteriales* філуму *Proteobacteria*, а також представники родів *Vibrio* та *Yersinia*, що близькі до них за метаболізмом. Порядок *Enterobacteriales* включає роди *Escherichia, Klebsiella, Shigella, Salmonella, Erwinia, Proteus* та ін. Змішане бродіння в анаеробних умовах здійснюють також бактерії, що світяться – фотобактерії. Катаболізм глюкози при змішаному бродінні здійснюється по гліколітичному шляху.

Кишкові бактерії є факультативними аеробами, тобто вони можуть рости як аеробно, так і анаеробно. За відсутності кисню та наявності ніт-

Таблиця 7.1

Продукти змішаного (мурашинокислого) бродіння

Продукт	*Escherichia coli*	*Enterobacter aerogenes*	*Salmonella typhi*
Лактат	108,8	53,4	121,7
Етанол	41,3	59,4	25,4
Ацетат	32,0	10,1	25,6
Форміат	1,6	5,5	39,3
Сукцинат	18,0	6,0	10,8
Ацетоїн	0,0	0,4	0,0
2,3-Бутандіол	0,0	34,6	0,0
CO_2	54,0	126,9	0,0
H_2	45,2	44,2	0,0

Примітка: Кількість утвореного продукту в мМ на 100 мМ використаної глюкози

рату вони не здійснюють змішане бродіння, а отримують енергію шляхом анаеробного дихання.

7.5. Бутиратнокисле бродіння

Бутиратнокисле (маслянокисле) бродіння проходить у строго анаеробних умовах та здійснюють його облігатно-анаеробні бактерії роду *Clostridium*, що відносяться до родини *Clostridiaceae* з філуму *Firmicutes*. Продуктами бутиратнокислого бродіння є бутират (масляна) та інші органічні кислоти, а також ацетон, бутанол, етанол, ізопропанол. В основі цих процесів лежить зброджування вуглеводів по гліколітичному шляху до піровиноградної кислоти, яка далі зазнає декарбоксилювання з утворенням ацетил-КоА. Основний продукт бродіння – бутират (масляна кислота) синтезується в результаті конденсації двох молекул ацетил-КоА. Перетворення ацетил-КоА на бутират пов'язане з процесами відновлення, в яких як донори водню використовуються молекули НАДН, що утворюються на попередніх етапах в процесі гліколізу.

Крім того, одна з молекул ацетил-КоА, приєднуючи неорганічний фосфат, може піддаватися фосфорилюванню та перетворюється на ацетилфосфат і далі ацетат, що супроводжується синтезом АТФ при субстратному фосфорилюванні. Це одна молекула АТФ, яка синтезується при бутиратнокислому бродінні. Дві інші молекули АТФ утворюються при катаболізмі глюкози по гліколітичному шляху.

Визначення енергетичного виходу бутиратнокислого бродіння та встановлення його рівняння утруднено через лабільність процесу, що скла-

дається з двох основних відгалужень, одного – окисного, що веде до синтезу ацетату та АТФ, іншого – відновного, функція якого – акцептування водню, що утворюється в процесі гліколізу. Кількісне співвідношення між обома відгалуженнями залежить від багатьох зовнішніх чинників (склад середовища, стадія росту бактерій та ін.). Розрахунки показали, що в цілому на одну молекулу глюкози, що зброджується в бутиратнокислому бродінні, утворюється 3,3 молекули АТФ.

Збудниками бутиратнокислого бродіння є клостридії – грампозитивні палички з перитрихальним джгутикуванням, що формують сферичні або овальні ендоспори. Деякі види цього роду суворо анаеробні (*C. pasteurianum, C. kluyveri*), інші аеротолерантні (*C. histolyticum, C. acetobutylicum*). У деяких з них виявлені каталаза та супероксиддисмутаза.

Вони є типовими мешканцями ґрунту, але серед них існують і патогенні види. Наприклад, *C. histolyticum* і *C. septicum*, збудники газової гангрени, – це протеолітичні клостридії, що мешкають у ґрунті, але утворюють токсини при попаданні в багате білковим субстратом середовище (при забрудненні рваних ран ґрунтом).

Бутиратнокисле бродіння має практичне застосування для одержання масляної кислоти, що використовується в парфумерній промисловості. Для її виробництва використовують картоплю, зерно злаків, мелясу (відходи цукрового виробництва).

Бутиратнокислі бактерії нерідко завдають шкоди, викликаючи псування продуктів – прогоркання масла, сметани, квашених овочів, силосу, а також при недостатній стерилізації – псування консервованих грибних та м’ясних продуктів.

7.6. Бродіння без фосфорилювання на рівні субстрату

Деякі способи бродіння виділяють недостатньо синтезованої АТФ за рахунок субстратного фосфорилювання, але мікроорганізми все ж здатні рости в анаеробних умовах без застосування ЕТЛ та зовнішніх акцепторів електронів. У цих випадках катаболізм органічної сполуки пов’язаний з йонними насосами, які створюють градієнт протонів (H^+) чи йонів натрію (Na^+) на клітинній мембрані.

Приклади цього включають бродіння сукцинату *Propionigenium modestum* та бродіння оксалату *Oxalobacter formigenes*. *Propionigenium modestum* вперше було виділено з безкисневих збагачених культур, що росли без акцепторів електронів і з сукцинатом як донором електронів. Бактерія потребує для росту в суворо безкисневих умовах хлорид натрію (NaCl), а для катаболізму – сукцинат: сукцинат$^{2-}$ + H_2O → пропіонат$^-$ + HCO_3^-. Це реакція диспропорціонування, за якої частина молекули сукцинату відновлюється до пропіонату, а інша частина окиснюється до CO_2. Енергію утворює незвичайний фермент, який декарбоксилює (S)-метилмалоніл-КоА та

додає протон до утвореного пропіоніл-КоА. Фермент використовує енергію, що виділяється в результаті цієї реакції декарбоксилювання для транслокації двох Na^+ через мембрану назовні та енергезує її. Далі енергія трансмембранного потенціалу трансформується в АТФ за допомогою Na^+-залежної АТФ-ази, як у ацетогенів, метаногенів і *Pyrococcus*.

Бактерія *Oxalobacter formigenes*, що присутня в кишковому тракті тварин та людей, виконує реакцію диспропорціонування з використанням дикарбонової кислоти оксалату, з відновленням однієї частини молекули, та окисненням іншої частини до CO_2. *O. formigenes* є грамнегативним суровим анаеробом, який здійснює реакцію: оксалат$^{2-}$ + H_2O → форміат$^-$ + HCO_3^- .

Як і при катаболізмі сукцинату *P. modestum*, ця реакція не забезпечує для клітини достатній синтез АТФ шляхом фосфорилювання на субстратному рівні. Крім того, примітно, що організм не має механізму для викачування йонів з клітини для створення трансмембранного потенціалу. Додаткова енергія утворюється, оскільки протони витрачаються в цитоплазмі під час окиснення оксалату та виробництва форміату, що знижує їх концентрацію в клітині. З іншого боку, двовалентна молекула (оксалат) входить в клітину в той час як одновалентна молекула (форміат) виходить, і це сприяє підвищенню різниці потенціалу електрохімічного градієнта. Разом ці сили дозволяють утворити рушійну силу протонів для синтезу достатньої кількості АТФ.

Питання для самостійного контролю

1. Дайте визначення терміну бродіння.
2. Які відомі типи бродіння та їх характеристика?
3. Охарактеризуйте основні етапи біохімії спиртового бродіння.
4. Назвіть приклади мікроорганізмів, що здійснюють спиртове бродіння.
5. Чому потрібно пророщувати зерно при виробництві пива.
6. Що таке ефект Пастера?
7. Назвіть відмінності біохімії гомо- та гетероферментативного бродіння.
8. Назвіть основні продукти гомо- та гетероферментативного бродіння.
9. Сформулюйте потреби в факторах росту молочнокислих бактерій.
10. Назвіть місця мешкання молочнокислих бактерій.
11. Наведіть приклади первинного та вторинного бродіння.
12. Які мікроорганізми здійснюють змішане бродіння. Назвіть продукти цього бродіння.

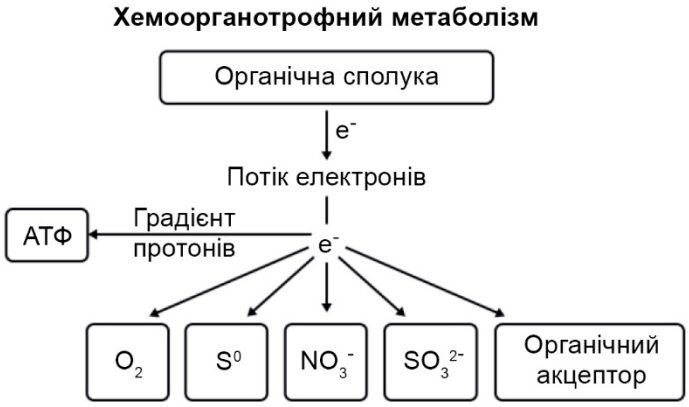
РОЗДІЛ 8
ХЕМООРГАНОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ: ДИХАННЯ ТА ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ

У цьому розділі продовжимо розглядати енергетичний метаболізм хемоорганотрофних мікроорганізмів, а саме окиснення органічних сполук за участі процесів дихання.

Як показано на рис. 6.5, перенесена в клітину через клітинну мембрану молекула глюкози може включатися в реакції катаболізму гексоз трьома шляхами: фруктозодифосфатний, 2-кето-3-дезокси-6-фосфоглюконатний і пентозофосфатний цикл. У результаті глюкоза трансформується в піровиноградну кислоту, що декарбоксилюється з утворенням ацетил-КоА, який передає ацетат до циклу трикарбонових кислот для кінцевого окиснення до CO_2. Таким чином, молекула глюкози повністю окиснюється до 6 молекул CO_2.

Відщеплений від глюкози водень далі транспортується відновленими переносниками (НАДН, $ФАДН_2$) до ланцюга транспорту електронів (ЕТЛ).

Електрони переносяться по ЕТЛ на кисень або інший акцептор, а протони – з цитоплазми на зовнішній бік клітинної мембрани. Таким чином, на мембрані утворюється градієнт протонів, енергія якого в АТФ-синтетазі, що також локалізована в мембрані, трансформується в енергію АТФ (рис. 8.1). Сукупність цих процесів називається клітинним диханням.



У загальному визначенні, клітинне дихання – це процес перенесення електронів, віднятих від донора, по електронтранспортному ланцюгу на кінцевий акцептор з генеруванням трансмембранного потенціалу протонів та утворенням АТФ.

Зверніть увагу, що у хемоорганотрофів донорами електронів слугують органічні молекули (що є предметом розгляду в цьому розділі), а у

хемолітотрофів донором електронів виступають неорганічні сполуки. Хемолітотрофне дихання розглянемо в наступному розділі.

Крім донорів типи клітинного дихання відрізняються за акцепторами електронів – при аеробному диханні акцептором електронів виступає кисень, а при анаеробному диханні – інші акцептори.

8.1. Аеробне дихання

При аеробному диханні кінцевим акцептором електронів в ЕТЛ є молекулярний кисень, тому він необхідний для росту облігатно аеробних мікроорганізмів. При такому кінцевому акцепторі виходить суттєвий виграш енергії порівняно з бродінням, можна вважати, що дихальний ланцюг є досягненням еволюції енергетичних процесів. Разом з тим, необхідно пам'ятати, що аеробний метаболізм включає також безкисневу стадію отримання АТФ, а саме, субстратне фосфорилювання на шляхах катаболізму глюкози.

Прикладами облігатних аеробів є збудник туберкульозу *Mycobacterium tuberculosis*, *Micrococcus luteus*, збудник бактеріального менінгіту *Neisseria meningitidis*, збудник гонореї *N. gonorreae*.

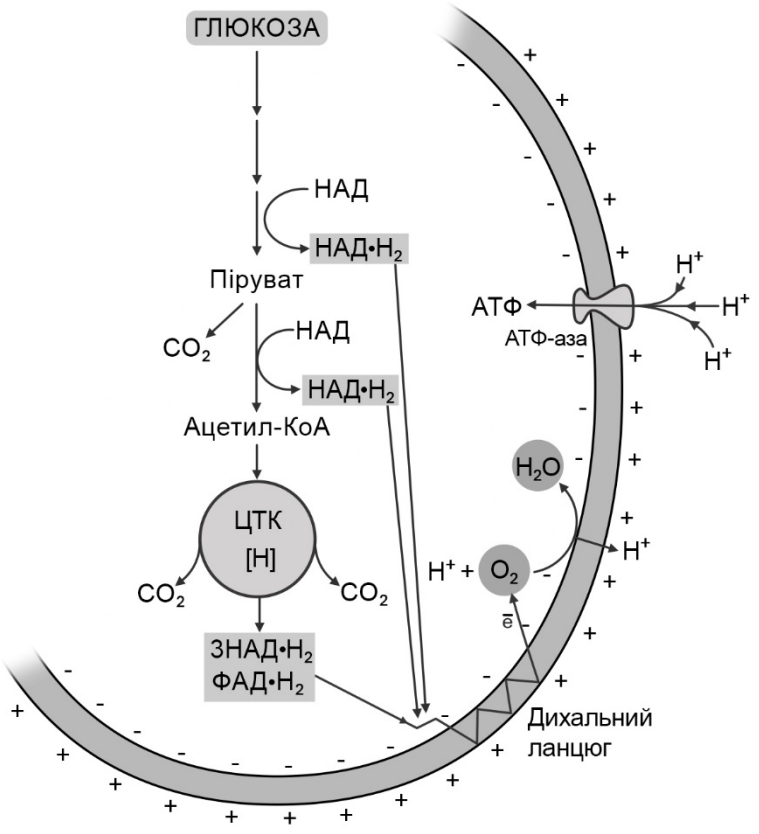


Рис. 8.1. Етапи аеробного дихання за окиснення органічних сполук

Розглянемо схему організації та функціонування компонентів розташованого в мембрані електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) на прикладі грамнегативних бактерій *Paracoccus denitrificans* (рис. 8.2), що широко використовується як модель для вивчення процесів дихання у бактерій. ЕТЛ *Paracoccus denitrificans* складається з чотирьох білкових комплексів та пулу молекул відновлених (Qe^-) та окиснених молекул убіхінонів (Q) в мембрані.

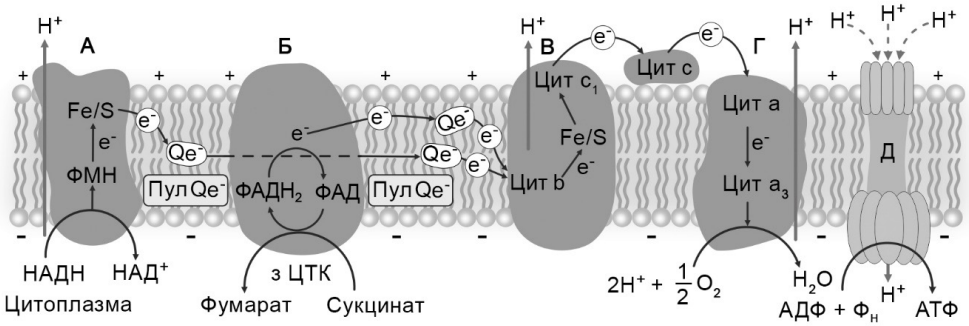


Рис. 8.2. Організація компонентів ЕТЛ та утворення градієнту протонів при аеробному диханні у *Paracoccus denitrificans*: А – комплекс I; Б – комплекс II; В – комплекс III; Г – комплекс IV; Д – АТФ-синтетаза; ФМН – флавінмононуклеотид; Qe^- – убіхінон відновлений; ЦТК – цикл трикарбонових кислот; ФАД – флавінаденіндинуклеотид; Fe/S – залізосірчаний білок; Цит a, b, c – цитохроми; заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани позначають H^+ і OH^-

Відщеплений від органічних сполук в реакціях катаболізму глюкози водень відновлений переносник (НАДН) передає в *комплекс I* (НАДН-дегідрогеназа). Він складається з багатьох білків, які функціонують як єдине ціле. *Комплекс I* окиснює НАДН, при цьому передає 2 e^- на убіхінон (Q), який відновлюється (Qe^-) і поповнює пул Qe^- в мембрані (зверніть увагу, функцію убіхінону у грампозитивних бактерій виконують нафтохінони). При цьому транспортуються 4 H^+ через мембрану назовні.

Комплекс II називають сукцинатдегідрогеназним комплексом, який пов'язаний з окисненням сукцинату до фумарату в циклі трикарбонових кислот (див. розділ 6) де $ФАД^+$ відновлюється до $ФАДН_2$. У *комплексі II* $ФАДН_2$ окиснюється, що призводить до перенесення 2 e^- на убіхінон (Q), який відновлюється (Qe^-) та, як і в випадку з *комплексом I*, поповнює пул Qe^- в мембрані.

Відновлені убухінони (Qe^-) вільно дифундують в мембрані до *комплексу III*, який складається з системи цитохромів bc_1 та залізосірчаного білка Fe/S. Електрони від відновлених убіхінонів надходять у *комплекс III* і передаються до цитохрому *c*. Коли Qe^- віддає 2 e^- *комплексу III*, він вивільняє 4 H^+ за межі клітинної мембрани.

Таким чином, *комплекси I, II і III* пов'язані через пул убіхінонів, оскільки відновлені *комплексом I* та *комплексом II* убіхінони переносять електрони до *комплексу III*.

Цитохром *c* функціонує як периплазматичний човник для переміщення електронів від комплексу III до цитохромів *a* і a_3 комплексу IV. *Комплекс IV* виконує роль термінальної оксидази і переносить електрони на O_2 з приєднанням H^+ із цитоплазми і утворенням молекули H_2O. При транспортуванні 2 e^- комплекс IV вивільняє 2 H^+ за межі клітинної мембрани.

Кінцевий результат для такого організму, як *P. denitrificans*, наступний: при перенесенні 2 e^-, що транспортуються через ЕТЛ від НАДН до O_2, переноситься 10 H^+ назовні мембрани, а на кожні 2 e^- від $ФАДН_2$ до молекули кисню транспортується назовні 6 H^+.

Транспортовані за межі клітинної мембрани протони формують трансмембранний потенціал протонів $-\Delta\mu_н^+$ (рис. 6.14), який є законсервованою біологічною формою енергії. Необхідно відзначити, що у алкалофільних бактерій функцію H^+ виконує йон Na^+. Відповідно, у цих бактерій формується трансмембранний потенціал Na^+ ($\Delta\mu_{Na}+$).

Escherichia coli є метаболічно універсальним хемоорганотрофом, електронтранспортний ланцюг якого схожий, але не ідентичний з *Paracoccus denitrificans*. Основна організація дихального ланцюга кишкової палички (рис. 8.3) це комплекс I (НАДН-дегідрогеназа), який складається з 14 різних білків. За ним розташований комплекс II, а потім хінони (убіхінони) і термінальна редуктаза, яка містить цитохроми *b*-типу та *o*-типу, на відміну від цитохромів *a*-типу комплексу IV у *P. denitrificans*. Залежно

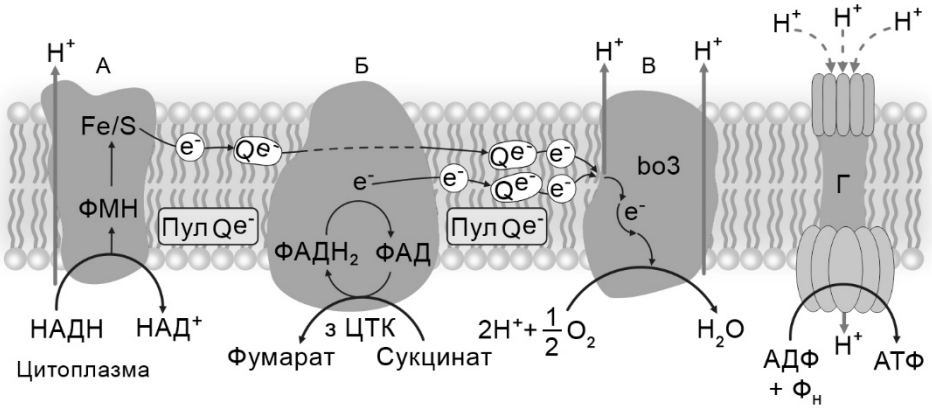


Рис. 8.3. Ланцюг транспортування електронів в *Escherichia coli*, який використовується під час аеробного дихання: А – комплекс I; Б – комплекс II; В – комплекс IV (це – цитохром bo_3, зверніть увагу, комплекс III у *E. coli* відсутній); Г – АТФ-синтетаза; Qe^- – убіхінон відновлений; ФМН – флавінмононуклеотид; ФАД – флавінаденіндинуклеотид; Fe/S – залізосірчаний білок; ЦТК – цикл трикарбонових кислот; Цит – цитохром. Заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-

від умов середовища кишкова паличка може замінити ці компоненти, використовуючи альтернативні хінони (наприклад менахінон) або – альтернативну дегідрогеназу, або термінальну редуктазу (*E. coli* має принаймні п'ять наборів кожного). Характерним для кишкової палички є те, що в ЕТЛ відсутній комплекс III), що має негативні енергетичні наслідки для її клітини.

Відсутність комплексу III у *E. coli* означає, що під час аеробного дихання *E. coli* отримує менше енергії ніж *P. denitrificans*. На кожні 2 електрони, які проходять через її електронтранспортний ланцюг до O_2, *E. coli* переносить лише 8 H^+ через мембрану, тоді як *P. denitrificans* – 10 H^+ (порівняйте рис. 8.1 і 8.2). Отже, організація ланцюга транспортування електронів у *E. coli* дозволяє накопичувати менше енергії ніж *P. denitrificans*.

На два електрони, які потрапляють в електронтранспортний ланцюг утворюється 2 або 3 молекули АТФ в залежності від складу переносників. Сумарний енергетичний вихід аеробного дихання у дріжджів та *Paracoccus denitrificans*, коли катаболізм глюкози здійснюється гліколітичним шляхом, становить 38 молекул АТФ, в той час як при бродінні за субстратного фосфорилювання у дріжджів – 2 молекули АТФ.

В інших прокаріотів, таких як *Corynebacterium diphtheriae*, в дихальному ланцюзі є тільки один пункт перенесення протонів. У *Mycobacterium phlei* – три, як у дихальному ланцюзі мітохондрій дріжджів. Отже, дихальні ланцюги різних бактерій суттєво різняться та вони переважно менш енергетично ефективні ніж у *Paracoccus denitrificans* та мітохондрій.

У клітинній мембрані всіх бактерій і архей та мембранах мітохондрій еукаріотів поряд із переносниками міститься АТФ-синтетазна система (рис 8.2; 8.3), що утворює АТФ шляхом «прокачування» протонів через «протонну помпу». За рахунок утвореної на мембрані клітини різниці концентрацій протони прокачуються ззовні в клітину через АТФ-синтетазу, вмонтовану в мембрану, яка каталізує перетворення АДФ в АТФ, а мембрана при цьому розряджається. Частина енергії трансмембранного потенціалу витрачається безпосередньо на транспорт речовин у клітину, рух джгутиків та ін.

8.2. Анаеробне дихання

Як показано в попередньому розділі для багатьох анаеробних мікроорганізмів, що бродять, можливості забезпечення енергією вичерпуються отриманням АТФ при фосфорилюванні лише на рівні окиснення субстрату.

Подальші етапи та цикли розщеплень органічних сполук у цих мікроорганізмів виконують роль лише постачання попередників для біосинтезу. При цьому для підтримки окисновідновної рівноваги в клітині постає завдання позбавитися накопичених відновників. У мікроорганізмів, що бродять, це відбувається шляхом перенесення водню на органічні сполуки,

які при цьому відновлюються і вилучаються з клітини, та виділенням молекулярного водню, який використовують метаногени та/або сульфідогени як енергетичний субстрат.

Мікроорганізми, які мають ЕТЛ, можуть підтримувати окисновідновну рівновагу в клітині шляхом передавання електронів в ЕТЛ, де вони на кінцевому етапі скидаються на певний акцептор. У аеробів таким акцептором слугує O_2, а у анаеробів – акцептори іншої природи (не кисень).

Таким чином, анаеробний енергогенеруючий процес, в якому кінцевим акцептором електронів служить окиснена органічна або неорганічна речовина, відмінна від кисню (табл. 8.1), називають анаеробним диханням. Отже, анаеробне дихання, як і аеробне, пов'язане з функціонуванням ЕТЛ. Ймовірно, еволюція процесів запасання енергії йшла від субстратного фосфорилювання через анаеробне дихання (на мембранах без використання кисню) до аеробного дихання (на мембранах з використанням кисню).

Таблиця 8.1

Деякі акцептори електронів при анаеробному диханні

Акцептор електронів	Відновлений продукт	Реакція	Мікроорганізм
H^+	H_2	Відновлення протону	Rhodopseudomonas sphaeroides
CO_2	Ацетат	Карбонатне дихання/ ацетогенез	Ацетогени
CO_2	CH_4	Карбонатне дихання/ метаногенез	Метаногени
$^S0$	H_2S	Сіркове дихання	*Desulfomonas, Desulfoproteus spp.*
SO^{42}-	H_2S	Сульфатне дихання	*Desulfovibrio, Desulfotomaculum spp.*
Фумарат	Сукцинат	Фумаратне дихання	*E. coli, Bacteroides spp.*
Fe^{3+}	Fe^{2+}	Залізне дихання	*Pseudomonas, Bacillus, Geobacter spp.*
NO_3^-	NO_2^-	Нітратне дихання	*Ентеробактерії*
SeO_4^{2-}	SeO_2^{2-}	Селенатне дихання	*Aeromonas, Bacillus, Thauera spp.*
NO^2-	N_2	Денітрифікація	*Parococcus, Bacillus, Pseudomonas spp.*
Mn^{4+}	Mn^{2+}	Марганцеве дихання	*Leptothrix*, *Pseudomonas*

При анаеробному диханні ланцюг переносу електронів коротше ніж при аеробному диханні, оскільки різниця потенціалів між донором і акцептором електронів менша, тому менше викачується протонів з клітини та менше генерується АТФ. Також ланцюг укорочується, якщо донором електронів слугує субстрат, окисновідновний потенціал якого більш позитивний, ніж у піридиннуклеотидів (наприклад, при окисненні сукцинату сукцинатдегідрогеназа передає електрони на флавіни).

Види анаеробного дихання поділяються по кінцевому акцептору електронів, що використовується (табл. 8.1). Далі розглянемо процеси анаеробного дихання на прикладах використання NO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-} як акцепторів електронів.

8.2.1. Нітратне дихання

Процеси відновлення нітрату поширені в живій природі. Це насамперед відновлення нітрату ($NO_3^- \rightarrow NH_4^+$) для біосинтетичних процесів, коли відновлений азот (у формі амонію) вбудовується в органічні молекули. Така *асиміляційна нітратредукція* відома у рослин, грибів, бактерій і відбувається за допомогою розташованої в цитоплазмі нітратредуктази, що містить молібден, і складну гемвмісну залізосіркову нітритредуктазу.

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow HNO \rightarrow NH_2OH \rightarrow NH_3$$

Асиміляційна нітратредукція (синтетичний процес)

$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

Дисиміляційна нітратредукція (дихання)

Процеси анаеробного дихання з нітратом як кінцевим акцептором електронів називають дисиміляційною нітратредукцією, оскільки відновлені форми азоту не йдуть безпосередньо на синтетичні процеси. Бактерії, здатні до дисиміляційної нітратредукції, є факультативними аеробами і мають повну дихальну систему. В аеробних умовах вони використовують кисень, а в анаеробних умовах – інші акцептори, наприклад, *Paracoccus denitrificans* та *E. coli* використовують нітрат. При цьому синтез мембранозв'язаних нітрат- і нітритредуктаз індукується тільки в анаеробних умовах, а в деяких мікроорганізмів – ще й за присутності нітрату.

При нітратному диханні кінцевим акцептором електронів в ЕТЛ слугує NO_3^-, який відновлюється. Біфідобактерії та ентеробактерії відновлюють нітрат лише до нітриту ($NO_3^- \rightarrow NO_2^-$). Цей процес відновлення нітрату має назву *нітратредукція*. *Paracoccus denitrificans,* псевдомонади, бацили здійснюють *денітрифікацію,* відновлюють нітрат до молекулярного азоту ($NO_3^- \rightarrow N_2$).

При нітратредукції та денітрифікації донором електронів виступає, зазвичай, органічна речовина, а кінцевим акцептором – нітрат. Відщеплені

від органічних сполук електрони переносяться по ЕТЛ на нітрат, а протони виносяться із клітини та формують градієнт протонів на мембрані, енергія якого призводить до синтезу АТФ в АТФ-синтетазному комплексі.

Денітрифікація – це єдиний процес, що дозволяє перетворити зв'язаний азот на газоподібний, і саме таким чином відбувається винесення азоту з ґрунту в атмосферу.

Прикладом факультативного анаероба, який може здійснювати як аеробне дихання, так і анаеробне дихання є *Paracoccus denitrificans*. На рис. 8.2 показано ЕТЛ, який використовує цей мікроорганізм під час аеробного дихання. У безкисневих умовах *P. denitrificans* використовує NO_3^- (за його наявності) як акцептор електронів, здійснює денітрифікацію та відновлює нітрат до газоподібного азоту (N_2).

Як показано на рис. 8.4, анаеробний ЕТЛ є більш складним, ніж аеробний (рис. 8.2). Анаеробний ЕТЛ *P. denitrificans* є розгалуженим і використовує різні переносники електронів, деякі з них розташовані в периплазматичному просторі.

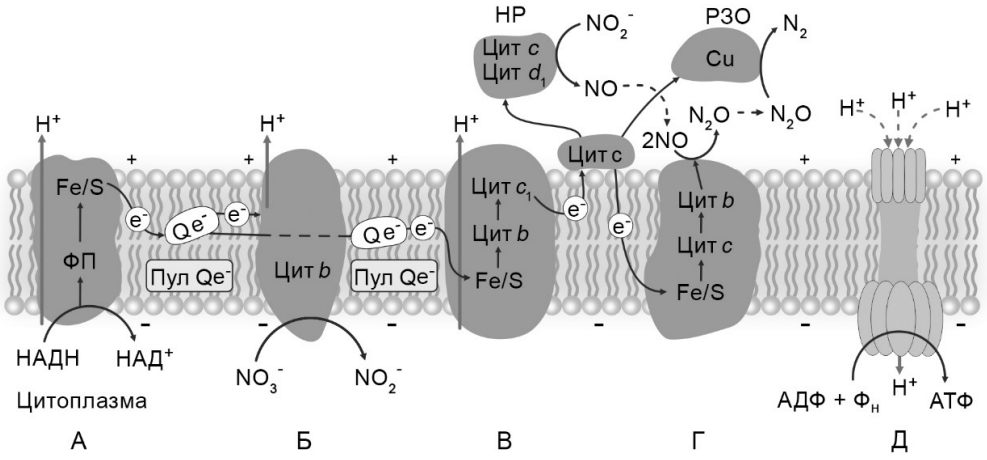


Рис. 8.4. Ланцюг транспортування електронів *Paracoccus denitrificans*, який використовується при анаеробному диханні: ФП – флавопротеїн; Qe^- – убіхінон; Fe/S – залізосірчаний білок; Цит – цитохром; Заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-; А – комплекс I, Б – нітратредуктаза, В – комплекс III, Г – редуктаза оксиду азоту, Д – АТФ-синтетаза, НР – нітритредуктаза; РЗО – редуктаза закису азоту, яка має незвичайний мідно-сірчаний центр

Анаеробне відновлення NO_3^- до N_2 робить цей азот недоступним для засвоєння клітиною в біосинтезі амінокислот і нуклеотидів. Денітрифікація, яку здійснює *P. denitrificans*, є багатоетапним процесом за участю чотирьох ферментів (рис. 8.4). Ці ферменти функціонують послідовно, відновлюючи NO_3^- до нітриту (NO_2^-), нітрит до оксиду азоту (NO), потім NO до закису азоту (N_2O) і нарешті N_2O до N_2.

Кишкова паличка, на відміну від *P. denitrificans,* при анаеробному диханні використовує нітрат як акцептор електронів, але відновлює NO_3^- нітратредуктазою лише до NO_2^- (рис. 8.5). Однак, пара NO_3^-/NO_2^-, яка використовується при анаеробному диханні, менш електропозитивна, ніж пара O_2/H_2O при аеробному диханні (рис. 8.3) і тому анаеробне дихання дає кишковій паличці менше енергії ніж аеробне дихання. При транспортуванні 2-х електронів по ЕТЛ з використанням NO_3^-, як акцептора електронів, через мембрану клітини виноситься 6 H^+, а при аеробному диханні з використанням O_2 переноситься 8 H^+ (рис. 8.5).

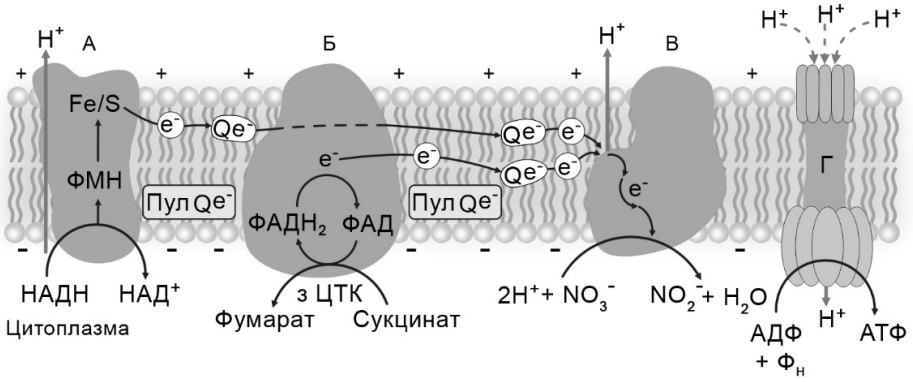


Рис. 8.5. Ланцюг транспортування електронів *Escherichia coli*, який використовується під час анаеробного дихання: А – комплекс I; Б – комплекс II; В – нітрат редуктаза; Г – АТФ-синтетаза; Q – убіхінон; Цит – цитохром; Заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-

Отже, аеробні організми завжди мають можливість отримати більше енергії, використовуючи кисень у порівнянні з анаеробними. Однак кисень погано розчиняється в водному середовищі та витрачається дуже швидко, тому за дефіциту кисню факультативні аероби використовують інші можливі для них акцептори електронів.

Мікроорганізми, які здійснюють лише відновлення нітрату до нітриту, наприклад, кишкові бактерії, можуть накопичувати його в середовищі існування, асиміляційно відновлювати до NH_4^+ та використовувати в синтезі амінокислот та інших азотовмісних сполук.

Відновлення нітрату кишковою мікробіотою до нітриту може призводити до ціанозу, оскільки еритроцити, блоковані нітритом, не можуть переносити кисень. Це особливо небезпечно для немовлят.

8.2.2. Сульфатне дихання

При сульфатному диханні кінцевим акцептором електронів служить сульфат. Тому фізіологічну групу бактерій, що відновлює сульфат, називають сульфатредукторами.

Сульфатредуктори широко поширені в таксономічних групах, але вони на відміну нітратредукторів суворі (облігатні) анаероби. Зазвичай мешкають у морській воді та донних осадах. Більшість сірководню в природі виникає завдяки сульфатному диханню (або дисиміляційній сульфатредукції):

$$8[H] + SO_4^{2+} \rightarrow H_2S + 2H_2O + 2OH^-$$

Донорами електронів при сульфатредукції можуть бути H_2, форміат, ацетат, пропіонат, бутират, лактат, вищі жирні кислоти, етанол та ін. Одна група сульфатредукторів окиснює донори водню не повністю та при цьому виділяє ацетат через незамикання циклу трикарбонових кислот (зазвичай відсутня 2-оксоглутаратдегідрогеназа).

Друга група сульфатредукторів окиснює органічні сполуки до H_2O та CO_2. Відняті від органічних сполук електрони переносяться на сульфат (рис. 8.6) з утворенням сірководню та формуванням градієнту протонів на зовнішній стороні клітинної мембрани. У табл. 8.2 наведено коротку характеристику представників різних таксономічних груп сульфатредукторів.

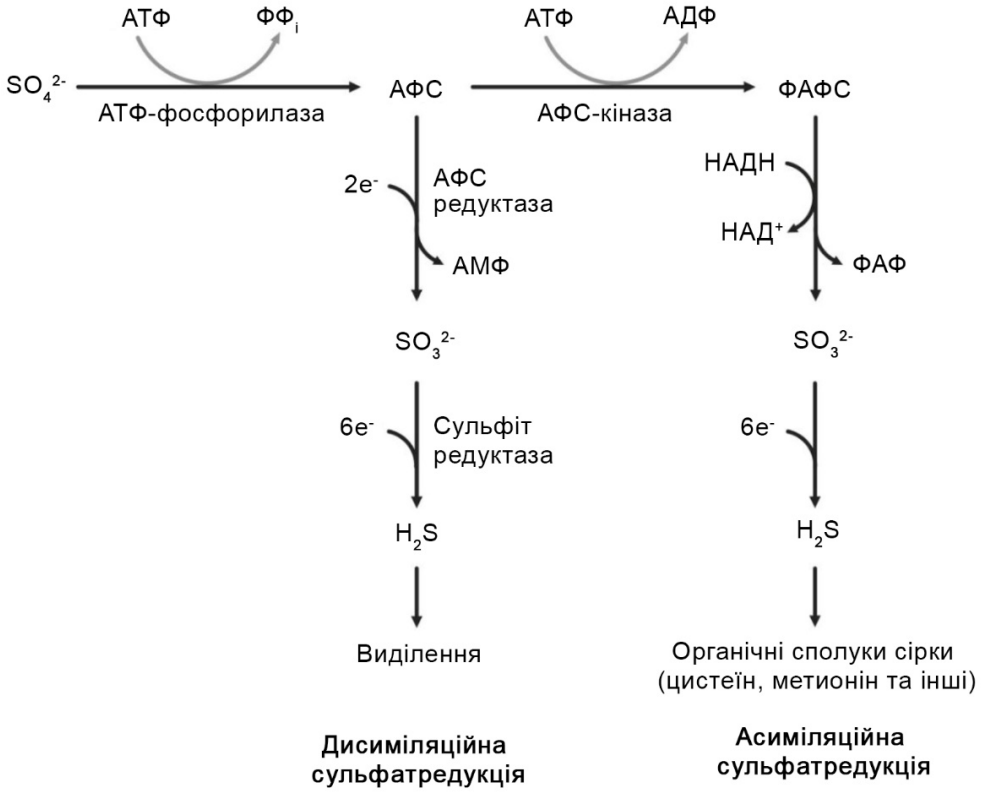


Рис. 8.6. Схема відновлення сульфату сульфатредукуючими бактеріями: АФС – аденозинфосфосульфат, ФАФС – фосфоаденозинфосфосульфат, ФАФ – фосфоаденозинфосфат

Таблиця 8.2

Представники сульфатредукторів різних таксономічних груп

Група	Коротка характеристика
Бактерії	
А. *Утворюють спори:*	
р. *Desulfotomaculum* р. *Desulfonispora* р. *Desulfosporosinus*	Грампозитивні, різні по морфології мікроорганізми, які утворюють ендоспори. Здатні до повного чи не повного окиснення субстратів. Деякі – автотрофи, азотфіксатори, термофіли. Мають цит *b*(*c*), не містять десульфовівірину
Б. *Не утворюють спори:*	
р. *Desulfobacter*	Палички, повністю окиснюють ацетат та етанол, деякі здатні до автотрофії
р. *Desulfonema*	Ниткоподібні, пересуваються ковзанням. Повністю окиснюють ацетат
р. *Thermodesulfobacterium*	Термофільні палички з неповним окисненням субстратів
р. *Desulfosarcina*	Крупні коки у кубоїдних пакетах з повним окисненням ацетату
р. *Desulfovibrio*	Рухливі вібріони, які мають цит *c*, *b* та десульфовівірин. Мають незамкнутий ЦТК
Археї	
Archaeoglobus fulgidus	Археї з непостійною формою клітини з морського геотермального джерела

Крім сульфатного дихання, прокаріоти, гриби та рослини здійснюють відновлення сульфату шляхом асиміляційної сульфатредукції, включаючи потім відновлений атом сірки в сірковмісні амінокислоти та білки. Обидва процеси мають загальний початок (рис. 8.6). Сульфатредуктори бувають гетеротрофні чи автотрофні.

У несприятливих умовах, коли сульфат виснажується, а органіки багато, сульфатредуктори можуть переходити на зброджування лактату і пірувату, утворюючи ацетат і H_2.

Сульфатредуктори є важливою ланкою глобального кругообігу сірки, що поставляють сульфід для аноксигенних фототрофів. З іншого боку, накопичення сірководню може призводити до замору риб, а також до корозії металу та бетону. Більшість сірководню в природі, особливо в морському середовищі, зокрема в Чорному морі, виникає саме завдяки сульфатному диханню.

8.2.3. Сіркове дихання

Сіркове дихання може відбуватися в місцях мешкання, пов'язаних з вулканічною діяльністю, де багато абіогенної елементарної сірки, яка в анаеробних умовах використовується як акцептор електронів. Найбільше сірковідновних мікроорганізмів виявлено серед архей, які, як правило, існують в таких екстремальних умовах (табл. 8.3).

Таблиця 8.3

Представники прокаріот, що здійснюють сіркове дихання

Мікроорганізми	Донори електронів	Роль S^0	Місця проживання
Мезофіли			
Desulfuromonas	Ацетат, етанол	Акцептор електронів	Прісноводний осад
Campylobacter	H_2, форміат	Акцептор електронів	Осад стоків
Spirillum	H_2, форміат	Акцептор електронів	Анаеробні стоки
Wolinella	H_2, форміат	Акцептор та донор електронів	Рубець жуйних тварин
Термофіли			
Desulfurella	Ацетат	Акцептор електронів	Ціанобактеріальні мати
Екстремальні термофіли			
Thermotoga	H_2, органічні речовини	Детоксикація	Морський осад, підводні морські термальні джерела, сірчані наземні джерела

8.2.4. Залізне дихання

Більш екзотичний вид анаеробного дихання – це залізне дихання, акцептором електронів слугує тривалентне залізо. При відновленні Fe^{3+} в Fe^{2+} реакція вигідна термодинамічно, але проблема в тому, що сполуки тривалентного заліза практично нерозчинні і випадають в осад, який знаходиться поза клітиною. Тому клітини постійно відчувають дефіцит акцептора електронів (Fe^{3+}). Для доставки Fe^{3+} в клітину задіяні комплексоутворюючі сполуки – сидерофори. Розраховано, що під час відновлення Fe^{3+} до Fe^{2+} та використання молекули ацетату як донора електронів може бути синтезовано близько 11 молекул АТФ. Тривалентне залізо здатні відновлювати мікроорганізми *Geobacter metallireducens* і *G. sulfurreducens*. Останній здатний також відновлювати S^o.

Вважається, що залізне дихання виникло раніше, ніж сульфатне, нітратне та аеробне. Виявлено також організми, які здатні відновлювати марганець – MnO_2(IV) (нерозчинний) в MnO(II) (розчинний).

8.2.5. Фумаратне дихання

Ще один специфічний тип дихання – фумаратне, коли кінцевим акцептором служить органічна сполука фумарат. До фумаратного дихання здатні ентеробактерії, вібріони та пропіоновокислі бактерії, що мають електронтранспортний ланцюг із сукцинатдегідрогеназою:

$$2[H^+] + \text{фумарат} \rightarrow \text{сукцинат}.$$

При цьому ланцюг перенесення електронів дуже короткий, при відновленні одного моля фумарату утворюється один моль АТФ.

8.2.6. Карбонатне дихання

Карбонатним диханням називають анаеробне дихання, де донором електронів є молекулярний водень, а кінцевим акцептором електронів слугує CO_2 або CO. Карбонатне дихання здійснюють гомоацетогенні бактерії та метаногени. Ацетогенез та метаногенез – це енергогенеруючі метаболізми, що використовують відновлення CO_2 для утворення ацетату та метану, відповідно.

Ацетогенез

Дві основні групи облігатно анаеробних мікроорганізмів використовують CO_2 як акцептор електронів для консервації енергії. Одна з них – ацетогени. Водень (H_2) є основним донором електронів для обох груп організмів. Схему їхнього енергетичного метаболізму – ацетогенезу та метаногенезу показано на рис. 8.7.

Обидва процеси пов'язані з йонними насосами, або протонів (H^+), або йонів натрію (Na^+), як механізмами формування трансмембранного потенціалу, який АТФ-синтетази, що локалізовані в мембрані, трансформують в АТФ.

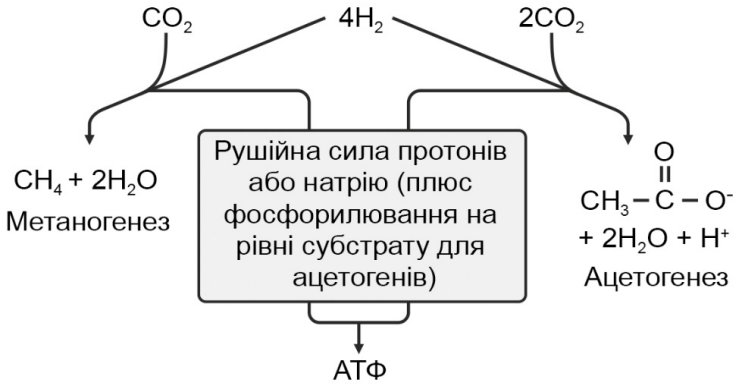


Рис. 8.7. Процеси ацетогенезу та метаногенезу

На шляху ацетогенезу також відбуваються реакції фосфорилювання на субстратному рівні. Ацетогени здійснюють реакцію:

$4\ H_2 + H^+ + 2\ HCO_3^- \rightarrow CH_3COO^- + 4\ H_2O\ \Delta G^{0'} = -105$ кДж.

Окрім H_2, як донори електронів для ацетогенезу вони використовують різні C_1-сполуки, такі як метанол, декілька метоксильованих ароматичних сполук, цукри, органічні та амінокислоти, спирти та деякі азотисті основи, залежно від організму.

Багато ацетогенів також можуть рости шляхом анаеробного дихання з акцепторами NO_3^- або $S_2O_3^-$. Відновлення CO_2 є основною особливістю ацетогенного способу життя, причому CO_2 служить як акцептором електронів, так і проміжним продуктом, через який асимілюється вуглець.

Ацетогени відновлюють CO_2 до ацетату за допомогою відновного ацетил-КоА-шляху (також званого шляхом Вуда-Люнгдаля), основного шляху в облігатних анаеробів для фіксації CO_2 та виробництва ацетату.

Ацетогени, такі як *Acetobacterium woodii* та *Clostridium aceticum*, можуть рости або хемоорганотрофно шляхом ферментації цукрів, або хемолітотрофно та автотрофно шляхом відновлення CO_2 до ацетату з H_2 як донором електронів. У будь-якому випадку єдиним органічним продуктом є ацетат.

Більшість ацетогенних бактерій, що виробляють ацетат в енергетичному метаболізмі, є грампозитивними бактеріями, і багато з них є видами родів *Clostridium* або *Acetobacterium*. Кілька інших грампозитивних та багато різних грамнегативних бактерій та архей використовують відновний ацетил-КоА-шлях для біосинтетичних процесів. До них належать автотрофні сульфатредукуючі бактерії, анаммокс бактерії, метаногени.

Метаногенез

Біологічне виробництво метану, або метаногенез, притаманне комплексу суворо анаеробних архей, названих метаногенами. Ці організми поширені в прісноводних відкладеннях. У морському анаеробному середовищі вони є останньою ланкою харчового ланцюга: гідролітики → бродильники → ацетогени → метаногени. Метан утворюється також у рубці жуйних (корова виділяє до 900 л метану на день) та в кишківнику термітів.

Відновлення CO_2 за допомогою H_2 з утворенням CH_4 є основним шляхом метаногенезу та формою анаеробного дихання. Майже всі метаногени можуть використовувати H_2 як джерело електронів, а CO_2, як акцептор електронів, та відновлюють його до CH_4. Деякі також можуть споживати кілька додаткових субстратів, включаючи ацетат, форміат, метанол та метиламіни.

Метаногени використовують відновний шлях ацетил-КоА для асиміляції CO_2. У них є щонайменше два механізми консервації енергії – натрійрушійна сила (яка може бути перетворена на рушійну силу протонів), пов'язана з дією метилтрансферази, та протонрушійна сила, пов'язана з

цитохромзалежними процесами транспорту електронів. За стандартних умов вільна енергія метаногенезу з H_2+ CO_2 становить -131 кДж/моль, а ацетогенезу – -95 кДж/моль.

Вважають, що метаногени – це одні з найдавніших організмів в історії Землі, коли атмосфера складалася з CO_2, H_2 та CO. Вони широко представлені також у нафтових пластах, що свідчить про їхню давню історію.

8.3. Неповне окиснення

Варіант аеробного метаболізму, коли органічний субстрат розщеплюється не повністю і кінцевий продукт не CO_2 (або не лише CO_2), називають неповним окисненням. Кінцевими продуктами неповного окиснення можуть бути органічні сполуки, які часто схожі на продукти деяких бродінь. Утворення неповністю окиснених продуктів пояснюється або дефектами у ферментних системах мікроорганізмів, або уповільненням їх роботи через неоптимальні умови культивування.

Типові представники мікроорганізмів, які здійснюють неповні окиснення, – група оцтовокислих бактерій (рис. 8.8). Це грамнегативні дрібні палички, деякі рухливі, широко поширені в природі (живуть на листі рослин), ацидотолерантні (pH 3–5), багато хто володіє значною стійкістю до етанолу (9–10%). Найбільш відомі два роди: *Acetobacter* з перитрихальним джгутикуванням та *Cluconobacter* з полярно розташованими джгутиками. Цим бактеріям властива здатність до утворення кислот шляхом неповного окиснення цукрів та спиртів.

Рис. 8.8. Оцтовокислі бактерії *Acetobacter aceti*

У бактерій роду *Acetobacter* висока активність алкогольдегідрогенази поєднується з низькою активністю ферментів ЦТК, а у *Gluconobacter* відсутній ключовий фермент ЦТК α-кетоглутаратдегідрогеназа.

Оцтовокислі бактерії використовують у біотехнології для перетворення етанолу на ацетат, сорбіту на сорбозу, утворення глюконату та ацетону.

Багато грибів здатні виділяти у середовище продукти метаболізму (органічні кислоти та амінокислоти). Це пов'язано з «дезорганізацією» їх метаболізму шляхом зміни умов культивування. При цьому загальмовується діяльність певних ферментів ЦТК. Причиною накопичення проміжних продуктів у «вузьких місцях» може бути надлишок субстрату, зміна pH та концентрації мікроелементів.

За допомогою грибів можна отримувати (в тому числі в промислових масштабах) молочну (*Rhizopus nigricans*, *Saprolegnia*), фумарову (*Mucor, Rhizopus*), глюконову (*Aspergillus niger*), щавлеву (багато грибів при високому pH), лимонну (*Aspergillus terreus*) кислоти. L-глутамінова кислота утворюється промисловим продуцентом *Corynebacterium glutamicum* шляхом відновного амінування інтермедіату, що накопичується в циклі Кребса – α-кетоглутарової кислоти.

8.4. Мікробна біолюмінесценція

Одна з груп аеробних мікроорганізмів, які використовують органічні сполуки, відрізняється унікальною здатністю до біолюмінесценції та називається бактеріями, що світяться або фотобактеріями. Більшість фотобактерій – це морські хемоорганотрофи, які подібні до представників родини *Enterobacteriaceae*. Вони являють собою грамнегативні, факультативно аеробні палички, пересуваються за допомогою джгутиків, схильні до психрофілії та галофілії. В анаеробних умовах вони здійснюють змішане бродіння. Здебільшого, це вільноживучі мікроорганізми, але є серед них і симбіонти морських риб та молюсків. Наприклад, *Photobacterium phosphoreum* і *P. leiognathi* живуть у органах риб, що світяться (рис. 8.9).

Рис. 8.9. Симбіоз риб та фотобактерій *Photobacterium phosphoreum*

Зазвичай, бактерії випромінюють синьо-зелене світло (472–505 нм), але один із штамів *Vibrio fisheri* світиться жовтим світлом із довжиною хвилі 545 нм.

Світіння спостерігається тільки в присутності кисню і здійснюється лише при аеробному диханні (рис. 8.10). У фотобактерій є звичайний дихальний ланцюг та ЦТК. Світло випромінює збуджений флавін під дією ферменту люциферази при окисненні альдегіду з 13–18 атомами вуглецю в молекулі.

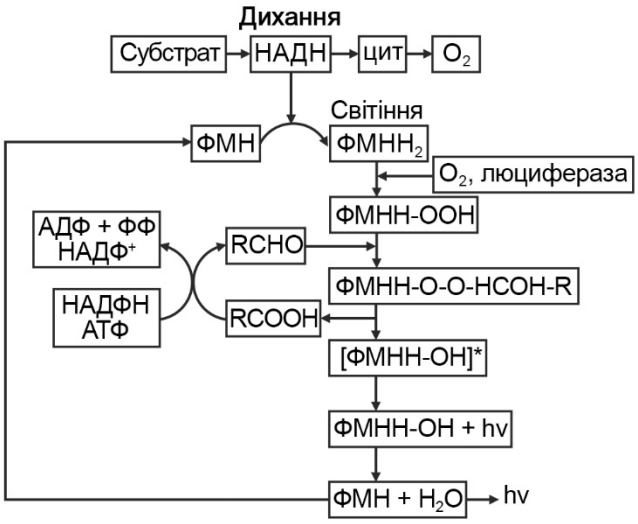


Рис. 8.10. Реакції, що призводять до біолюмінесценції:
ФМН – флавінмононуклеотид

Люцифераза – це фермент, що складається з двох субодиниць, схожий на монооксигеназу. Гени, що кодують функцію світіння, розташовані тісною групою. У біоінженерних роботах його часто застосовують як репортерний ген, що повідомляє світінням про те, що вставлені в хромосому гени успішно експресуються в клітині.

Біологічний сенс світіння поки не зрозумілий. Є гіпотеза, що це захист від переокиснення. Коли накопичується багато відновлених піридиннуклеотидів, спрацьовує «відвідний канал», електрони скидаються на флавін, який і висвічується. Інша гіпотеза пояснює світіння як захисну реакцію проти активних форм кисню (перекису, супероксидного радикалу).

Здатність до світіння мають представники родів *Photobacterium, Beneckia, Vibrio, Photorhabdus*. Крім морського середовища фотобактерії виявлено також у прісних водах та в ґрунті. Наприклад, ґрунтові бактерії роду *Xenorhabdus*, що світяться, не вимагають присутності підвищеної концентрації Na^+ та ростуть при мезофільних значеннях температури. Можливо, властивість світитися не пов’язана з певними таксономічними групами. Показано також, що світіння (особливо у симбіотичних бактерій) підпорядковане ефекту «кворуму», тобто, залежить від граничної щільності популяції.

Люцифераза дуже чутлива до різних забруднень, тому мікроорганізми, що світяться, використовують в експрес-тестах на загальну токсичність (наявність в середовищі токсичних сполук призводить до інгібування світіння).

8.5. Метилотрофія

Утилізувати одновуглецеві сполуки здатні лише деякі мікроорганізми, що обмежено особливостями їхнього метаболізму. Одновуглецевими (C_1) сполуками називають такі вуглецевмісні речовини, до складу молекули яких входить один або декілька атомів вуглецю, не пов'язаних С-С-зв'язками.

Мікроорганізми фізіологічної групи, що здатні рости на одновуглецевих сполуках, називають метилотрофами. Найбільше значення мають такі C_1-сполуки як метан, що виділяється метаногенами, метанол, утворений при розкладанні пектину та лігніну, продукт змішаного бродіння форміат і метиламіни, які утворюються при загибелі морських тварин. Триметиламін утворюється з N-оксиду триметиламіну, що синтезують морські мешканці як осморегулятор, який підтримує в цитоплазмі клітин осмотичну рівновагу. Ця сполука є універсальним акцептором електронів (+730 мВ). Після загибелі морських тварин відбувається його відновлення в триметиламін, який має запах тухлої риби.

В анаеробних умовах C_1-сполуки використовують різні групи мікроорганізмів. Метан без кисню може окиснювати до CO_2 тільки асоціація принаймні двох мікроорганізмів – метаногенного архея та сульфатредукуючої бактерії. Анаеробне окиснення метану пов'язане з відновленням сульфату, який слугує акцептором електронів.

Метанол у анаеробній зоні використовують гомоацетогени або метаногени з сульфатредукуючими бактеріями. Форміат може розщеплюватися самими ентеробактеріями, які утворюють його при змішаному бродінні.

Окиснення метану в аеробних умовах відбувається відповідно за схемою: $CH_4 \rightarrow CH_3OH \rightarrow HCOH \rightarrow HCOOH \rightarrow CO_2$.

Метилотрофів поділяють на факультативних та облігатних. Факультативні метилотрофи здатні використовувати як одно-, так і багатовуглецеві сполуки. Облігатні метилотрофи ростуть тільки на C_1-сполуках. Серед них виділяють групу, здатну окиснювати лише метан – метанотрофи. Інші одновуглецеві сполуки (зазвичай, метанол) вони окиснюють значно менш ефективно.

В енергетичному метаболізмі перша реакція окиснення метану до метанолу відбувається за участю мембранозв'язаного ферменту метанмонооксигенази (ММО). У бактерій родів *Methylocella* і *Methylocapsa*, навпаки, присутня тільки розчинна ММО. Монооксигеназа вбудовує один атом кисню в молекулу метану, а другий з витратою двох електронів та двох

протонів від донора-відновника йде на формування молекули H_2O. При роботі ферменту витрачається енергія, яку клітина отримує у подальших реакціях окиснення за допомогою дегідрогеназ метанолу, формальдегіду та форміату.

Метанол утворюється та окиснюється в периплазматичному просторі до формальдегіду за допомогою дегідрогеназ. Окиснення формальдегіду може відбуватися в дисиміляційному циклі, а також шляхом, в якому беруть участь тетрагідрофолат або переносники, властиві метаногенам.

До метилотрофії здатні деякі еукаріотичні мікроорганізми, це види родів *Candida* (найбільш вивчений – *C. methylica*), *Hansenula*, *Pichia* та ін., а також міцеліальні гриби *Gliocladium deliquescens, Paecilomyces varioti, Trichoderma lignorum, Penicillium* sp., здатні рости на середовищах з метанолом.

Метилотрофи є перспективним джерелом кормового білка. У природі метилотрофи відіграють важливу роль у глобальному циклі вуглецю. Вони є бактеріальним газовим фільтром для метану, що виділяється в атмосферу метаногенними археями.

8.6. Використання багатовуглецевих субстратів

Багато хемоорганотрофних мікроорганізмів здатні використовувати високомолекулярний біополімерний субстрат. Утилізація як аеробними, так і анаеробними мікроорганізмами починається з його перетворення на низькомолекулярні сполуки в реакціях гідролізу за допомогою екзоферментів, що виділяються в середовище, або залишаються локалізованими на поверхні клітини.

Для утилізації білків деякі бактерії та гриби синтезують позаклітинні протеази, які гідролізують білки до коротких пептидів та амінокислот. Розкладання білка мікроорганізмами (амоніфікація) завжди супроводжується утворенням ряду продуктів: аміаку при дезамінуванні амінокислот, сірководню при розщепленні сірковмісних амінокислот (метіоніну, цистеїну та їх похідних) та індолу при розпаді триптофану. При цьому відбувається підлуговування середовища.

Амінокислоти дезамінуються з утворенням органічних кислот (піруват, ацетату та інтермедіатів ЦТК) та у вигляді ацетил-КоА надходять до ЦТК для повного окиснення, а відщеплений водень передається в ЕТЛ для запасання енергії. Амінокислоти також можуть бути використані клітиною як джерело вуглецю для синтезу клітинних компонентів. Відщеплені аміногрупи амінокислот йдуть або на утворення азотовмісних речовин клітини, або виділяються у вигляді йону амонію.

У багатьох аеробних та анаеробних ґрунтових та фітопатогенних бактерій (цитофаг, міксобактерій, клостридій, ервіній) та грибів є екзоферменти для гідролізу целюлози (рис. 8.11), пектину (рис. 8.12), крохмалю,

агару, хітину, лігніну. Дисахариди, що утворилися, піддаються подальшому гідролізу, а утворені моноцукри – повному окисненню за участі гліколізу, пентозофосфатного або КДФГ-шляху та ЦТК. а відщеплений водень передається в дихальний ланцюг для запасання енергії в формі трансмембранного потенціала протонів та генерації АТФ.

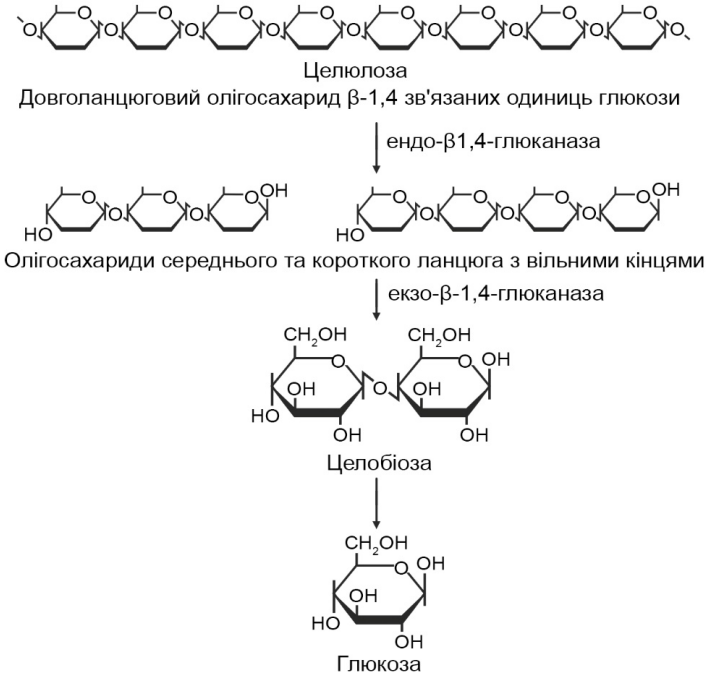


Рис. 8.11. Ферментативний гідроліз целюлози

Ліпіди розщеплюються мікробними ліпазами до гліцеролу та жирних кислот (рис. 8.13). Гліцерол потім фосфорилюється, окиснюється та катаболізується через реакції гліколізу. Жирні кислоти піддаються β-окисненню до ацетил-КоА, який метаболізується в циклі трикарбонових кислот.

Ароматичні сполуки спочатку піддаються дії моно- або диоксигеназ, що вводять в бензольне кільце один або два атоми кисню, відповідно. β-Кетоадипінова кислота, що утворилася, або її похідне потім розщеплюються до лінійного продукту, який розкладається до ацетил-КоА та сукцинату, що окиснюються в ЦТК.

Насичені та ненасичені вуглеводні (крім одновуглецевих сполук) використовуються мікроорганізмами різних груп. Спочатку вони окиснюються до відповідних жирних кислот за допомогою оксигеназ, а потім піддаються β-окисненню.

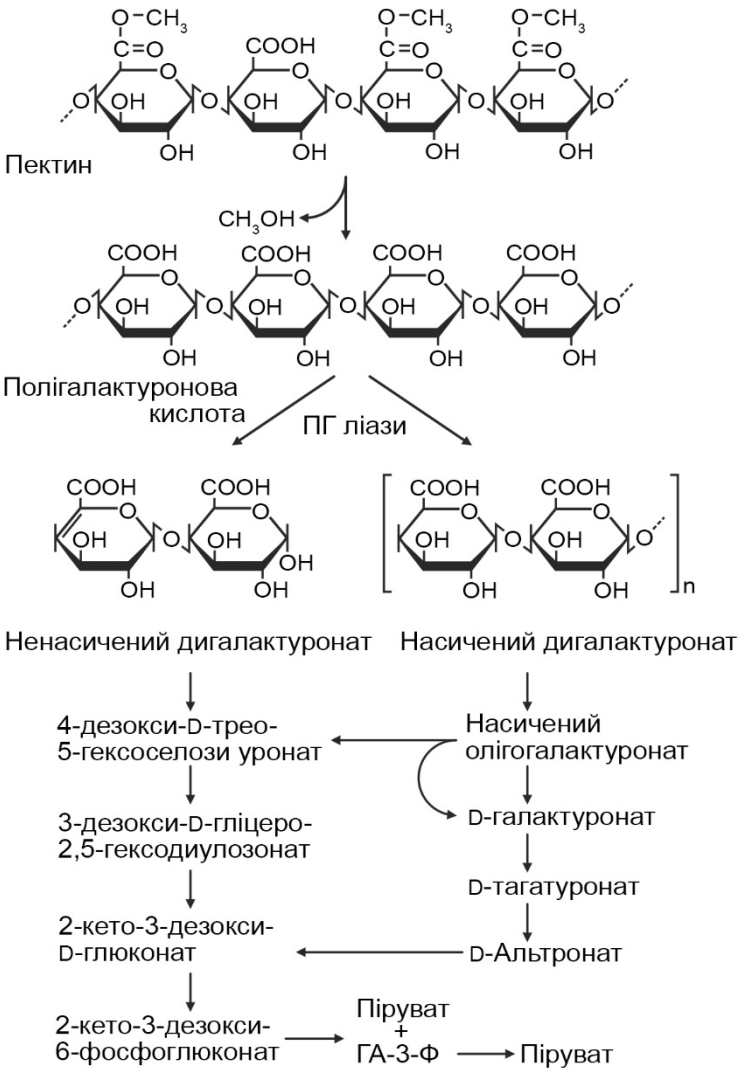


Рис. 8.12. Шляхи катаболізму пектину у бактерій

Похідні пуринів та піримідинів «входять» у ЦТК через фумарат, а пентози через α-кетоглутарат. Багатовуглецеві субстрати можуть при диханні піддаватися повному або неповному окисненню. При повному окисненні єдиним окисненим продуктом є CO_2, а кінцевим етапом окиснення, як правило, цикл трикарбонових кислот. Альтернативними шляхами кінцевого окиснення пуринів та піримідинів є цикл дикарбонових кислот у *E. coli* та окиснювальний пентозофосфатний шлях у бактерій роду *Gluconobacter*.

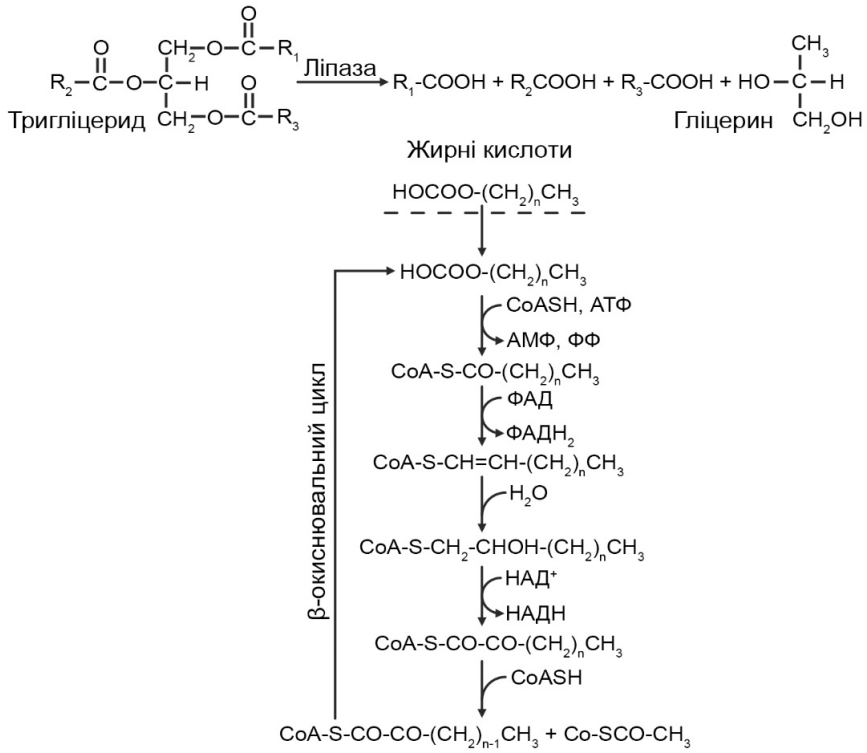


Рис. 8.13. Шляхи окиснення жирних кислот та аліфатичних вуглеводнів

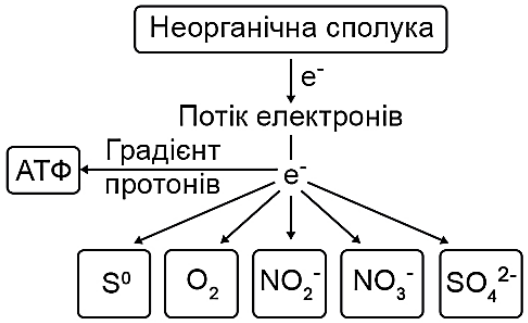
Питання для самостійного контролю

1. Дайте визначення термінам анаеробне та аеробне дихання.
2. Що слугує донором та акцептором електронів при диханні?
3. Опишіть процес утворення АТФ при окиснювальному фосфорилюванні?
4. Охарактеризуйте процес неповного окиснення при аеробному диханні та наведіть приклади цих бактерій.
5. Охарактеризуйте явище мікробної біолюмінісценції та наведіть приклади цих бактерій.
6. Дайте характеристику метилотрофним прокаріотам.
7. Опишіть відмінності нітратредукції та денітрифікації та наведіть приклади бактерій.
8. Які кінцеві акцептори електронів використовуються під час анаеробного дихання.
9. Поясніть, чому під час анаеробного дихання утворюється менше енергії, порівняно з аеробним диханням.
10. Яка роль заліза в процесі дихання?
11. Опишіть процес фумаратного дихання.
12. Як утилізуються високомолекулярні сполуки?

РОЗДІЛ 9
ХЕМОЛІТОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ

У попередніх главах ми розглядали способи отримання енергії у хемоорганотрофних мікроорганізмів, які окиснюють органічні сполуки і використовують їх як джерело електронів. Хемолітотрофні прокаріоти на відміну від хемоорганотрофних мікроорганізмів застосовують для цього неорганічні сполуки – водень, сульфіди, сірку, амоній, залізо та ін. (табл. 9.1). Забрані в неорганічних сполук електрони як і в хемоорганотрофів переносяться по ЕТЛ, формують градієнт протонів, який трансформується в АТФ-синтетазному комплексі в АТФ.

Хемолітотрофний метаболізм



Таблиця 9.1

Енергетичний урожай від окиснення неорганічних донорів електронів

Донор електронів	Хемолітотрофні реакції	Окиснювачі	$\Delta G^{0'}$ (кДж/2e^-)
Фосфіт	$4HPO_3^{2-} + SO_4^{2-} + H^+ \rightarrow 4HPO_4^{2-} + HS^-$	Фосфіту	-91
Водень	$H_2 + {}^1/_2O_2 \rightarrow H_2O$	Водню	-237
Сульфід	$HS^- + H^+ + {}^1/_2O_2 \rightarrow S^0 + H_2O$	Сульфіду	-209
Сірка	$S0 + 1{}^1/_2O_2 + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	Сірки	-196
Амоній	$NH_3 + 1{}^1/_2O_2 \rightarrow NO_2^- + H^+ + H_2O$	Амонію	-96
Нітрит	$NO_2^- + {}^1/_2O_2 \rightarrow NO_3^-$	Нітриту	-74
Залізо	$Fe^{2+} + H^+ + {}^1/_4O_2 \rightarrow Fe^{3+} + {}^1/_2H_2O$	Заліза	-66

Явище хемолітоавтотрофії було відкрито 1887 р. Сергієм Виноградським. Досліджуючи метаболізм безбарвної нитчастої сіркобактерії з роду *Beggiatoa*, що росте на поверхні донних осадів у застійних водоймах, він встановив, що ці бактерії росли, окиснюючи H_2S і відкладаючи елементну сірку в цитоплазмі. При вичерпанні сірководню мікроорганізми окиснювали відкладену в клітинах сірку до сульфату.

Пізніше було показано, що штам, з яким працював С. Виноградський, вимагає невеликої кількості органічних сполук для росту, тобто, є факультативним автотрофом. Значно пізніше з морських місць проживання в зоні «чорних» курців» було виділено облігатно автотрофні види *Beggiatoa*. У цих екзотичних екосистемах вони забезпечують первинну продукцію органічної речовини за рахунок хемолітоавтотрофії. Також сіркобактерії беруть участь в утворенні мікробних матів завтовшки до 60 см і діаметром до 32 м, де товсті та довгі клітини *Beggiatoa* є структуроутворюючим елементом.

9.1. Нітрифікуючі мікроорганізми

Однією з важливих груп хемолітоавтотрофів є нітрифікуючі мікроорганізми. Процес перетворення аміаку на нітрат використовувався для отримання селітри при виготовленні пороху задовго до того, як стала відома його мікробна природа. Земляні вали поливали кров'ю тварин зі скотобоєн, перемішували для збагачення киснем і вносили золу для нейтралізації pH, а також як джерело калію. Білки крові розкладали ґрунтові мікроорганізми з виділенням аміаку, який нітрифікуючі бактерії окиснювали до нітрату. При реакції нітрату з іонами калію утворювався вицвіт селітри, яку використовували для виготовлення пороху.

С. Виноградський для виділення чистих культур нітрифікаторів запропонував метод «негативних пластинок»: сильно розведені суспензії висівали на агар або силікагель, і ті шматочки агару, де не було росту гетеротрофів, переносили на середовище з NH_4^+.

Аеробна нітрифікація. Процес нітрифікації відбувається у дві стадії. У першій фазі NH_4^+ окиснюється до NO_2^-, у другій фазі NO_2^- окиснюється до NO_3^-, причому в природі нітрит не накопичується, оскільки швидкість другої фази значно вища першої фази. Обидві реакції здійснюють різні представники. Бактерії першої фази це – *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrosospira, Nitrosovibrio*, другої фази – *Nitrobacter, Nitrococcus, Nitrospira, Nitrospina*.

Нітрифікатори – це грамнегативні бактерії, які об'єднані за здатністю окиснювати аміак, а не філогенетично. Вони зустрічаються в класах *Beta-* , *Gamma-* та *Epsilonproteobacteria* філуму *Proteobacteria*, а також у класі *Nitrospira* філуму *Nitrospirae*. Назви родів нітрифікаторів I фази зазвичай починаються з *Nitroso-*, а нітрифікаторів II фази – з *Nitro-*. Мікроорганізми

I фази ($NH_3 \rightarrow NO_2^-$) і II фази ($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$) нітрифікації в природі завжди живуть разом, і токсичний нітрит, утворений бактеріями I фази, швидко споживається нітрифікаторами II фази.

Клітини нітрифікуючих бактерій мають різну форму (паличкоподібні, вигнуті, спіральні, кокоподібні) можуть бути рухливими в молодому віці, а при старінні формують біоплівки. Нітрифікатори мають різною мірою розвинені внутрішньоклітинні розростання клітинної мембрани. У *Nitrosomonas* вони паралельні мембрані клітини, у *Nitrosococcus* утворюють стоси ламел, у *Nitrosolobus* формують інвагінації.

Для фіксації CO_2 нітрифікатори використовують цикл Кальвіна, в якому витрачається велика кількість АТФ та відновлювальних еквівалентів. При автотрофному рості в клітинах утворюються карбоксисоми з ферментом рибулозодисфосфаткарбоксилазою.

Усі нітрифікатори другої фази здатні також до міксотрофного росту. Деякі представники роду *Nitrobacter* можуть рости гетеротрофно, використовуючи органічні речовини (ацетат, піруват та ін.), але переваг у рості при цьому не отримують. При окисненні аміаку та нітриту електрони надходять до ЕТЛ на рівні цитохромів і тому енергії запасається мало (рис. 9.1). На першій стадії аміак проникає у клітини та окиснюється монооксигеназою до гідроксиламіну: $NH_3 + 1/2O_2 \rightarrow NH_2OH$.

При окисненні гідроксиламіну периплазматичною гідроксиламіноксидоредуктазою утворюється нітрит ($NH_2OH + H_2O \rightarrow HNO_2 + 4H^+ + 4e$). При цьому електрони переносяться на рівень цитохромів *b* і *c*. У той же час клітини на середовищі з чистим гідроксиламіном виростити не вдається (без аміаку гідроксиламін клітинами не окиснюється).

У архей, об'єднаних у філум *Thaumarchaeota*, які переважно мешкають в океанах в аеробних та мікроаерофільних зонах, також виявлена здатність до нітрифікації.

Недавно виявлені бактерії роду *Nitrospira*, які здійснюють самостійно повну нітрифікацію амонію в нітрат, тобто, один мікроорганізм проводить обидві фази процесу, названого комаммокс (comammox – complete ammonia oxidation). Виявилося, що повна нітрифікація – це енергетично вигідний процес, і комаммокс-бактерії поширені в природі. Відкриття комаммокс-процесу призвело до ревізії схеми глобального циклу азоту та додавання ще однієї «гілки» до його окисної частини.

Анаеробна нітрифікація. Раніше вважали, що нітрифікація – це суто аеробний процес. Однак в анаеробних реакторах, що здійснюють очищення стоків, було встановлено, що амоній окиснюється в присутності нітриту відповідно до реакції $NH_4^+ + NO_2^- \rightarrow N_2 + H_2O$, наявність якої було доведено за допомогою ізотопних сполук. Донором електронів у них слугує аміак, акцептором – нітрит, а кінцевим продуктом – молекулярний азот (рис. 9.2.б). Процес отримав назву анаммокс (anammox – anaerobic ammonia oxidation).

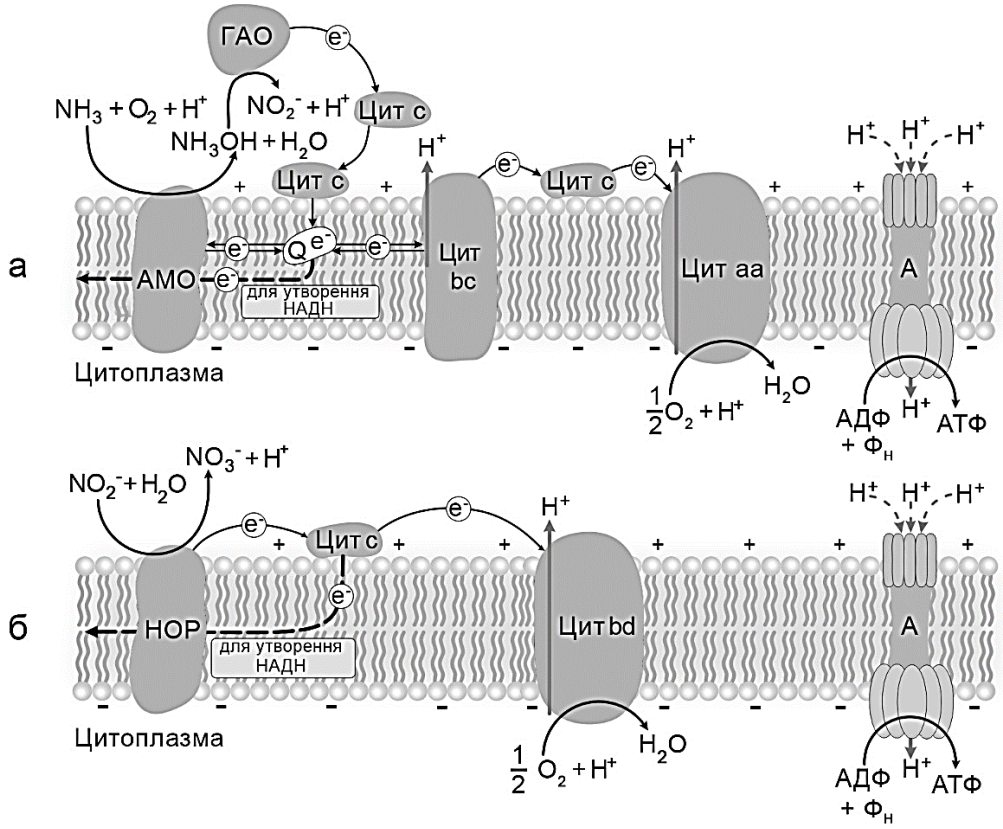


Рис 9.1. Система транспортування електронів у нітрифікуючих бактерій: (а) *Nitrosopumilus* окиснюють NH_3 до NO_2^-. Цит – цитохром, АМО – аміак монооксигеназа; ГАО – гідроксиламін оксидоредуктаза, Q – убіхінон; (б) *Nitrobacter* окиснюють NO_2^- до NO_3^-; Цит *c* – цитохром *c*; НОР – нітритоксидоредуктаза; А – АТФ-синтетаза.

Анаеробне окиснення амонію здійснюють особливі бактерії-планктоміцети, що входять до філуму *Planctomycetes*.

Клітини анаммокс-бактерій мають коккоподібну форму діаметром близько одного мкм. У клітинній стінці не виявлено пептидоглікану, але є білковий S-шар. Клітини анаммокс-планктоміцетів розділені на три компартменти, що незвичайно для прокаріотів (рис. 9.2.а). Під цитоплазматичною мембраною лежить зона товщиною 31–39 нм, що не містить РНК (парифоплазма) з поки неясними функціями. Під нею знаходиться перша внутрішня мембрана, за якою лежить рибоплазма – типова бактеріальна цитоплазма, що містить рибосоми, нуклеоїд і часто гранули глікогену. Нижче розташована анаммоксисома, відмежована міцною непроникною двошаровою мембраною, що займає 50–70% об'єму клітини.

У цій структурі здійснюються катаболічні реакції клітини, тому вона може вважатися функціональним аналогом мітохондрій еукаріотів. Мемб-

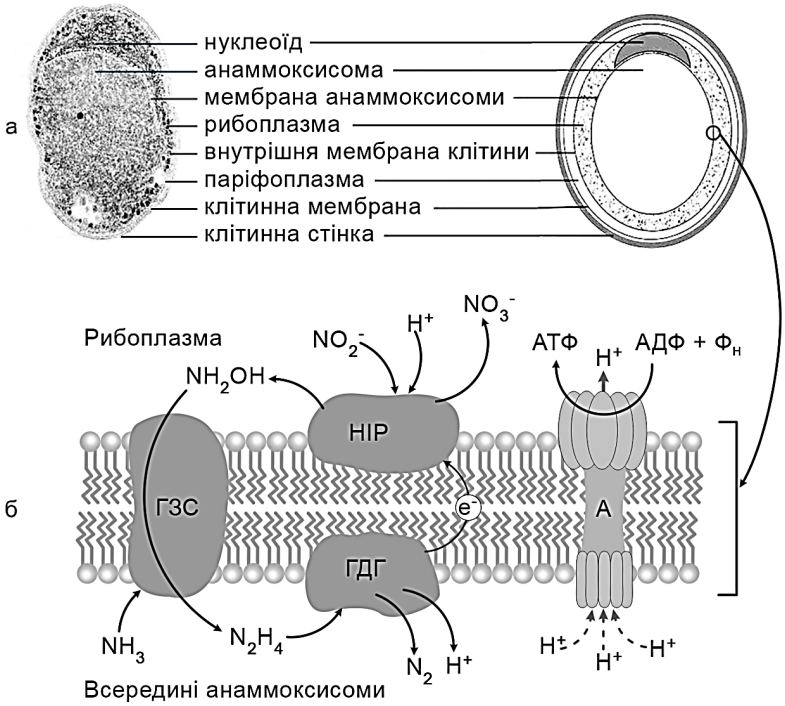


Рис. 9.2. Будова анаммокс бактерії *Brocadia anamoxidans* (а); схема транспортування електронів у анаммокс-бактерій та реакцій в анаммоксисомі (б). НІР – нітритредуктаза; ГЗС – гідразинсинтаза; ГДГ – гідразиндегідрогеназа; А – АТФ-синтетаза.

рана анаммоксисоми для збільшення площі поверхні утворює складки, з нею асоційована АТФ-синтетаза та цитохром *c*. Непроникна мембрана не дозволяє токсичним інтермедіатам анаммокс-процесу проникати в рибоплазму, а також формує градієнт протонів.

Мембрани анаммокс-бактерій містять унікальні ладдеранові ліпіди (від англ. ladder – сходи), які складаються з циклобутанових кілець, розташованих в одній площині, що надає мембранам міцність і слабку проникність.

Анаммокс-бактерії є мікроорганізмами, що повільно ростуть (середній час подвоєння становить 11 діб). Вони зазвичай існують у вигляді сарциноподібних мікроколоній, що утворюють агрегати.

Жоден представник анаммокс-бактерій поки що не отриманий у чистій культурі. У природному середовищі анаммокс-бактерії конкурують з денітрифікаторами. За наявності великої кількості органічних речовин денітрифікатори абсолютно домінують через високу швидкість росту. Однак у міру вичерпання органічного донора починають переважати анаммокс-бактерії, які є хемолітотрофами.

Нещодавно показано функціональний зв'язок анаммокс- та комаммокс-бактерій та присутність їх в тих самих агрегатах за умов низького вмісту кисню. Процес окиснення аміаку в анаеробних умовах завжди супроводжується фіксацією CO_2.

9.2. Бактерії, що окиснюють відновлені сполуки сірки

Відома значна кількість бактерій, здатних окиснювати відновлені сполуки сірки. Ці мікроорганізми беруть участь у глобальному циклі сірки. Сірководень утворюється в природі повсюдно в процесах розкладання білків та сульфат редукції, а по досягненні аеробної зони окиснюється тіоновими бактеріями. Таким чином, тіонові бактері є газовим фільтром для H_2S, що не дозволяє йому потрапляти в значних кількостях в атмосферу.

Традиційно організми, що окиснюють відновлені сполуки сірки, ділять на дві групи: представники I групи окиснюють сірководень і відкладають елементарну сірку у вигляді крапель усередині клітин, а бактерії II групи сірку всередині клітин не відкладають.

До I групи відносяться морфологічно своєрідні мікроорганізми. Це представники родів *Beggiatoa, Thiothrix, Macromonas, Bilophococcus, Thioploca, Thiospirillopsis, Achromatium, Thiobacterium, Thiospira, Thiovulvum*. Тільки для деяких представників встановлено тип метаболізму, оскільки лише у перших чотирьох родах зі списку отримано чисті культури.

Виділення чистих культур бактерій I групи ускладнено через присутність у їх слизових чохлах чисельних мікробів-супутників. До цієї групи входять грамнегативні безбарвні клітини різної морфології (великі коки, дрібні спіріли, нитчасті, довгі палички), що ростуть на середовищах з H_2S і відкладають елементну сірку в клітині. Деякі рухаються за допомогою ковзання або джгутиків, а *Achromatium* і *Thiobacterium* – нерухомі. Більшість бактерій утворює потужні капсули або чохли. Вони зазвичай ростуть на межі аеробної та анаеробної зон (в зоні хемоклину стратифікованих озер) в мікроаерофільних умовах, утворюючи наліт на донних осадах. Оптимальна концентрація кисню для їх росту становить 0,6–6%.

Багато відновлених сполук сірки можуть бути донорами електронів для безбарвних сіркових бактерій. Хемолітотрофія, і зокрема хемолітотрофія сірки, є основним метаболічним способом життя багатьох бактерій і архей.

Енергетика окиснення сірки. Найпоширенішими сполуками сірки, що використовуються як донори електронів, є сірководень (H_2S), елементна сірка (S^0), тіосульфат ($S_2O_3^{2-}$) і сульфіт (SO_3^{2-}) (рис. 9.3). У більшості випадків кінцевим продуктом окиснення відновлених сполук сірки є сульфат (SO_4^{2-}).

Окиснення сульфіду відбувається поетапно, при цьому перша стадія окиснення дає на виході елементну сірку S^0. Деякі бактерії, що окиснюють

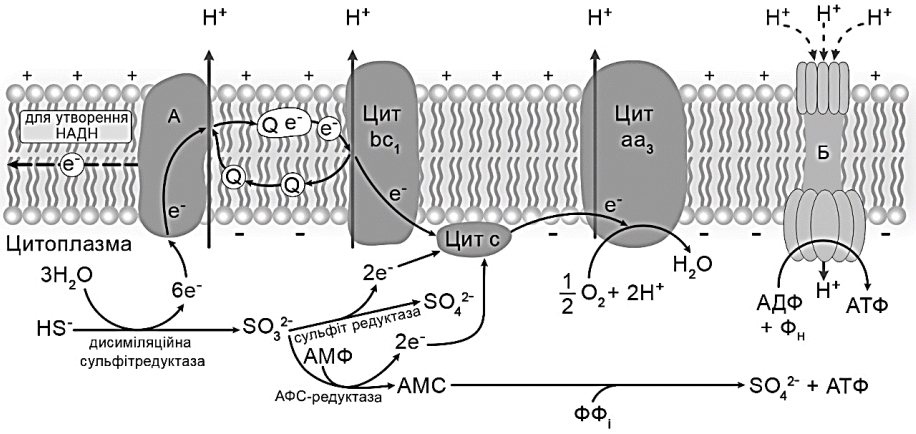


Рис. 9.3. Схема електронтранспортного ланцюга у тіонових бактерій: А – флавопротеїн; Б – АТФ-синтетаза; Цит – цитохроми b, c_1, a_3, a; Q – убіхінон; АМФ – аденозинмонофосфат; АМС – аденозинмоносульфат; ФФ – пірофосфат; Заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-.

сульфід, такі як *Beggiatoa*, відкладають елементну сірку всередині клітини, де сірка існує як запасна поживна речовина.

Багато сірчаних бактерій є суворі ацидофіли. Наприклад, *Acidithiobacillus thiooxidans* найкраще росте при pH між 2 і 3.

Існують різноманітні шляхи генерації енергії від окиснення сполук сірки. Однією з найкраще вивчених є система Sox для окиснення сірки, яка поширена серед сіркоокиснюючих бактерій. Система Sox містить понад 15 генів, що кодують різні цитохроми та інші білки, необхідні для окиснення відновлених сполук сірки безпосередньо до сульфату.

Елементи системи Sox зустрічаються в різноманітних сіркових хемолітотрофів, а також у деяких фототрофних сіркових бактерій, які окиснюють сульфід, щоб отримати відновник для фіксації CO_2. Ця біохімічна система розповсюджена серед бактерій, які з різною метою окиснюють сульфіди. Це є наочним свідченням того, що гени, які кодують Sox, поширилися між видами шляхом горизонтального перенесення генів.

Електрони з системи Sox спрямовуються в електронтранспортний ланцюг, а протони, що утворюються в периплазмі, виділяються в зовнішнє середовище та підкислюють його. Електрони, ймовірно, потрапляють на рівні флавопротеїну або цитохрому *c* і транспортуються ЕТЛ до O_2, створюючи градієнт протонів, що через АТФ-синтетазу генерує АТФ.

Для фіксації CO_2 в циклі Кальвіна або іншим автотрофним шляхом електрони переносяться з затратою АТФ в зворотному напрямку по ЕТЛ, утворюючи відновлювану силу (НАДН).

Хоча сіркові хемолітотрофи в основному аеробні, деякі види можуть рости шляхом анаеробного дихання з використанням нітрату як акцептора

електронів. Сіркобактерія *Thiobacillus denitrificans* є класичним прикладом відновлення нітрату до молекулярного азоту (процес денітрифікації).

Тіоновим бактеріям I групи окиснювачів відновлених сполук сірки характерний негативний фото- та аеротаксис, деякі мають магнітосоми. Тіонові бактерії – гетеротрофи чи міксотрофи, схильні до оліготрофії.

Представники II групи – це бактерії, що належать до найбільш вивчених родів *Thiobacillus, Acidithiobacillus, Sulfobacillus*, а також архей родів *Sulfolobus* та *Acidianus,* які не відкладають елементарну сірку в клітинах та проводять процес окиснення сірководню до сульфату (рис. 9.3).

Thiobacillus thioparus і *T. thiooxidans* (*Acidithiobacillus*) використовують у своєму метаболізмі сірководень. Мікроорганізми цих родів розрізняються по відношенню до pH: тіобацили ростуть при слабокислих значеннях pH, а ацидітіобацили та сульфобацили – при pH до 1,5. Більшість представників цієї групи – мезофіли. Вони поширені та мешкають у ґрунтах, солоних болотах, у зоні термоклину стратифікованих озер, у сольфатарах там, де на виході гарячих сірчаних джерел на поверхні утворюються жовті осади елементарної сірки, у стічних водах, у кислих шахтних водах (pH 2,5–1,5).

Наявність у лужних грунтах тіобацил іноді використовують для корекції pH. Для цього в грунт вносять порошок сірки, а SO_4^{2-}, що утворюється при її окисненні, підкислює грунт.

При температурі вище 50 °C сірку окиснюють археї (*Sulfolobus)* або представники роду *Sulfobacillus*. Реакції окиснення відновлених сполук сірки характеризуються різними значеннями вільної енергії.

9.3. Металокиснючі мікроорганізми

Металокиснючі мікроорганізми – це ще одна група хемолітотрофів, серед них найбільш вивчені залізоокисні організми, які окиснюють Fe^{2+} до Fe^{3+}. Такі мікроорганізми виявляють у природних водоймах у вигляді обростань нижньої частини водяних рослин. При pH <5,0 Fe^{2}+ стабільний, тому в таких природних місцеперебуваннях переважно розвиваються ацидофільні залізоокисні (наприклад, бактерії роду *Leptothrix* та *Acidithiobacillus*). Вони укладені в слизові чохли, інкрустовані $Fe(OH)_3$.

Деякі представники залізоокиснювачів (н.п., *Galionella ferruginea*) ростуть у нейтральних середовищах. Оскільки при pH 7,0 в аеробних умовах Fe^{2+} нестабільний, то галіонели мешкають на виході підземних джерел, де концентрація кисню дуже низька. *G. ferruginea* має клітини, що прикріплюються до поверхні слизовою ніжкою, інкрустованою $Fe(OH)_3$.

Fe^{2+}-оксидоредуктаза, передає електрони на цитохром aa_3, тому ЕТЛ виходить коротким (рис. 9.4). Окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} дає мало енергії. Для фіксації 48 г CO_2 потрібно окиснити 2,8 кг Fe^{2+}. Припускають, що в природних умовах може відбуватися процес одночасного окиснення заліза та сульфіду у складі нерозчинних мінералів:

$$4FeS_2 + 2H_2O + 15O_2 \rightarrow 4Fe^{3+} + 8SO_4^{2-} + 4H^+$$

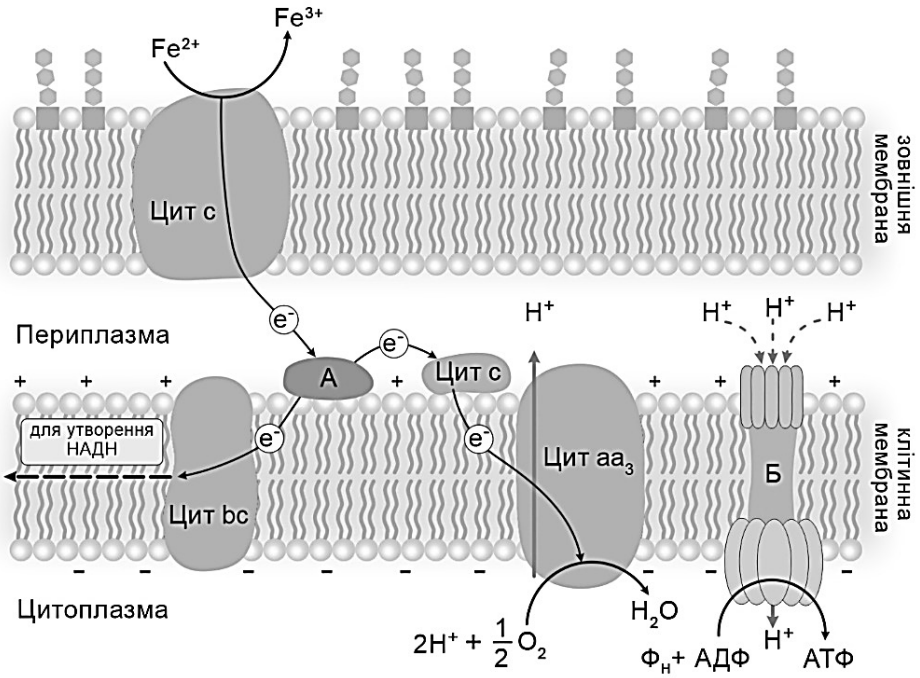


Рис. 9.4. Схема електронтранспортного ланцюга у залізоокиснюючих бактерій. А – рустиціанін, Б – АТФ-синтетаза; Заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-

Виділено мікроорганізми, здатні окиснювати інші метали, наприклад, Mn^{2+} до Mn^{4+}. Окиснення марганцю термодинамічно вигідно в інтервалі pH від 6 до 8, тому такі мікроорганізми ростуть у цьому діапазоні кислотності середовища. Мікроорганізми, здатні окиснювати залізо та марганець, добре ростуть у широкому діапазоні значень pH.

Серед бактерій до автотрофії за рахунок окиснення заліза здатні представники родів *Galionella, Leptospirillum, Acidithiobacillus*. Останні можуть також окиснювати елементну сірку, селен та уран. До автотрофного окиснення сурми здатний *Stibiobacter senarmontii*. Автотрофна архея *Sulfolobus acidocaldarius*, виділена з гарячого джерела, може використовувати для генерації енергії залізо та марганець. Для *Sulfolobus acidocaldarius* доведено фіксацію CO_2 в циклі Кальвіна при окисненні марганцю.

Гетеротрофні металоокиснювачі поширені в грунті, прісних і морських водоймах. Це представники родів *Bacillus, Arthrobacter, Hyphomicrobium, Pedomicrobium, Pseudomonas, Vibrio* та ін.

Бурхливий ріст залізоокисних мікроорганізмів роду *Leptothrix* у водопровідних трубах призводить до їх забивання слизом і губчастою іржею.

Для середовища з низькою кислотністю середовища (pH < 5,0) характерна присутність *Acidithiobacillus thiooxidans* та *A. ferrooxidans*.

Нещодавно встановлено факт росту *A. ferrooxidans* за рахунок анаеробного дихання з Fe^{3+} і S° як кінцевими акцепторами електронів. Встановлено, що низка мікроорганізмів при окисненні металів не отримує енергії, а просто відкладає їх оксиди у своїх слизових чохлах. Наприклад, так накопичує оксид марганцю *Crenothrix manganifera*. Для деяких накопичувальних культур показано окиснення ряду металів зі змінною валентністю (Cu_2^+, U_4^+, As_3^+, Sb_3^+, Mo_4^+, Se°, Zn_2^+, Co_2^+, Pb_2^+, Ni_2^+, Au).

Мікроорганізми, здатні окиснювати відновлені сполуки сірки та метали зі змінною валентністю, застосовують у біогідрометалургії для вилуговування металів з бідних руд. Зазвичай використовують природні мікробні угруповання, що містять представників бактеріальних родів *Acidithiobacillus, Leptospirillum, Sulfobacillus* та архей родів *Sulfolobus, Ferroplasma, Metallosphaera, Acidianus*. Мікробіологічні процеси використовують при отриманні міді, урану, марганцю, а також для звільнення олова, срібла та золота з нерозчинних сульфідних мінералів.

При тісному контакті клітин сульфатредукторів з поверхнею заліза виникає катодна поляризація, при якій Fe^o передає електрони сульфату всередину клітини за посередництва периплазматичного гідрогеназного ферментного комплексу. Утворений іон Fe^{2+} або використовується клітинами для анаболізму, або зв'язується екстрацелюлярно з сульфідом, отриманим в результаті сульфатного дихання.

У звязку з цим на нафтових родовищах великою проблемою є біокорозія труб нафтопроводів, чималою мірою пов'язана з розвитком усередині труб біоплівок, що містять сульфатредуктори.

Питання для самостійного контролю

1. У чому схожість і відмінність механізмів хемоорганотрофного та хемолітотрофного способів генерації АТФ?
2. Охарактеризуйте мікроорганізми та біохімічні процеси I та II фази нітрифікації.
3. У чому особливість хемолітотрофного механізму утворення протонрушійної сили та генерації АТФ у анаммокс-бактерій?
4. Охарактеризуйте біохімічні процеси генерації АТФ у тіонових бактерій.
5. Назвіть донори електронів, що використовують хемолітотрофні мікроорганізми.
6. Роль металокиснюючих бактерій у природі та значення для біотехнології.

РОЗДІЛ 10
ФОТОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ

Використання енергії світла для біосинтезу є глобальним біологічним процесом на нашій планеті. Фотосинтезуючі організми використовують світлову енергію для генерації АТФ, відновлення CO_2 та синтезу органічних сполук.

Фотосинтез, що забезпечує автотрофний ріст, складається з двох різних наборів реакцій, які протікають паралельно: світлові реакції та незалежні від світла реакції. Термін «світлові реакції» використовується для описання циклу подій переносу електронів, що перетворюють енергію квантів світла в градієнт протонів (протонрушійну силу) і АТФ, а інший набір реакцій спрямований на фіксацію CO_2 та утворення органічних сполук, які безпосередньо не залежать від процесів переносу електронів.

Реакції фіксації CO_2 потребують як АТФ, так і відновлених НАД(Ф) або фередоксину (Фд). Для утворення цих відновників відбираються електрони із світлових реакцій, поповнення яких потребує джерела електронів з середовища. Фототрофні мікроорганізми можуть використовувати багато різних донорів електронів. Наприклад, у зелених і пурпурових сіркових бактерій донором можуть слугувати відновлені сполуки сірки, такі як сірководень (H_2S), молекулярна сірка (S_2) або молекулярний водень (H_2). Ці мікроорганізми здійснюють аноксигенний фотосинтез, оскільки не продукують O_2.

В процесі еволюції у предків сучасних ціанобактерій сформувався оксигенний механізм фотосинтезу, де джерелом електронів слугують молекули води (H_2O), з яких вивільняється та виділяється кисень (O_2), як побічний продукт. Цей механізм успадкували сучасні ціанобактерії, водорості та зелені рослини. Отже, термін кисневий фотосинтез описує організми, які споживають світло як джерело енергії, а молекулу H_2O – як джерело електронів, виділяють O_2 і фіксують CO_2, утворюючи необхідні клітині органічні сполуки.

Фототрофний метаболізм

10.1. Фототрофні організми

Фототрофний спосіб отримання енергії вперше виник у представників домену *Bacteria*. Зараз відомо не менше семи різних типів фототрофних систем, які зустрічаються у різних мікроорганізмів. До них відносяться *Acidobacteria* (рід *Chloracidobacterium*), *Chlorobi* (зелені сіркові бактерії), *Chloroflexi* (зелені несіркові бактерії), *Cyanobacteria, Firmicutes* (геліобактерії), *Gemmatimonadetes* (рід *Gemmatimonas*) і *Proteobacteria* (пурпурові бактерії) (рис. 10.1). У галоархей домену *Archaea* виявлено особливий механізм фотосинтезу, який базується на використанні бактеріородопсину (див. далі у цьому розділі). Більше половини фотосинтетичних реакцій на Землі здійснюють мікроорганізми.

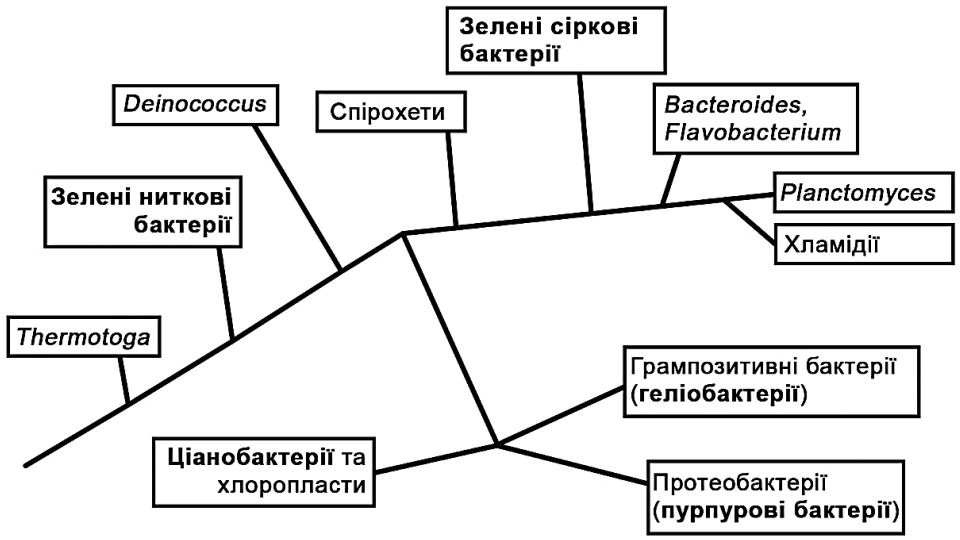


Рис. 10.1. Групи фототрофних бактерій (виділені жирним шрифтом) на філогенетичному дереві

У результаті ендосимбіотичного походження хлоропластів з родичів ціанобактерій фототрофія розвинулась також у представників домену *Eukarya*. На сьогодні оксигенний фотосинтез, що базується на однакових основних принципах, забезпечує енергією сучасні найпростіші, водорості та рослини.

10.2. Організація та функціонування фотосинтетичного апарату

У фотосинтетичних світлових реакціях за рахунок енергії квантів світла електрони подорожують ланцюгом транспортування електронів, компоненти якого розташовані у фотосинтетичній мембрані в порядку їх дедалі більшого електропозитивного потенціалу відновлення.

Трансформацію енергії квантів світла з різною довжиною електромагнітних хвиль (рис. 10.2) здійснює фотосинтетичний апарат, який складається з світлозбиральних структур (антен), реакційного центру (РЦ) та системи переносу електронів (ЕТС).

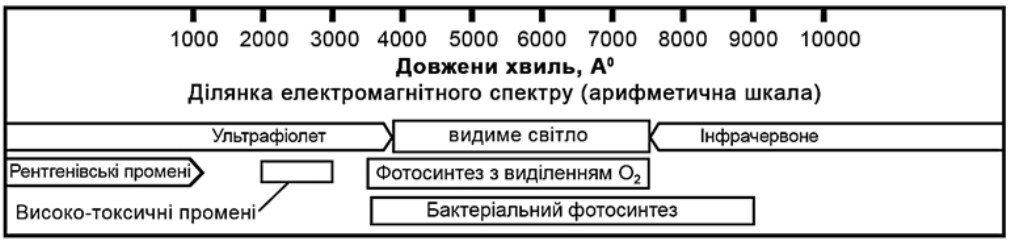


Рис. 10.2. Електромагнітний спектр сонячних променів, що досягають Землі

У фототрофних бактерій процес фотосинтезу розпочинається з того, що антени уловлюють кванти світла, передають збудження в РЦ. Це призводить до створення потоку електронів по замкненій в коло ЕТС (фотосистема I). Ця фотосистема функціонує як протонна помпа, що переносить протони з клітини назовні, і формує на мембрані градієнт протонів (протонрушійну силу, рис. 6.15). У подальших реакціях бере участь спеціальний ферментний комплекс – АТФ-синтетаза (рис. 6.16), яка також є практично у всіх хемотрофних організмів.

За рахунок утвореної на мембрані протонрушійної сили протони переносяться через АТФ-синтетазу, яка вбудована в мембрану, і каталізує перетворення АДФ в АТФ (так зване фотофосфорилювання), при цьому мембрана розряджається.

Для утворення іншого важливого продукту – відновлених піридиннуклеотидів (НАДН чи НАДФН) електрони відбираються з фотосистеми I (замкненої ЕТС) і переносяться на окиснені піридиннуклеотиди (НАД чи НАДФ), які відновлюються і використовуються далі для фіксації CO_2 (глава 11).

У результаті відбирання електронів для утворення відновників виникає дефіцит електронів в фотосистемі I, який фототорофні бактерії компенсують, приймаючи електрони від донора з зовнішнього середовища – відновлених сполук сірки, H_2, низькомолекулярних органічних сполук (вони при цьому окиснюються). Таким чином, фотосинтез у геліобактерій, зелених та пурпурових бактерій не супроводжується виділенням кисню, тому називається безкисневим.

У ціанобактерій, водоростей і рослин фотосистема I функціонує за таким самим принципом, як у фототрофних бактерій, але для поповнення відібраних електронів, що використані на відновлення НАДФ, вони використовують фотосистему II, яка виступає донором електронів для фотосистеми I.

При цьому в фотосистемі II за рахунок енергії квантів світла здійснюється фотоліз молекули води, виділяється молекулярний кисень, а забрані від молекули води електрони передаються для поповнення дефіциту електронів у фотосистему I. У результаті при фотолізі молекули води виділяється кисень, тому такий тип фотосинтезу називають кисневим.

У подальшому більш детально розглянемо структурні компоненти, будову фотосинтетичного апарату та процеси безкисневого та кисневого фотосинтезу.

10.3. Хлорофіл і бактеріохлорофіл

У різних груп фототрофних мікроорганізмів фотосинтетичний апарат характеризується різним ступенем складності. Реакційний центр та антена складають фотосинтетичну одиницю. Основними фотосинтетичними пігментами фотосинтетичної одиниці є складні молекули, що мають різні заступники при тетрапірольному ядрі (рис. 10.3) і, відповідно, здатність

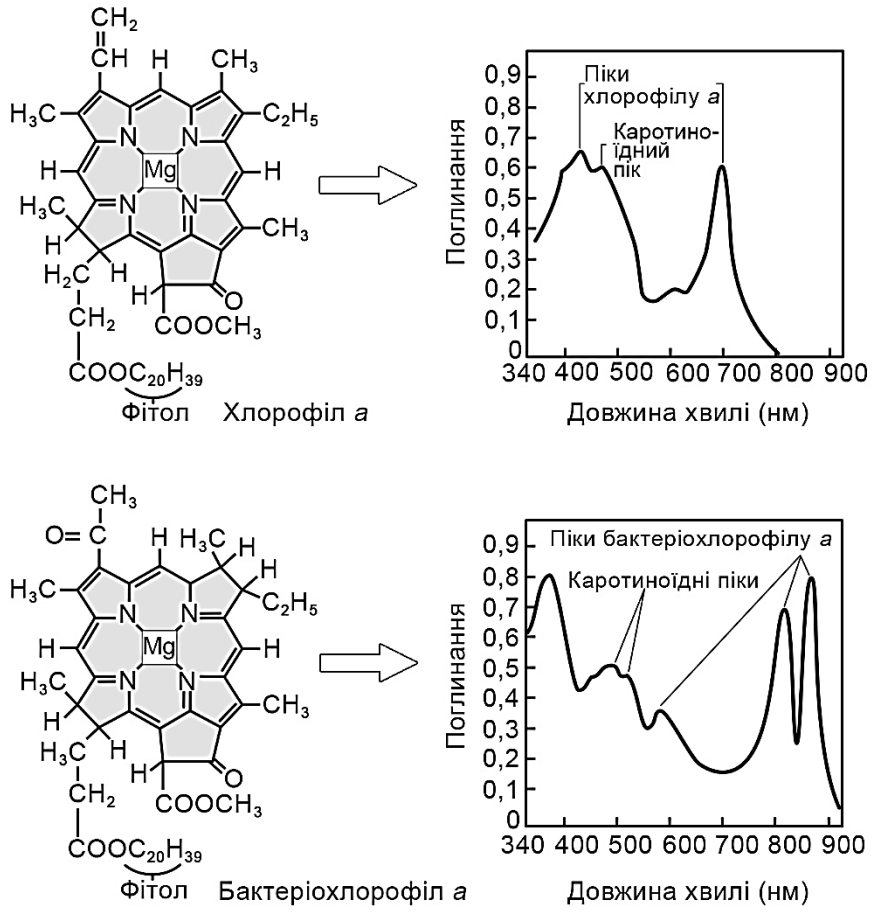


Рис. 10.3. Молекули хлорофілу *a* та бактеріохлорофілу *a*

поглинати світло різної довжини хвилі. В еукаріотів і ціанобактерій – це хлорофіли (Хл), у пурпурових, зелених та геліобактерій – бактеріохлорофіли (БХл).

Хлорофіл і бактеріохлорофіл – це тетрапіроли, структурно пов'язані з цитохромами. Але на відміну від цитохромів, хлорофіли містять магній замість заліза в центрі кільця. Хлорофіли також містять специфічні замісники в тетрапірольному кільці та гідрофобний спирт фітол, який допомагає закріплювати хлорофіл у фотосинтетичній мембрані.

Структура хлорофілу *a*, основного хлорофілу кисневих фототрофів, показана на рис. 10.3. Хлорофіл *a* зелений, тому що він поглинає червоне і синє світло та пропускає зелене. Його спектри поглинання мають максимуми поблизу 680 нм і 430 нм (рис. 10.3). Відомо кілька структурно відмінних хлорофілів, кожен з них відрізняється своїм унікальним спектром поглинання. Ціанобактерії містять хлорофіл *a* (декілька видів містять хлорофіл *d* замість *a*), тоді як їхні родичі прохлорофіти містять хлорофіли *a* і *b*.

Аноксигенні фототрофи виробляють один або кілька бактеріохлорофілів. Бактеріохлорофіл *a* (рис. 10.3), наявний у більшості пурпурових бактерій, має максимуми поглинання між 800 і 925 нм. Цей діапазон довжин хвиль є результатом того, що різні види пурпурових бактерій утворюють фотокомплекси з дещо різною структурою білків, і це впливає на максимуми поглинання бактеріохлорофілу *a*. Бактеріохлорофіли фототрофних бактерій різних філогенетичних груп поглинають інші області видимого та ближнього інфрачервоного спектра.

10.4. Допоміжні пігменти

Допоміжні пігменти представлені каротиноїдами та фікобіліпротеїнами (рис. 10.4), що поглинають світло в тих областях спектра (470–640 нм), які відрізняються від областей поглинання основних пігментів. Найбільш відомі такі каротиноїди як β-каротин у деяких ціанобактерій та більшості водоростей і фукоксантин у динофлагелят, діатомових та бурих водоростей.

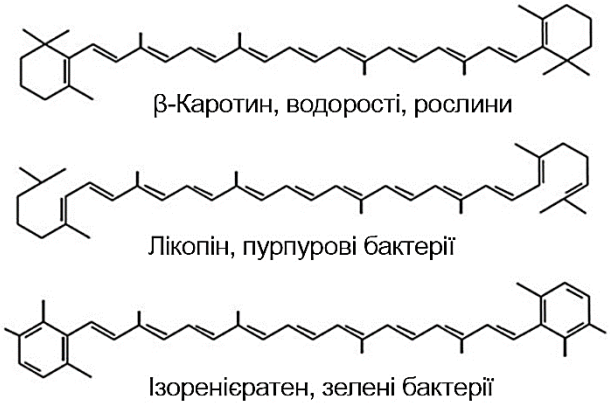


Рис. 10.4. Приклади деяких допоміжних пігментів

Каротиноїди – це гідрофобні пігменти, які міцно закріплені в фотосинтетичній мембрані. Вони зазвичай мають жовтий, червоний, коричневий або зелений колір і поглинають світло в синій області спектра.

Каротиноїди тісно пов'язані з хлорофілом або бактеріохлорофілом у фотосинтетичних комплексах, і деяка частина енергії, поглиненої каротиноїдами, може бути передана в реакційний центр.

Однак каротиноїди функціонують переважно як фотозахисні агенти. Яскраве світло може бути шкідливим для клітин, оскільки воно може каталізувати реакції фотоокиснення, при яких утворюються токсичні форми кисню, такі як синглетний кисень ($^1O_2$). Подібно до супероксиду та інших форм токсичного кисню, синглетний кисень може спонтанно окиснювати фотокомплекси, що робить їх нефункціональними. Каротиноїди гасять токсичні форми кисню, поглинаючи більшу частину цього шкідливого світла і таким чином запобігають небезпечному фотоокисненню.

Червоні водорості та ціанобактерії мають фікобіліпротеїни, які є основними системами збирання світла у фототрофів. Фікобіліпротеїни мають червоний або синьо-зелений кольори та надають ціанобактеріям і червоним водоростям їх характерне забарвлення. Червоний фікобіліпротеїн (фікоеритрин) найсильніше поглинає світло при довжини хвилі близько 550 нм, синій фікобіліпротеїн (фікоціанін) – при 620 нм, а третій фікобіліпротеїн (алофікоціанін) – при 650 нм.

Фікобіліпротеїни збираються в агрегати (фікобілісоми), які прикріплюються до тилакоїдів ціанобактерій. Фікоціанін і фікоеритрин поглинають світло і передають частину енергії алофікоціаніну, а той – до хлорофілу реакційного центру. Таким чином, фікобілісоми полегшують передачу енергії до реакційних центрів ціанобактерій.

Наявність допоміжних пігментів дозволяє використовувати ширший спектр світлових хвиль при фотосинтезі, а також захищати клітини від високої інтенсивності сонячного світла, яке призводить до окиснення та пошкодження фотосинтетичного апарату. Ця різноманітність фотосинтетичних пігментів дозволяє фототрофам поглинати енергію в широкому діапазоні спектру електромагнітного випромінювання та має екологічне значення для успішного співіснування різних фототрофів в одному середовищі існування, не конкуруючи за джерело енергії.

10.5. Фотосинтетичні мембрани, хлоропласти та хлоросоми

Пігменти хлорофілу та всі інші компоненти апарату збирання світла знаходяться в мембранах клітин. Розташування цих фотосинтетичних мембран у прокаріотичних і еукаріотичних фототрофів відрізняється. В еукаріотичних фототрофів фотосинтез відбувається у внутрішньоклітинних органелах – хлоропластах (рис. 4.23), які виникли із ціанобактерій на ранніх етапах еволюції шляхом симбіотичного злиття з еукаріотичною клітиною.

Хлоропласти містять листові фотосинтетичні мембранні системи, що називані тилакоїдами. Тилакоїди розташовані так, що хлоропласт розділений на дві області: матричний простір, який оточує тилакоїд, називається стромою, і внутрішній простір усередині тилакоїду, який називається просвітом (рис. 10.5). Таке розташування робить можливим генерування рушійної сили протонів, яка використовується для синтезу АТФ.

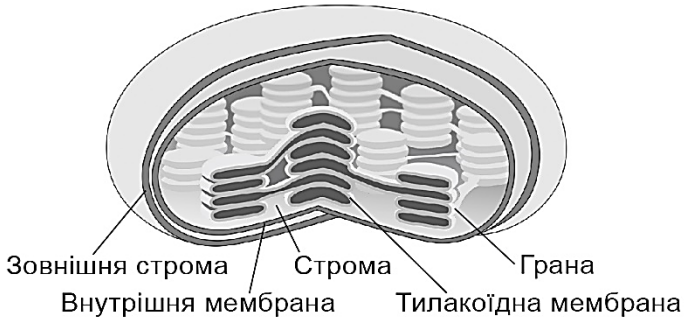


Рис. 10.5. Хлоропласт

У пурпурових бактерій фотосинтетичні пігменти інтегровані у внутрішні мембранні системи, що виникають в результаті інвагінації цитоплазматичної мембрани. Мембранні везикули (стопки мембран), які називають хроматофорами або ламелами, є звичайними мембранними структурами у пурпурових бактерій (рис. 10.6 а, б).

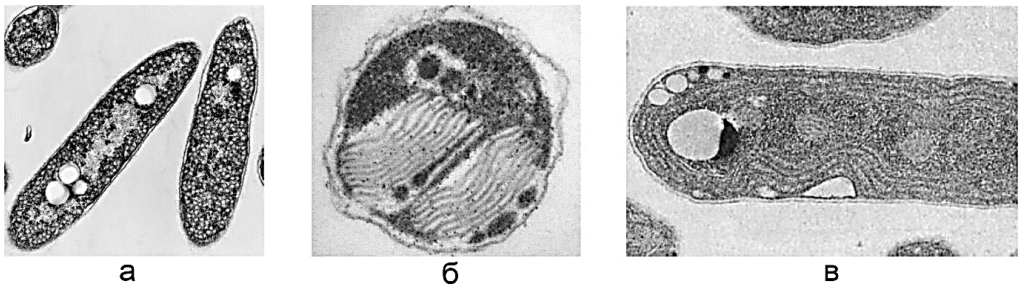


Рис. 10.6. Фотосинтетичні мембрани аноксигенних фототрофії: (а) везикули пурпурових бактерій *Rhodobacter*, (б) пластинчасті мембрани у пурпурової бактерії *Ectothiorhodospira*, (в) тилакоїдні мембрани ціанобактерії *Synechococcus lividus*.

У ціанобактерій фотосинтезуючі пігменти знаходяться в пластинчастих мембранах (рис. 10.6 в), які також називаються тилакоїди через їхню схожість із тилакоїдами в хлоропластах водоростей.

Основною структурою для захоплення енергії зі світла низької інтенсивності є хлоросома. Хлоросоми присутні у зелених сіркових бактерій

(*Chlorobium)*, зелених несіркових бактерій (*Chloroflexus*) і фототрофних ацидобактерій (*Chloracidobacterium*), які є аноксигенними фототрофами. Хлоросоми функціонують як гігантські антенні системи, але на відміну від антен пурпурових бактерій або ціанобактерій, молекули бактеріохлорофілу в хлоросомі не прикріплені до білків.

Хлоросоми дозволяють цим фототрофам рости за надзвичайно низької інтенсивності світла. Такі фототрофи, зазвичай, зустрічаються у найглибших водах озер, внутрішніх морів та інших безкисневих водах, де рівень освітленості занадто низький для інших фототрофів, наприклад, на глибині близько 100 м в Чорному морі.

Зелені несіркові бактерії та *Chloracidobacterium* є основними компонентами мікробних матів, товстих біоплівок, що утворюються в гарячих джерелах і середовищах з високим вмістом солей. Зелені сіркові бактерії поширені поблизу сульфідних відкладень і навіть можуть здійснювати фотосинтез у темряві в глибинах океану за допомогою інфрачервоного випромінювання з гідротермальних джерел. Отже, хлоросоми дозволяють фототрофам, які їх мають, здійснювати фотосинтез за мінімальної доступної кількісті світла.

10.6. Реакційний центр, антена та система переносу електронів

Фотосинтетичний апарат складається із світлозбиральних антен, реакційних центрів (РЦ) та електронтранспортної системи переносників електронів (ЕТС), локалізованих у мембранних структурах. Ці структури ускладнюються від геліобактерій (клітинні мембрани), через пурпурові бактерії (внутрішньоклітинні вирости клітинної мембрани різної форми) до зелених бактерій (хлоросоми та клітинні мембрани) та ціанобактерій (фікобілісоми та тилакоїди).

Реакційний центр та антена складають фотосинтетичну одиницю. Фотосинтетичні реакційні центри – це складні макромолекулярні структури, локалізовані в мембранах, що утворюють фотокомплекси. Вони складені з кількох білкових субодиниць і кофакторів (включаючи хлорофіли або бактеріохлорофіли). Фотосинтетичні реакційні центри оточені великою кількістю хлорофілів/бактеріохлорофілів, що утворюють світлозбиральні антенні комплекси, функцією яких є вловити фотони та передати їх енергію в замкнену в кільце систему переносників.

У аноксигенних фототрофів описано кілька різних типів реакційних центрів, що містять хінони (хіноновий тип) або FeS (залізо-сірчаний тип), залежно від акцептора електронів в реакційному центрі.

Реакційні центри взаємодіють з антенними пігментами і компонентами системи транспортування електронів. Антенні пігменти поглинають енергію фотонів світла навіть при низькій інтенсивності освітлення та направляють енергію до реакційного центру. Це викликає збудження хлоро-

філів або бактеріохлорофілів та генерування сильно електронегативних електронів, що передаються через первинного переносника в ЕТС.

Таким чином, під дією квантів світла в замкненій ЕТС (фотосистема I) створюється постійний потік електронів, який подібно дихальному ЕТЛ викачує протони з клітини та створює градієнт протонів на мембрані – протонрушійну силу, як спосіб консервації біологічної енергії, яка трансформується АТФ-синтетазою в АТФ, що називається фотофосфорилюванням (рис. 10.7).

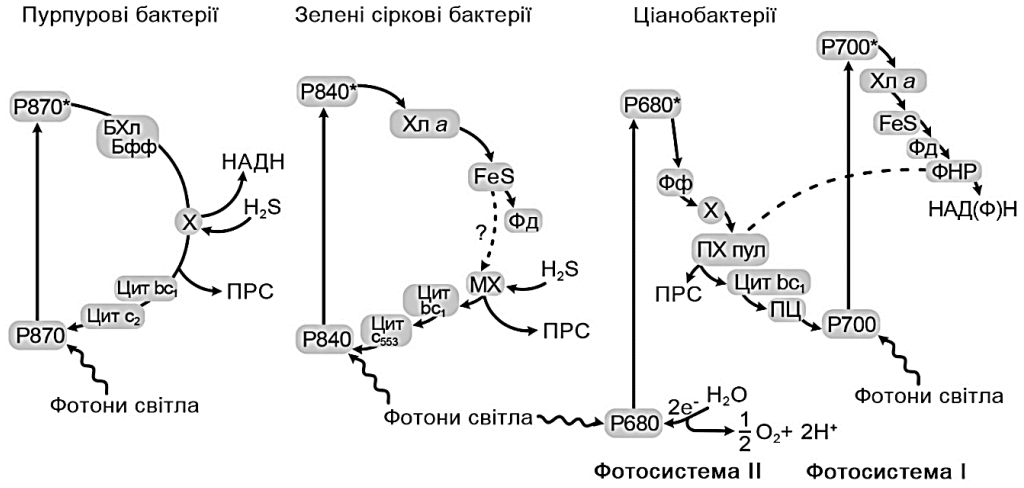


Рис. 10.7. Схеми перенесення електронів у оксигенних і аноксигенних фототрофів. Бхл – бактеріохлорофіл, Бфф – бактеріофеофітин, Хл – хлорофіл, Цит – цитохром, FeS – залізо-сірчаний білок, P870, P840, P680, P700 – реакційні центри, ПРС – протонрушійна сила, ПЦ – пластоціанін; ФНР – фередоксин-НАДФ-оксидоредуктаза, Фф – феофітин; X – хінон, МХ – менахінон, ПХ – пластохінон

При цьому зверніть увагу на те, що механізм трансформації енергії квантів світла в енергію біохімічних зв'язків при фотосинтезі базується, як і при диханні, на системі транспорту електронів та формуванні трансмембранного потенціалу протонів.

При циклічному транспорті електронів відновлювальні еквіваленти не утворюються. Відновлення пиридиннуклеотиду здійснюється шляхом лінійного переносу електронів із замкненого циклу на окиснений пиридиннуклеотид, а втрачені з циклу електрони компенсуються отриманням електронів від зовнішнього донора (рис. 10.7). Зовнішніми донорами електронів можуть бути деякі органічні речовини, відновлені сполуки сірки, молекулярний водень, молекула води і т. ін.

У подальшому більш детально розглянемо структурні компоненти і механізм переносу електронів фотосинтетичного апарату аноксигенних та оксигенних мікроорганізмів. Важливо звернути увагу на те, що у них ме-

ханізм трансформації енергії фотонів світла в енергію біохімічних зв‘язків (АТФ) базується, як і при диханні, на системі переносників електронів та формуванні протонрушійної сили.

10.7. Аноксигенний фотосинтез

У фототрофних бактерій процес трансформації сонячної енергії розпочинається з того, що антени вловлюють кванти світла та передають збудження в реакційний центр.

Пурпурові бактерії використовують РЦ хінонового типу (Q-типу), який містить три поліпептиди, що разом із молекулою цитохрому *c* вбудовані в фотосинтетичну мембрану. Ці поліпептиди зв’язують чотири молекули бактеріохлорофілу *a*, дві з яких є особливою парою і ще дві, що переносять електрони в реакційний центр, дві молекули бактеріофеофітину *a*, дві молекули хінону та одну молекулу каротиноїду.

Світлові реакції фотосинтезу (рис. 10.8) починаються з поглинання світлової енергії пігментами антени, яка передається на особливу пару молекул бактеріохлорофілу *a*. Це збуджує їх, перетворюючи із відносно слабкого на дуже сильного донора електронів.

Після того як цей потужний донор був створений, решта етапів фотосинтетичного потоку електронів дуже нагадують ті, що мають місце при диханні в ЕТЛ, тобто електрони передаються по мембрані від носіїв з низьким окисновідновним потенціалом (E_0') до носіїв з високим окисновідновним потенціалом (E_0').

Збуджений електрон реакційного центру Р870 відновлює молекулу бактеріохлорофілу *a*, який у свою чергу відновлює бактеріофеофітин *a*, а той, у свою чергу, – молекулу хінону в мембрані. З хінону електрони транспортуються через серію залізо-сіркових білків і цитохромів, які при цьому виносять протони на зовнішній бік клітинної мембрани та генерують на ній градієнт (рушійну силу) протонів. Зрештою електрон повертається до реакційного центру.

Цей процес називається циклічним фотофосфорилюванням, оскільки електрони переносяться по замкненому колу, генеруючи рушійну силу протона, яка трансформується АТФ-синтетазою в АТФ (рис. 10.8).

Аналогічні реакції циклічного перенесення електронів мають місце в інших фототрофів, хоча існують значні відмінності в деталях. Реакційні центри хінонового типу (Q-типу), які містять молекули хінону, знаходяться в пурпурових бактеріях, зелених несіркових бактеріях і бактеріях роду *Gemmatimonas*.

Реакційні центри зелених сіркових бактерій роду *Chloracidobacterium* і геліобактерій містять замість них залізосірковий FeS реакційний центр. Реакційні центри Q-типу і FeS-типу мають важливі структурні відмінності, що створює суттєві відмінності в потоці електронів.

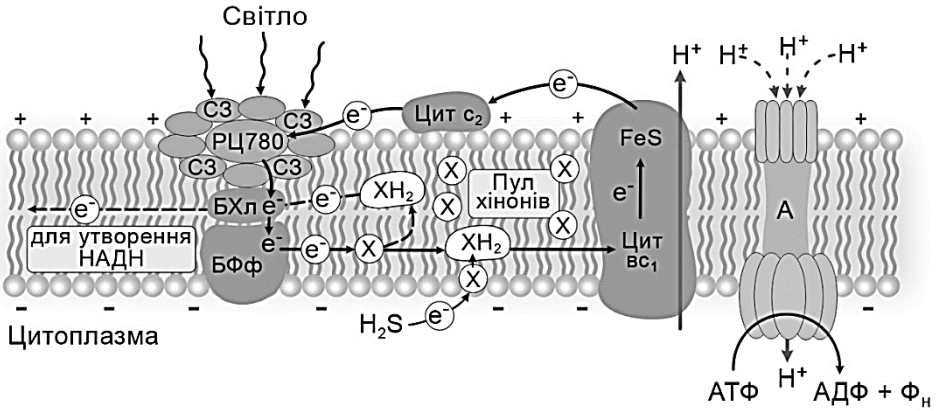


Рис. 10.8. Схематичне зображення ланцюга перенесення електронів у пурпурових бактерій: РЦ – реакційний центр; СЗ – світлозбиральний комплекс; БХл – бактеріохлорофіл; БФф – бактеріофеофітин; X – хінон (Q); XH_2 – відновлений хінон; Fe/S – залізосірчаний білок; Цит – цитохром (відповідний); заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-

Для фіксації CO_2 крім АТФ фототрофам необхідно утворити інший важливий продукт – відновник. Для цього у пурпурових бактерій електрони відбираються з фотосистеми I (замкненої ЕТС) і переносяться (як у хемолітотрофних бактерій) на окиснений піридиннуклеотид (НАДФ), який відновлюється (рис. 10.8) і використовується для фіксації CO_2 у циклі Кальвіна (розділ 11) і для синтезу необхідних органічних сполук.

Реакційні центри FeS-типу зелених сіркових бактерій, сприймаючи енергію квантів світла, утворюють збуджені високо енергізовані електрони, які можуть відновлювати фередоксин (Фд), що дозволяє фіксувати CO_2 через зворотний цикл трикарбонових кислот (розділ 11). Реакційні центри Q-типу у пурпурових бактерій не можуть відновити Фд для утворення відновника.

У результаті відбирання електронів виникає дефіцит електронів у фотосистемі I, який фототорофні бактерії компенсують, приймаючи електрони від зовнішнього донора – відновлених сполук сірки, H_2, низькомолекулярних органічних сполук та ін.

Необхідно відзначити, що фотосинтез у геліобактерій, зелених та пурпурових бактерій не супроводжується виділенням кисню, тому називається безкисневим.

10.8. Оксигенний фотосинтез

Ціанобактерії як і інші кисневі фототрофи мають реакційні центри обох типів – FeS і Q, які, ймовірно, розвинулись з реакційних центрів зелених і пурпурових бактерії, відповідно. У них електрони переносяться через дві окремі фотосистеми – фотосистему I (P700), що має реакційний центр

FeS-типу і фотосистему II (P680), що має реакційний центр Q-типу. Потоки електронів в ФСІ та ФСІІ пов'язані за «Z схемою», названою так через те, що цей шлях нагадує перевернуту літеру Z (рис. 10.9).

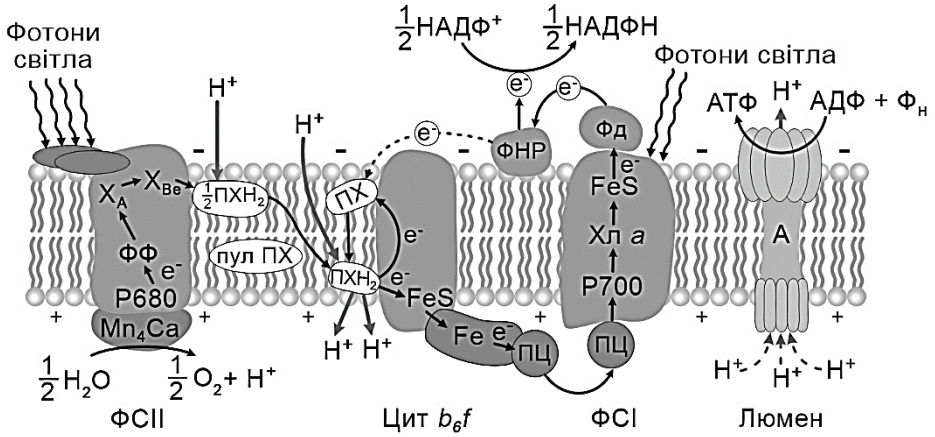


Рис. 10.9. Транспорт електронів за кисневого фотосинтезу: ФСІ – фотосистема I; ФСІІ – фотосистема II; Хл – хлорофіл; Цит – цитохром; FeS – залізосірчаний білок; Р680 та Р700 – реакційні центри; ПЦ – пластоціанін; Цит – цитохром; Фд – фередоксин; ФНР – фередоксин-НАДФ-оксидоредуктаза; Фф – феофітин; Х – хінон; ПХ – пластохінон; $ПХН_2$ – пластохінон відновлений; А – АТФ-синтетаза; Люмен – область між двома мембранами тилакоїдів; заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-

Як і в аноксигенному фотосинтезі, світлові реакції кисневого фотосинтезу відбуваються в фотокомплексах, вбудованих у спеціалізовані фотосинтетичні мембрани. В еукаріотичних клітинах ці мембрани знаходяться в хлоропластах (рис. 10.5), тоді як у ціанобактерій, мембрани розташовані стосами в цитоплазмі (рис. 10.6).

Поглинаючи світлову енергію, молекула хлорофілу Р680 ФСІІ збуджується та віддає електрон феофітину *а* (рис. 10.9), при цьому Р680 стає настільки електропозитивним, що може приймати електрони від молекули H_2O, яка є надзвичайно слабким донором електронів.

Окиснення молекули води ФСІІ відбувається у водоокиснювальному комплексі та каталізується кластером Mn_4Ca, при цьому виробляється O_2 і H^+. Кожен електрон, який переноситься на феофітин, потім проходить через серію хінонів ($X_А$ і $X_Б$) у фотокомплексі ФСІІ. Нарешті два електрони з фотокомплексу ФСІІ використовуються для відновлення пластохінону (ПХ) до $ПХН_2$, що дозволяє переносити через мембрану протони та генерувати протонрушійну силу.

Рушійна сила протонів утворюється в кисневому фотосинтезі транспортом електронів через хінони і цитохроми до переносника з все більш позитивним потенціалом відновлення. Ці реакції транспорту електронів

подібні до тих, що мають місце в дихальному ланцюгу при аеробному диханні. Електрони з $ПХН_2$ переносяться через цитохром *b6f* та пластоціанін на реакційний центр ФСІ. Поглинання світла реакційним центром Р700 ФСІ дозволяє йому приймати електрони, що передаються пластоціаніном. Електрони проходять через кілька проміжних переносників до ФСІ і на завершальному етапі відновлюють $НАДФ^+$ до НАДФН, який використовується для фіксації CO_2 у циклі Кальвіна та в інших біосинтетичних реакціях.

Зверніть увагу, що генерація градієнту протонів за оксигенного фотосинтезу на відміну від аноксигенного здійснюється шляхом нециклічного потоку електронів, оскільки електрони не повертаються назад, щоб відновити окиснений реакційний центр Р700, а використовуються для відновлення $НАДФ^+$.

Однак, коли в клітині за зменшення потреби накопичується надлишок НАДФН, оксигенні фототрофи можуть передавати електрони на окиснений пластохінон, здійснючи циклічне фотофосфорилювання. При цьому вони використовуються для створення рушійної сили протонів та додаткового синтезу АТФ (пунктирна лінія на рис. 10.9.).

Фотосистеми І і ІІ зазвичай функціонують у тандемі. Однак, якщо активність ФСІІ блокується, деякі кисневі фототрофи можуть здійснювати фотосинтез, використовуючи лише ФСІ. По суті, це аноксигенний фотосинтез, що здійснюють кисневі фототрофи. При цьому багато ціанобактерій можуть використовувати H_2S як донор електронів, а зелені водорості – H_2.

З еволюційної точки зору, процес фотофосфорилювання як в оксигенних, так і в аноксигенних фототрофів є однією із багатьох вказівок на їхні близькі родинні стосунки. Існують переконливі докази того, що пурпурові та зелені бактерії є попередниками ціанобактерій, тому очевидно, що аноксигенний фотосинтез з'явився першим на Землі.

Ключовою еволюційною подією, яка в кінцевому підсумку призвела до утворення кисневого фотосинтезу в ціанобактерій, було придбання обох типів реакційних центрів шляхом горизонтального перенесення генів. Еволюційне походження кисневого фотосинтезу стало фундаментальною подією в історії Землі, оскільки він дозволив фотоавтотрофам використовувати воду як невичерпне джерело донорів електронів та наситив киснем наш планету.

10.9. Фотосинтез у галоархей

Інший механізм використання енергії світла реалізують галоархеї, які є аеробними хемотрофами, у несприятливих умовах за нестачі кисню. Ця форма фототрофії не використовує хлорофіл та не пов'язана з фіксацією CO_2, тому це не фотосинтез у традиційному розумінні. У концентрованих розчинах солей кисень дуже погано розчиняється, що призводить до ство-

рення умов його нестачі. У цьому випадку галоархеї на світлі при нестачі кисню утворюють модифіковані клітинні мембрани, які містять декілька видів світлочутливих пігментів – бактеріородопсин, галородопсин, слоуродопсин, фобородопсин та археродопсин. Бактеріородопсин відповідає за транслокацію протонів, галородопсин закачує K^+ в обмін на Na^+, а слоу-, фобо- та археродопсини служать фоторецепторами на червоне і синє світло та забезпечують обертання джгутиків для здійснення фототаксису.

В умовах гіпоксії *Halobacterium salinarum* і деякі інші галоархеї синтезують бактеріородопсин із C_{40}-каротиноїдів і вставляють його в свої цитоплазматичні мембрани. Бактеріородопсин названий так через свою структурну та функціональну схожість з родопсином, зоровим пігментом ока. З бактеріородопсином пов'язана молекула ретиналю, каротиноїдоподібною молекулою, яка може поглинати світлову енергію та прокачувати протони через цитоплазматичну мембрану.

Бактеріородопсин поглинає зелене світло довжиною 570 нм. У результаті ретиналь бактеріородопсину, який існує в нормі у транс-конфігурації ($Рет_Т$), збуджується, віддає протон і перетворюється на цис-форму $Рет_С$ (рис. 10.10). Ця світлова трансформація ретиналю пов'язана з транслокацією протона з клітини через клітинну мембрану. Після цього транс-ізомер ретиналю $Рет_С$ поглинає протон із цитоплазми та відновлює конфігурацію транс-ізомера $Рет_Т$, що забезпечує функціонування протонного насосу (рис. 10.10) та призводить до накопичення протонів на зовнішній поверхні мембрани та генерування рушійної сили протонів, яка АТФ-синтетазою трансформується в АТФ. Опосередковане бактеріородопсином виробництво АТФ у *H. salinarum* підтримує повільний ріст цього організму в безкисневих умовах.

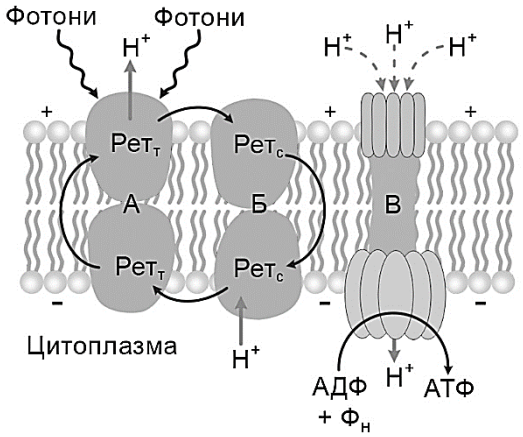


Рис. 10.10. Пурпурова мембрана галобактерій і створення градієнту протонів за участі бактеріородопсину: $Рет_Т$ – транс-конфігурації ретиналю; $Рет_С$ – цис-форма ретиналю; А – ретиналь, що прийняв протон (транс-конфігурація); Б – ретиналь, що віддав протон (цис-форма); В – АТФ-синтетаза; заряди $^+$ і $^-$ на зовнішній і внутрішній поверхні мембрани представляють H^+ і OH^-

Стимульований світлом протонний насос *H. salinarum* також функціонує для викачування Na^+ із клітини за рахунок активності системи антипортів Na^+- H^+ і транспорту поживних речовин, зокрема амінокислот та K^+, необхідного для осмотичного балансу.

Таким чином, аеробні хемотрофні галобактерії використовують світлову енергію, щоб синтезувати достатню кількість АТФ за дефіциту кисню. Вони не можуть постійно рости в анаеробних умовах, оскільки кисень необхідний їм також для синтезу бактеріородопсину, але за допомогою фотосинтезу галоархеї можуть перечекати стрес, спричинений нестачею кисню.

Відкриття того, що родопсини поширені в морських мікробних екосистемах, розмиває межу між метаболічними стратегіями. Усі відомі мікроорганізми, що містять бактеріородопсин, є хемоорганогетеротрофами, використовуючи органічний вуглець як джерело вуглецю, електронів та енергії. Зверніть увагу, що перекачування протонів родопсином генерує протонрушійну силу без перенесення електронів по ЕТЛ. Що це означає для мікроорганізмів, які живуть у морському середовищі з обмеженим вмістом органічного вуглецю?

З кожною органічною молекулою, яку поглинає організм, він повинен «вирішити» або окиснювати її для утворення НАДН та АТФ, або використовувати її для біосинтезу необхідних сполук. Використання протонного насосу на основі бактеріородопсину дозволяє синтезувати АТФ без необхідності катаболізувати дорогоцінний органічний вуглець. Тобто, здійснюючи фотосинтез з використанням родопсину, ці хемоорганогетеротрофи можуть спрямовувати більше органічного вуглецю на біосинтетичні процеси та ріст, а не окиснювати його для отримання енергії.

Питання для самостійного контролю

1. Охарактеризуйте таксономічні групи фототрофних мікроорганізмів.
2. Опишіть основні і допоміжні пігменти, що беруть участь у механізмах аноксигенного та оксигенного фотосинтезу.
3. Чому системи переносу електронів локалізуються в мембранах?
4. Опишіть будову хлоропластів у ціанобактерій.
5. У чому особливості будови фотосинтетичних структур у аноксигенних фототрофних бактерій?
6. Опишіть циклічну систему переносу електронів у оксигенних і аноксигенних мікроорганізмів і її функцію.
7. У чому схожість і відмінності утворення відновника при аноксигенному та оксигенному фотосинтезі.
8. Охарактеризуйте донори електронів у аноксигенних і аноксигенних бактерій.
9. Охарактеризуйте особливості фотосинтезу у галобактерій.

РОЗДІЛ 11
КОНСТРУКТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ

Конструктивний метаболізм або анаболізм – це сукупність реакцій побудови складних молекул і структур клітини з більш простих попередників із використанням метаболічної енергії. Основними кінцевими продуктами конструктивного метаболізму є біополімери клітини (білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди, ліпіди). Здійснення анаболізму вимагає постійного притоку енергоємних молекул, що утворюються під час катаболізму поживних речовин, поглинених клітиною.

У хемоорганотрофних мікроорганізмів, які використовують готові органічні сполуки, біосинтетичні та енергетичні процеси тісно пов'язані та взаємозалежні. Одні й ті ж поживні органічні речовини можуть використовуватися як будівельні блоки для анаболізму та як джерела енергії у реакціях катаболізму. Багато проміжних сполук катаболічних шляхів відводяться в реакції біосинтезу.

Катаболічні та анаболічні шляхи можуть відрізнятися набором ферментів, їх регуляцією, внутрішньоклітинною локалізацією та використанням кофакторів та переносників. Багато ферментів амфіболічних шляхів беруть участь як у реакціях анаболізму, так і в катаболічних реакціях. Наприклад, більшість гліколітичних ферментів бере участь як у синтезі, так і в катаболізмі глюкози. У нормальних клітинах, що активно ростуть, завжди підтримується рівновага між процесами анаболізму та катаболізму.

Вирішальне значення для анаболізму мають процеси утворення метаболітів-попередників (прекурсорів), оскільки вони дають початок іншим молекулам, що утворює клітина. Прекурсорами є вуглецеві скелети (тобто вуглецеві ланцюжки), які використовуються як вихідні субстрати для синтезу мономерів та інших будівельних блоків, необхідних для утворення макромолекул.

Основними прекурсорними метаболітами є глюкозо-6-Ф, фруктозо-6-Ф, 3-фосфогліцериновий альдегід, 3-фосфогліцерат, фосфоенолпіруват, піруват, ацетил-КоА, α-кетоглутарат, сукциніл-КоА, оксалоацетат, рибозо-5-Ф, еритрозо-4-Ф, які утворюються на центральних метаболічних шляхах. У процесі біосинтезу до вуглецевих ланцюгів прекурсорів додаються функціональні фрагменти, такі як аміно- та сульфгідрильні групи. Слід зауважити, що більшість прекурсорів використовується для синтезу амінокислот і нуклеотидів.

Усі метаболіти-попередники є проміжними продуктами шляхів катаболізму глюкози та циклу трикарбонових кислот (рис. 6.5). Ці шляхи відіграють головну роль в обміні речовин, тому їх часто називають центральними шляхами метаболізму.

Гетеротрофи, що ростуть на субстраті іншому, ніж глюкоза, перетворюють це джерело вуглецю в один або декілька проміжних продуктів цен-

тральних метаболічних шляхів, на яких вони можуть утворювати необхідні прекурсори.

Автотрофні організми використовують шляхи фіксації CO_2, глюконеогенезу та інші для утворення прекурсорів. Автотроф повинен спочатку перетворити CO_2 у відновлені органічні сполуки, з яких він може утворити прекурсорні метаболіти. Багато реакцій, які використовують автотрофи в синтезі метаболітних попередників, – це реакції центральних метаболічних шляхів, що діють в катаболічному або в анаболічному напрямку. Таким чином, центральні метаболічні шляхи є важливими для анаболізму як гетеротрофів, так і автотрофів.

Наявність спільних метаболітів між шляхами катаболізму та фіксації CO_2 створюють можливості для деяких мікроорганізмів рости як міксотрофи, вибираючи здатність рости гетеротрофно чи автотрофно в залежності від можливостей, доступних їм у середовищі.

У процесі перетворення метаболітного попередника в амінокислоту або нуклеотид вуглецевий скелет модифікується різними способами, включаючи додавання азоту, фосфору чи сірки. Тому в цьому розділі обговорюємо також синтез мономерів з прекурсорів з використанням різних джерел азоту, сірки та фосфору.

Усі клітини потребують у першу чергу джерел вуглецю та азоту для здійснення біосинтетичних реакцій. Атмосфера є великим резервуаром неорганічного вуглецю та азоту у формі CO_2 та N_2, проте вони повинні бути хімічно відновлені для асиміляції в клітинний матеріал. Процеси відновлення, пов'язані з їх асиміляцією, називаються фіксацією CO_2 і N_2. Вони вимагають значної кількості енергії від клітини у вигляді АТФ і відновників. Ці процеси сформувались дуже рано в історії життя та широко поширені серед бактерій і архей. Еволюційно походження шляхів фіксації CO_2 і N_2, ймовірно, відбулося, коли Земля була ще безкисневою, тому їх ферменти інгібуються киснем.

Далі розглянемо джерела та шляхи, якими мікроорганізми забезпечують себе основними біогенними елементами для конструктивного метаболізму.

11.1. Асиміляція двоокису вуглецю мікроорганізмами

Джерелом вуглецю, як і енергії, для гетеротрофних організмів служать готові органічні сполуки. Автотрофні організми, на відміну від гетеротрофних, використовують CO_2 в синтезі органічних сполук та формуванні структурних компонентів клітини. До асиміляції вуглекислого газу здатні представники хемолітотрофних та фототрофних прокаріотичних та еукаріотичних мікроорганізмів (табл. 11.1).

У мікроорганізмів можливості автотрофної асиміляції вуглекислого газу значно ширші, ніж у рослин завдяки тому, що вони в процесі еволюції

Таблиця 11.1

Автотрофні мікроорганізми

Джерело енергії	Група	Рід
H_2	Водневі бактерії	*Ralstonia, Nocardia, Xanthobacter, Pseudomonas derxia*
NH_3	Нітрифікуючі бактерії	*Nitrosolobus, Nitrosomonas, Nitrocystis*
NO_2	Нітрифікуючі бактерії	*Nitrobacter, Nitrospina, Nitrosococcus*
N_2	Азотфіксуючі бактерії	*Azotobacter, Anabaena, Prochlorococcus, Rhizobium*
S, H_2S, $S_2O_3^{2-}$	Сіркобактерії	*Thiobacillus, Sulfolobus, Desulfotomaculum, Wolinella, Desulfovibrio, Beggiatoa*
Fe^{2+}	Залізобактерії	*Gallionella, Sphaerotilus, Thiobacillus*
CH_4, CH_3OH	Метилотрофи	*Hyphomicrobium, Methylomonas, Methylobacterium, Methylosinus, Paracoccus, Pseudomonas*
H_2, CO_2 Форміат Метиламін Триметиламін Ацетат	Метаногени	*Methanobacterium, Methanococcus, Methanomicrobium, Methogenium, Methanospirillum, Methanosarcina*
Світло	Фототрофи	*Rhodobacter, Anabaena, Prochlorococcus, Synechococcus,* водорості

сформували для цього різноманітні механізми та шляхи. У ціанобактерій, пурпурових бактерій та багатьох хемолітотрофів цю функцію виконує цикл Кальвіна (рибулозодифосфатний цикл) з ключовим ферментом рибулозодифосфат карбоксилазою (РДФК).

Цикл Кальвіна є найбільш поширеним і важливим шляхом фіксації CO_2. Його використовують усі кисневі фототрофи (включаючи ціанобактерії, водорості та рослини), більшість пурпурових та аеробних хемолітотрофних бактерій. Таке поширення свідчить про те, що багато мікробів отримали гени ферментів циклу Кальвіна шляхом горизонтального перенесення.

Ключовим ферментом циклу Кальвіна є фермент рибулозодифосфаткарбоксилаза (РДФК), який відновлює CO_2 до 3-фосфогліцерату. Вважається, що цей фермент є найбільш поширеним білком на Землі. Для

функціонування циклу Кальвіна потрібно 12 НАДФН і 18 молекул АТФ, щоб утворити фруктозо-6-фосфат з 6 CO_2. Багато бактерій, що здійснюють цикл Кальвіна, мають карбоксисоми (рис. 11.1), які є білковими мікрокомпартментами в клітинах бактерій. Карбоксисоми містять фермент рибулозодифосфаткарбоксилазу, що має дуже низьку спорідненість з CO_2 і пригнічується O_2. Карбоксисоми значно покращують ефективність РДФК, тому розробляються способи біоінженерного введення карбоксисом у хлоропласти рослин, для підвищення ефективності фотосинтезу та росту рослин.

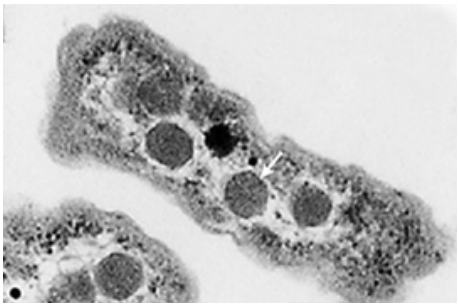


Рис. 11.1. Карбоксисоми облігатно аеробних гамапротеобактерій *Halothiobacillus neapolitanus*

Відсутність карбоксисом у хлоропластів може свідчити про те, що ціанобактеріальний предок хлоропластів мав цикл Кальвіна, але був позбавлений карбоксисом. Аналіз молекулярної послідовності вказує на появу карбоксисом у нефототрофних бактерій та передачу їх ціанобактеріям шляхом горизонтального перенесення генів уже після виникнення хлоропластів.

Цикл Кальвіна (рис. 11.2) потребує CO_2, молекули-акцептора CO_2 (рибулозодифосфату), відновника (НАДФН), АТФ і двох ключових ферментів – рибулозодифосфаткарбоксилази та фосфорибулокінази. Основний етап у циклі Кальвіна виконує фермент рибулозодифосфаткарбоксилаза, що каталізує приєднання CO_2 до рибулозодифосфату (сполука С5) утворення двох молекул 3-фосфогліцеринової кислоти (ФГК, сполука С3).

На другому етапі ФГК фосфорилюється та відновлюється до ключового проміжного продукту гліколізу – 3-фосфогліцеринового альдегіду (ФГА), з якого утворюється молекула глюкози шляхом зворотних реакцій ранніх етапів гліколізу (рис. 6.9). Щоб РДФК включила 6 молекул CO_2, потрібно 6 молекул рибулозодифосфату, карбоксилування яких дає 12 молекул ФГА, що трансформуються в 6 молекул глюкози.

На третьому етапі цикл Кальвіна замикається. Через серію біохімічних перетворень між різними цукрами утворюється 6 молекул рибулозо-5-фосфату, що фосфорилюються ферментом фосфорибулокіназою до

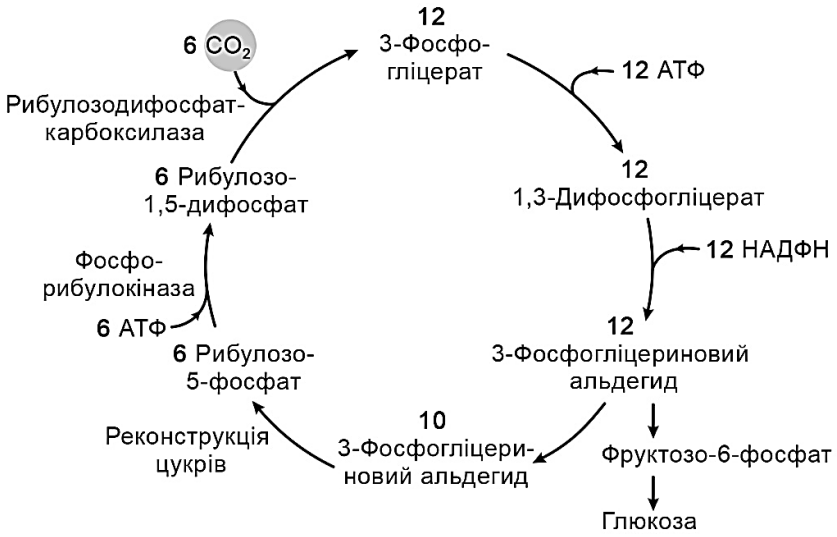


Рис. 11.2. Схема фіксації CO_2 у циклі Кальвіна

6 молекул рибулозодифосфату, які знову можуть служити акцепторами CO_2. Для синтезу однієї молекули глюкози з 6 CO_2 за циклом Кальвіна необхідно 12 НАДФН і 18 АТФ.

Хоча цикл Кальвіна є найбільш поширеним шляхом фіксації CO_2 в біосфері, багато автотрофних бактерій і архей використовують альтернативні шляхи. Ці альтернативні автотрофні шляхи зазвичай відновлюють CO_2 до ацетил-коензиму А (ацетил-КоА), центрального метаболіту, який входить до всіх основних шляхів біосинтезу.

Зелені сіркові бактерії *Chlorobium,* аеробні бактерії роду *Hydrogenobacter* та багато анаеробних та мікроаерофільних хемолітотрофних бактерій використовують для цього *відновлювальний цикл трикарбонових кислот* (відновлювальний ЦТК) з ключовим ферментом цитратліазою (рис. 11.3), який є більш енергоефективний ніж цикл Кальвіна. Він потребує 4 НАДН, 2 НАДФН, 2 ФАДН, 4 відновлених Фд та лише 10 АТФ для фіксації 6 CO_2 та утворення одної молекули глюкози. Як і в циклі Кальвіна дві молекули гліцеральдегід-3-фосфату перетворюються у фруктозо-1,6-дифосфат, а потім глюкозу шляхом зворотних реакцій альдолазної стадії гліколізу.

Більшість реакцій відновлювального ЦТК каталізуються зворотними реакціями ферментів окиснювального ЦТК. Однак у відновлювальному циклі є кілька специфічних ферментів, до яких, зокрема, належать ферменти *α*-кетоглутаратсинтаза та піруватсинтаза, які каталізують фіксацію CO_2 за допомогою електронів, що надходять від відновленого фередоксину.

Зелені сіркові бактерії відновлюють Фд у світлових реакціях фотосинтезу, тоді як хемолітотрофні бактерії повинні виробляти його за допо-

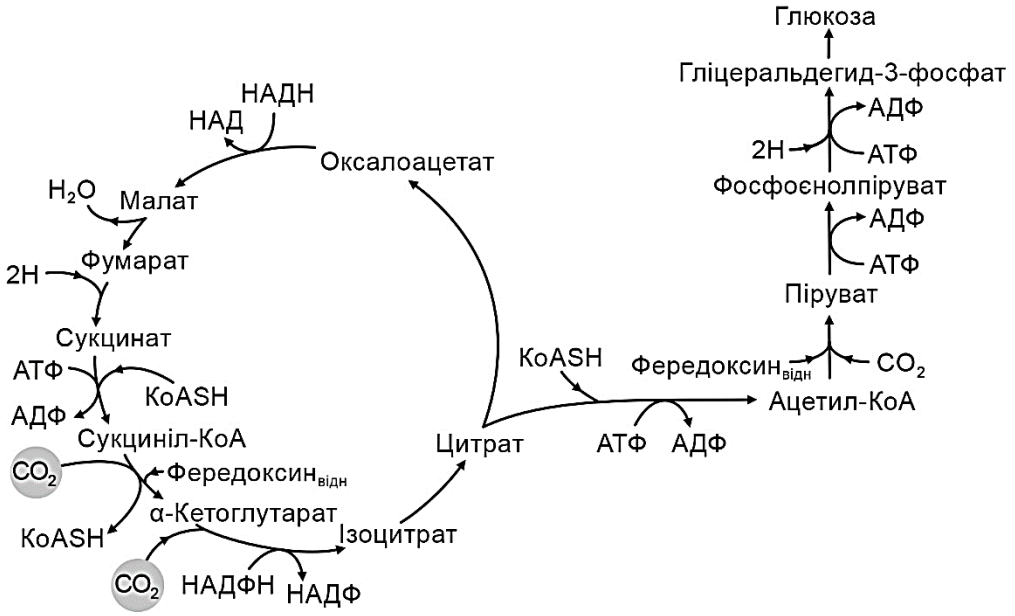


Рис. 11.3. Схема фіксації CO_2 у зворотному циклі трикарбонових кислот

могою зворотного транспорту електронів. У відновлювальному ЦТК замінено також фермент цитратсинтазу з окиснювального ЦТК на цитратліазу (АТФ-залежний фермент, який розщеплює цитрат на ацетил-КоА та оксалоацетат) та фермент сукцинатдегідрогеназу з окиснювального ЦТК, ФАДН-пов'язаного з фумаратредуктазою (фермент, який утворює сукцинат із фумарату) (рис. 11.3).

Зелені несіркові бактерії можуть здійснювати автотрофну асиміляцію вуглекислого газу за допомогою реакцій *гліоксилатного циклу* або *відновлювального циклу дикарбонових кислот*.

У представників домену *Archaea* виявлено два інші цикли фіксації CO_2. Морські археї-автотрофи *Metallosphaera sedula* з філуму *Crenarchaeota*, родини *Sulfolobaceae* фіксують CO_2 у реакціях *3-гідроксипропіонатного/4-гідроксибутиратного циклу*. Судячи з поширення генів, відповідальних за синтез ключових ферментів цього циклу, в пробах ДНК, виділених з різних областей Світового океану, цей шлях є досить поширеним серед архей, що мешкають в морях, і може робити свій внесок у загальну первинну продукцію органічної речовини на Землі.

У гіпертермофільних анаеробів та автотрофів *Ignicoccus hospitalis* (родина *Desulfurococcaceae*), *Thermoproteus neutrophilus* (родина *Thermoproteaceae*), *Pyrolobus fumarii* (родина *Pyrodictiaceae*) виявлено ще один шлях автотрофної асиміляції вуглецю на Землі – *дикарбоксилатний/4-гідроксибутиратний цикл* фіксації CO_2. Цей цикл поширений і використовують його як археї, так і бактерії.

Ці шляхи мають циклічний характер. Перша стадія його полягає в приєднанні (фіксації) CO_2 до молекули-акцептора. Потім вуглець вуглекислого газу відновлюється до рівня органічних речовин (як правило, утворюються С3-сполуки, які відводяться в біосинтетичні шляхи). Цикл замикається за допомогою реакцій, що призводять до регенерації акцептора CO_2.

У метаногенів, гомоацетогенів і сульфатредукторів присутній *нециклічний ацетил-КоА шлях* автотрофної асиміляції CO_2 (шлях Вуда-Льюнгдала), в якому з двох молекул вуглекислого газу утворюється активована молекула оцтової кислоти – *ацетил-КоА*. Таким чином, відомо шість шляхів автотрофної фіксації CO_2.

11.2. Гетеротрофна фіксація CO_2

Гетеротрофи не здатні здійснювати повну побудову органічних речовин клітини з CO_2, однак у них можлива гетеротрофна фіксація CO_2. Це, наприклад, відома реакція Вуда-Веркмана, коли фосфоенолпіруват або піруват шляхом карбоксилювання добудовується до оксалоацетату. Карбоксилюванню можуть піддаватися також ацетил-КоА, пропіоніл-КоА, сукциніл-КоА, α-кетоглутарат та сполуки з більшим числом атомів вуглецю, наприклад, фенілацетат.

Гетеротрофна фіксація CO_2 становить до 6% від загального споживання вуглецю клітиною, а на бідних середовищах може досягати рівня 30%. Чим простіше середовище культивування, тим активнішим є цей процес. Таким шляхом подовжуються вуглецеві скелети та підтримується окисно-відновний потенціал середовища.

11.3. Використання інших одновуглецевих сполук

Метан, метанол, формальдегід, форміат, метильовані аміни, CO, ціаніди і т. ін. можуть бути амфіболітами, тобто джерелами вуглецю та енергії. Такі сполуки використовують метилотрофи. Особливістю їх підготовчого метаболізму є те, що мікроорганізми повинні перетворити одновуглецеві сполуки на формальдегід, який потім фіксується в одному з асиміляційних циклів (рибулозомонофосфатному, сериновому чи диоксиацетоновому).

Якщо мікроорганізми ростуть на більш відновлених, ніж CO_2 вуглецевих сполуках, але не цукрах, вони повинні самі синтезувати глюкозу шляхом глюконеогенезу. На перший погляд, цей шлях є ніби зворотним гліколітичним шляхом, проте на трьох його стадіях працюють інші ферменти. Піруват перетворюється на фосфоенолпіруват за допомогою піруваткарбоксилази та фосфоенолпіруваткарбоксикінази, фруктозо-1,6-дифосфат перетворюється на фруктозо-6-фосфат за допомогою фруктозодифосфатази, а глюкозо-6-фосфат – на глюкозу під дією глюкозо-6-фосфатази.

11.4. Асиміляція сполук азоту

Для здійснення біосинтезу мікроорганізмам у великій кількості необхідний азот. Сполуки азоту, що використовуються в конструктивних цілях, – це амоній, нітрит, нітрат, молекулярний азот та азотвмісні органічні сполуки. Можливості використання сполук азоту мікроорганізмами значно ширші, ніж у тварин та рослин.

Асиміляція нітрату та нітриту. Щодо використання нітрату мікроорганізми схожі на рослини. Процеси відновлення нітрату поширені в живій природі. Це насамперед відновлення нітрату ($NO_3^- \rightarrow NH_4^+$) для біосинтетичних процесів, коли відновлений азот (у формі амонію) вбудовується в органічні молекули:

$$NO_3^- \xrightarrow{2\bar{e}} NO_2^- \xrightarrow{2\bar{e}} HNO \xrightarrow{2\bar{e}} NH_2OH \xrightarrow{2\bar{e}} NH_3$$

Така *асиміляційна нітратредукція* відома у рослин, грибів, бактерій і відбувається за допомогою розташованої в цитоплазмі нітратредуктази, що містить молібден, і складну гемвмісну залізосіркову нітритредуктазу.

На першому етапі нітрат відновлюється до нітриту за участю розчиненої в цитоплазмі асиміляційної нітратредуктази. Другий етап каталізує ферментний комплекс нітритредуктази, за будовою схожий на дисиміляційний фермент. Відновлення нітриту до амонію здійснюється послідовно через ряд проміжних продуктів, що залишаються пов'язаними із ферментним комплексом.

Асиміляція амонію. Часто джерелом амонію для мікроорганізмів також служить сечовина:

$$NH_2–CO–NH_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3\ (NH_4^+)$$

Амоній вбудовується в органічні молекули при синтезі азотвмісних сполук. Атом азоту вводиться в структуру органічних молекул завдяки процесам амінування.

Мікроорганізми мають кілька систем асиміляції амонію. У факультативних анаеробів родини *Enterobacteriaceae* та деяких клостридій амоній приєднується по подвійному зв'язку до ненасичених жирних кислот з утворенням амінокислот. Так, при амінуванні фумарату під дією ферменту аспартази утворюється аспартат.

Частіше відбувається приєднання аміногрупи та одночасне відновлення кетокислот (α-кетоглутарату, пірувату, оксалоацетату та ін.). Наприклад, при відновлювальному амінуванні α-кетоглутарату за допомогою ферменту глутаматдегідрогенази утворюється глутамат. Під дією ферменту глутамінсинтетази глутамат амінується до глутаміну.

Для утворення інших типів амінокислот мікроорганізми здійснюють переамінування, коли аміногрупа глутамату або глутаміну передається на кетокислоту, наприклад, на піруват з отриманням аланіна.

11.5. Фіксація молекулярного азоту

Використання молекулярного азоту в синтезі власних сполук притаманне лише прокаріотичним мікроорганізмам і носить назву азотфіксації, під якою розуміють здатність окремих бактерій та архей до ферментативного відновлення молекулярного азоту (в атмосфері знаходиться 78% азоту) до амонію (з обов'язковим утворенням молекулярного водню).

Процес азотфіксації має глобальне екологічне та сільськогосподарське значення, оскільки він забезпечує значну частину фіксованого азоту, який підтримує екосистеми, і є важливим для бобових культур, таких як соя, сочевиця та люцерна, з якими азотфіксуючі бактерії утворюють симбіотичні асоціації.

Азотфіксацію за своїм значенням можна порівняти з фотосинтезом, тому що для переважної більшості живих організмів азот може бути доступний тільки у зв'язаній формі. Зв'язаний азот, який рослини виносять із ґрунту (близько 110 млн т на рік), частково поповнюється за рахунок внесення мінеральних та органічних азотних добрив (близько 30 млн т на рік). Однак основне зв'язування азоту відбувається шляхом мікробної азотфіксації. Саме мікроорганізми-азотфіксатори замикають глобальний цикл азоту на Землі.

Перші азотфіксатори (диазотрофи) були описані М. Бейєрінком і нашим земляком С. Виноградським та наприкінці XIX ст. М. Бейєрінк виділив чисту культуру симбіотичних бактерій з роду *Rhizobium*, а С. Виноградський описав вільноживучий анаеробний мікроорганізм *Clostridium pasteurianum*, які фіксують молекулярний азот.

Встановлено, що здатність до азотфіксації мають представники більше 80 родів бактерій і принаймні трох родів термофільних архей. Вільноживучі азотфіксатори-хемотрофи зустрічаються серед анаеробних клостридій та сульфатредукторів, факультативно аеробних бацил та представників родини *Enterobacteriaceae*, аеробних метанотрофів та представників родини *Azotobacteriaceae* (табл. 11). Фототрофні вільноживучі азотфіксатори виявлені серед пурпурових, зелених бактерій та ціанобактерій.

Вільноживучих азотфіксаторів поділяють на істинно вільноживучих та асоціативних, що переважно зустрічаються в ризосфері деяких вищих рослин. До асоціативних диазотрофів належать представники родин *Enterobacteriaceae* та *Azotobacteriaceae*.

Симбіотичними азотфіксаторами є, перш за все, бульбочкові бактерії родини *Rhizobiaceae* та актинобактерії роду *Frankia* (табл. 11.2).

Найбільш поширеним методом виявлення здатності організму до азотфіксації є ацетиленовий тест, який заснований на здатності нітрогенази азотфіксуючих мікроорганізмів здійснювати реакцію відновлення ацетилену до етилену ($C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$).

Нітрогеназний ферментний комплекс складається з двох білкових компонентів різної молекулярної маси (рис. 11.4). Mo-Fe-білок (220 кДа)

містить два атоми молібдену та 28–32 атоми заліза, у Fe-білку (64 кДа) – 4 атоми заліза. Для прояву нітрогеназної активності необхідні обидва компоненти.

Таблиця 11.2

Азотфіксуючі бактерії

Симбіотичні азотфіксатори		Вільноживучі азотфіксатори			
		Аероби		Анаероби	
Бобові рослини	Не бобові рослини	Гетеротрофи	Фототрофи	Гетеротрофи	Фототрофи
Бактерії роду *Rhizobium* у симбіозі з <u>рослинами підродин:</u> *Mimosoideae Papilionatae Caesalpiniodea*	Бактерії роду *Klebsiella з рослинами: Alnus Elaeagnus Miryca Ceanothus Comptonia* Ціанобактерії з лишайниками	<u>Бактерії:</u> *Azotobacter Azotomonas Pseudomonas Spirillum Klebsiella Beijerinckia* <u>Дріжджі:</u> *Rhodotorula pullularia*	<u>Ціанобактерії:</u> *Nostoc Calothrix Anabaena Fischerella Mastigocladus Chloroglaea Tolypothrix Stygonema*	<u>Бактерії:</u> *Clostridium Aerobacter aerogenes Bacillus polymyxa Desulfovibrio desulfuricans Achromobacter*	<u>Бактерії:</u> *Chromatium Chlorobium Rhodospirillum rubrum Rhodomicrobium yannielli Rhodopseudomonas Methanobacterium*

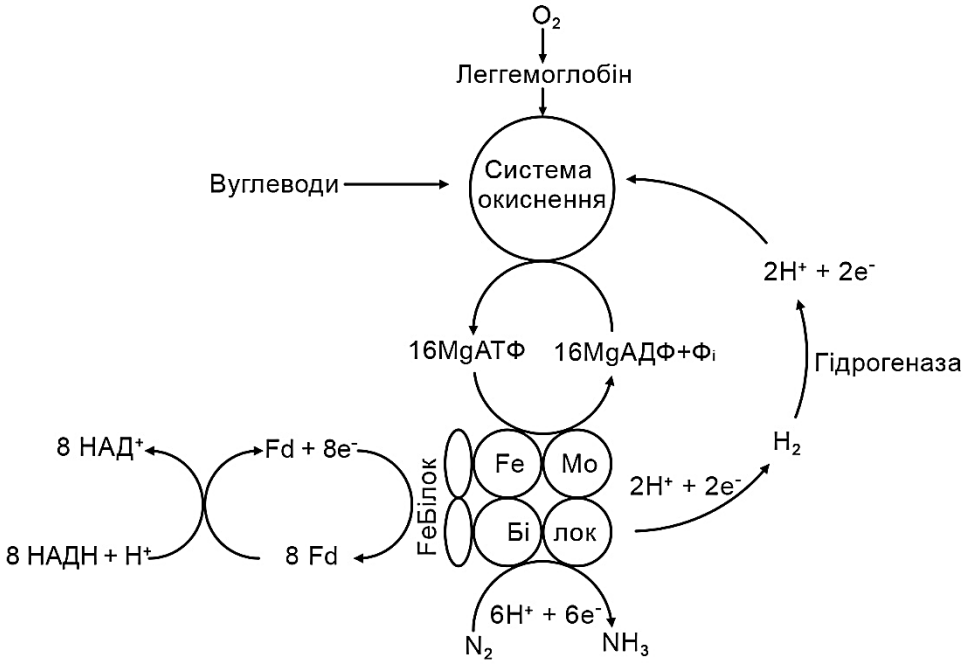


Рис. 11.4. Нітрогеназний комплекс і процеси, пов’язані з фіксацію молекулярного азоту

Молекулярний азот – це хімічно інертна та дуже стабільне речовина. Реакція $3H_2 + N_2 \rightarrow 2NH_3$ ендотермічна тому, щоб розірвати потрійний зв'язок у молекулі азоту необхідно принаймні 8 електронів та 16 молекул АТФ.

Електрони для відновлення N_2 переносяться з флаводоксину або фередоксину, які відновлюються у реакціях фотосинтезу, при диханні у аеробних диазотрофів або при диханні чи бродінні у анаеробів.. Послідовність переносу електронів у нітрогеназі така: донор електронів → динітрогеназа-редуктаза → динітрогеназа → N_2. З невідомих причин виділення H_2 є обов'язковим кроком у азотфіксації та відбувається на першому етапі циклу відновлення нітрогенази.

Нітрогеназний комплекс азотфіксаторів кодується кластером nif-генів.

Реакція відбувається у кілька стадій. Першим вільним продуктом реакції є аміак, усі проміжні продукти пов'язані із ферментним комплексом.

$$N{\equiv}N \xrightarrow{[2H]} HN{=}NH \xrightarrow{[2H]} H_2N{-}NH_2 \xrightarrow{[2H]} 2NH_3$$

Більшу частину утвореного аміаку при симбіотичній азотфіксації рослина асимілює шляхом амінування α -кетоглутарату до глутамату, а глутамата – до глутаміну.

Незважаючи на різноманітність анаеробних і аеробних мікроорганізмів, що здійснюють азотфіксацію, їх нітрогеназні комплекси мають принципову подібність – вони надзвичайно чутливі до кисню. Тому аеробні мікроорганізми стикаються з проблемою захисту нітрогенази від кисню та «вирішують» її різними шляхами.

У нитчастих ціанобактерій є спеціалізовані клітини-гетероцисти, в яких відсутня фотосистема II, і тому при фотосинтезі не утворюється кисень, а товста клітинна стінка перешкоджає його проникненню ззовні. Активна оксидазна система відразу відновлює проникний кисень. У азотобактера сильно розвинена слизова капсула, що перешкоджає проникненню кисню, і є унікальна оксидазна система з дуже високою спорідненістю до O_2, що не допускає кисень до нітрогенази. Нітрогеназа деяких вільноживучих аеробів має білкову частину з конформацією, що робить її менш чутливою до O_2.

Найбільш ефективний захист нітрогенази виявлено у бульбочкових бактерій. Для захисту від кисню вони синтезують високоспоріднений до кисню леггемоглобін, який зв'язує кисень, захищаючи нітрогеназу, та передає його бактеріям, забезпечуючи процес їх дихання.

11.6. Асиміляція фосфору мікроорганізмами

Фосфор – другий після азоту за важливістю неорганічний поживний компонент для росту організмів. Він входить у склад ДНК, РНК, АТФ та

фосфоліпідів. Фосфор присутній у навколишньому середовищі в розчинній формі (PO_4^{3-}), а також у вигляді нерозчинних органічних та мінеральних сполук. Мікробні перетворення фосфоровмісних речовин зазвичай не призводять до зміни його валентності. Фосфор майже завжди знаходиться у п'ятивалентному стані, за винятком сильно відновлених умов, тому мікроорганізмам не потрібно його відновлювати при включенні його до органічних сполук.

11.7. Мікробна асиміляція сірки

Сірка входить в склад метіоніну, цистеїну, глутатіону, коферменту А, сульфоліпідів та сульфополісахаридів. У складі таких речовин сірка знаходиться у відновленій формі (S^{2-}), тому деякі з них можуть використовуватись і в катаболізмі. Для того щоб ввести сірку в органічну сполуку, більшість мікроорганізмів здатна відновлювати окиснені сполуки сірки шляхом асиміляційної сульфатредукції.

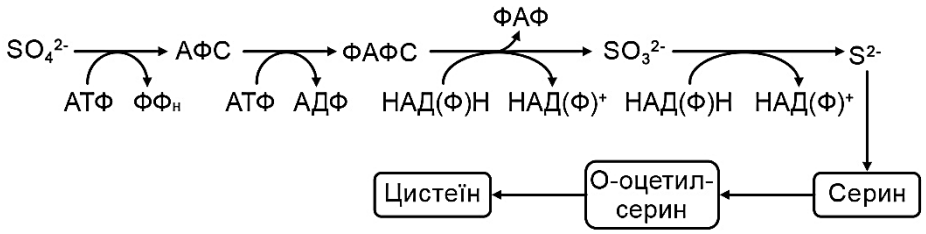


Рис. 11.5. Асиміляційна сульфатредукція: АФС – аденозинфосфосульфат; ФАФС – фосфоаденозинфосфосульфат; ФАФ – фосфоаденозинфосфат

У мікроорганізмів перша реакція цього процесу, що полягає в активуванні сульфату за рахунок його приєднання до аденозинмонофосфату (рис. 11.5). Далі АМФ знову фосфорилюється до фосфоаденозинфосфосульфату (ФАФС) і відбувається відновлення сульфату в сульфіт. Відділившись від молекули переносника, сульфіт відновлюється ферментом сульфітредуктазою до рівня S^{2-} і включається в О-ацетилсерин з утворенням сірковмісної амінокислоти (цистеїн). Складні сірковмісні сполуки (сульфоліпіди та сульфополісахариди) утворюються за участю фосфорильованого комплексу сульфату з АМФ (ФАФС). Мікроорганізми, не здатні здійснювати асиміляційну сульфатредукцію, можуть рости лише за наявності S^{2-} в середовищі.

11.8. Мікробна асиміляція заліза

Залізо є важливим хімічним елементом для всіх організмів, оскільки находиться в клітинах у центрі металопротеїнів, входить до складу гемного комплексу цитохромних білків, білків, що переносять кисень – гемоглобі-

ну, міоглобіну, леггемоглобіну, залізосіркових кластерів багатьох ферментів таких, наприклад, як нітрогенази, монооксигенази метану, рибонуклеотидредуктази та інших.

Залізо розподілено в природних місцях нерівномірно. Для здійснення реакцій асиміляції мікроорганізми вимушені активно поглинати його з навколишнього середовища за допомогою сидерофорів або отримувати з готових залізовмісних органічних сполук. Так, деякі патогенні мікроорганізми родів *Escherichia, Neisseria, Hemophylus* здатні видобувати залізо з гемоглобіну та інших гем-білкових комплексів. Запасання цього елемента у формі Fe^{3+}-сполук здійснюється у вигляді відкладень нерозчинних гідроксидів заліза у слизових позаклітинних структурах (чохлах та стеблинках), а також внутрішньоклітинно у вигляді магнетосом та у складі феритин-подібних білків.

Асиміляційне відновлення заліза здійснюють флавін-залежні Fe^{3+}-редуктази двох типів. Ферменти першого типу пов'язані з клітинною мембраною, другого – розчинені у цитоплазмі або периплазматичному просторі. Надлишок двовалентного заліза в клітині призводить до утворення токсичних активних форм кисню, тому катіони Fe^{2+}, які не задіяні безпосередньо в синтезі, у фізіологічно активних мікробних клітинах негайно окиснюються до Fe^{3+}.

11.9. Біосинтез амінокислот

Біосинтез амінокислот здійснюється, як правило, багатоетапними біохімічними шляхами (рис. 11.6). Організми, які не можуть отримати деякі або всі свої амінокислоти з навколишнього середовища, повинні синтезувати їх із глюкози або інших джерел вуглецю.

За структурою споріднені амінокислоти поділяють на групи родин, що мають кілька спільних етапів біосинтезу. Вуглецеві скелети для амінокислот походять майже виключно з проміжних продуктів гліколізу або циклу трикарбонових кислот.

Аміногрупа ($–NH_2$) амінокислот, зазвичай, походить від джерела неорганічного азоту, наприклад аміаку (NH_3). Аміногрупа найчастіше включається під час біосинтезу глутамату або глутаміну за допомогою ферментів глутаматдегідрогенази та глутамінсинтетази, відповідно (рис. 11.7). Ферменти глутаматдегідрогеназа і глутамінсинтетаза є в більшості бактерій і архей.

Після того, як аміак включено в глутамат або глутамін, аміногрупа з цих амінокислот може бути перенесена в реакціях трансамінування на різні вуглецеві скелети для утворення інших азотвмісних сполук. Наприклад, глутамат може віддавати свою аміногрупу оксалоацетату, утворюючи α-кетоглутарат і аспартат, а глутамін може реагувати з α-кетоглутаратом з утворенням двох молекул глутамату в амінотрансферазній реакції (рис. 11.7).

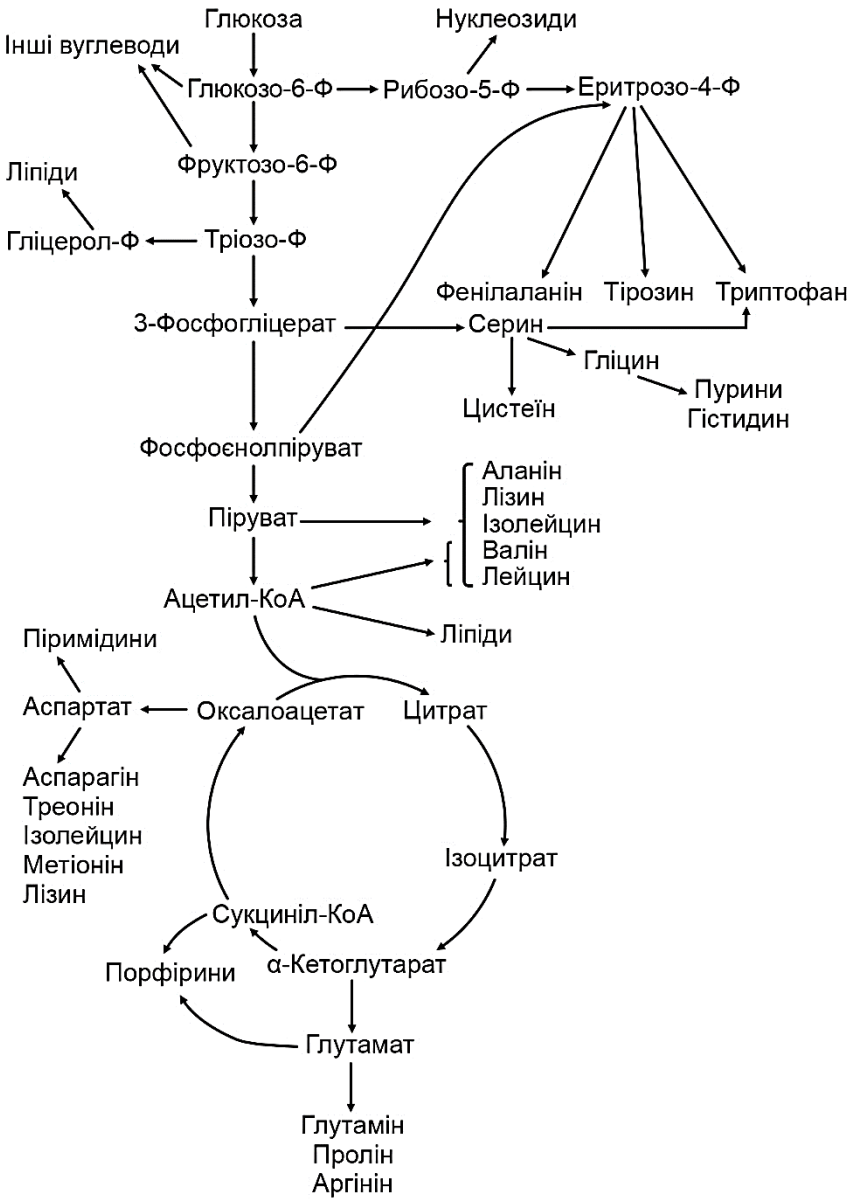


Рис. 11.6. Шляхи утворення амінокислот і нуклеотидів

Кінцевим результатом реакцій цих типів є перенесення аміаку в вуглецеві скелети різних сполук, з якими відбуваються подальші реакції біосинтезу для утворення всіх амінокислот, необхідних в синтезі білків та інших азотовмісних біомолекул.

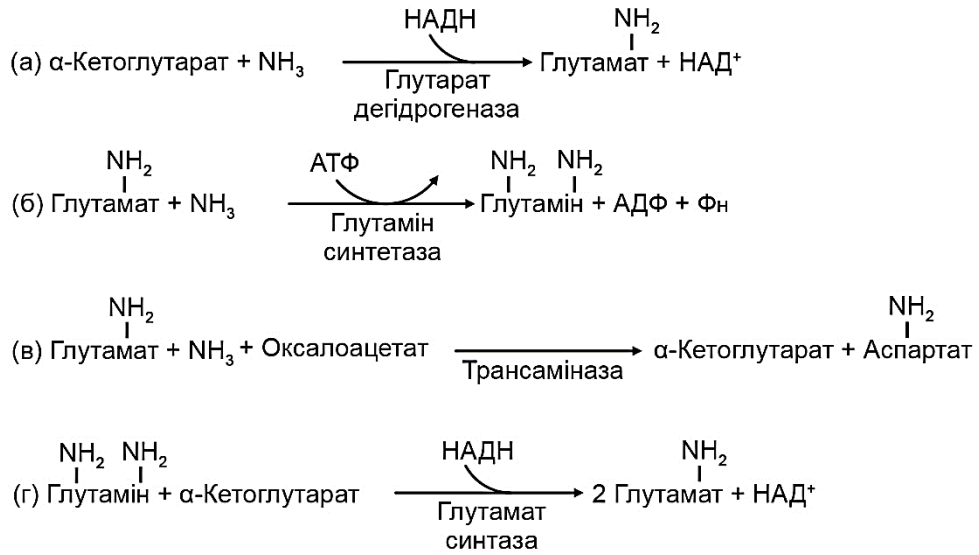


Рис. 11.7. Основні реакції асиміляції аміаку

11.10. Біосинтез нуклеотидів

Біохімічні шляхи, що лежать в основі біосинтезу пуринів і піримідинів, досить складні. Пурини утворюються поступово атом за атомом з кількох різних джерел вуглецю та азоту, включаючи навіть CO_2. Скелетом пуринових нуклеотидів слугує інозинова кислота, яка є попередником пуринових нуклеотидів аденіну і гуаніну. Вони синтезуються та приєднуються до рибози і стають готовими до включення в ДНК або РНК. Як і пуринове кільце, піримідинове кільце також побудоване з кілька різних джерел. Попередником піримідинів (тимін, цитозин і урацил) є уридин-5'-монофосфат.

11.11. Синтез біополімерів

Біополімери клітини відносяться до чотирьох класів макромолекул: нуклеїнових кислот, білків, полісахаридів та ліпідів. Вони утворюються з низькомолекулярних органічних речовин, що з'єднуються в ланцюг або мережу. Утворення біополімеру починається з синтезу активованих попередників (мономерів), приєднаних до молекул-переносників. При активації витрачається енергія АТФ. Молекули-переносники доставляють мономери до зростаючого полімерного ланцюга.

Утворення ДНК здійснюється шляхом матричного синтезу в процесі реплікації. Біосинтез РНК відбувається у процесі транскрипції з допомогою ферментів РНК-полімераз. Матрицею для транскрипції служить один із ланцюгів ДНК, а попередниками – рибонуклеотиди.

Біосинтез білків здійснюється в процесі трансляції на рибосомах та вимагає присутності попередників (амінокислот), матриці (молекули мРНК), ферментів та специфічних переносників (тРНК).

11.12. Біосинтез полісахаридів і глюконеогенез

Полісахариди є ключовими компонентами клітинних стінок мікробних клітин і часто зберігають запаси вуглецю та енергії у формі полісахаридів глікогену або крохмалю. Полісахариди синтезуються з моноцукрів за участю АТФ. Вони синтезуються з активованих форм глюкози, або уридиндифосфоглюкози (УДФГ), або аденозиндифосфоглюкози (АДФГ).

УДФГ є попередником кількох похідних глюкози, що використовуються в біосинтезі важливих структурних полісахаридів, таких як N-ацетилглюкозамін і N-ацетилмурамова кислота в пептидоглікані або ліпополісахаридний компонент грамнегативної зовнішньої мембрани.

Полісахариди синтезуються шляхом додавання активованої глюкози до попередньо існуючого полімерного фрагмента. Коли клітина росте не на глюкозі, а на інших вуглецевих сполуках, їй потрібно самій синтезувати глюкозу. У процесі глюконеогенезу використовується фосфоенолпіруват, один із проміжних продуктів гліколізу, як початкова сполука, з якої через зворотний гліколітичний шлях утворюється глюкоза.

Фосфоенолпіруват також може утворюватися з оксалоацетату, проміжного продукту циклу трикарбонових кислот. Синтез пептидоглікану починається в цитоплазмі, триває в клітинній мембрані та закінчується поза клітиною приєднанням до ланцюга муреїну, що подовжується.

11.13. Біосинтез жирних кислот і ліпідів

Ліпіди є основними компонентами цитоплазматичної та зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій та можуть використовуватися як запасні джерела вуглецю та енергії. Основним компонентом мікробних ліпідів у бактерій та еукарій є жирні кислоти. Археї не містять жирних кислот у своїх ліпідах, натомість мають гідрофобні ізопреноїдні бічні ланцюги, які виконують подібну структурну роль.

Жирні кислоти синтезуються шляхом одночасного приєднання двох атомів вуглецю C_2 ацильним білком-носієм (АЦБ). Таким чином, АЦБ забезпечує подовження жирної кислоти на два атоми вуглецю, коли вона будується. Кожна одиниця C_2 (ацетил) походить від тривуглецевої сполуки малонату, яка приєднана до АЦБ (малоніл-АЦБ). При цьому виділяється молекула CO_2.

Жирнокислотний склад клітинних ліпідів варіює від виду до виду, а також може змінюватися в певному організмі в залежності від температури росту. Клітини регулюють свій склад жирних кислот у мембрані, головним чином, щоб цитоплазматична мембрана зберігала стан плинності в залежності від температури.

При цьому низька температури сприяє біосинтезу коротколанцюгових і ненасичених жирних кислот, тоді як висока температура сприяє біосинтезу довголанцюгових і більш насичених жирних кислот. Самими поширеними в ліпідах бактерій є жирні кислоти довжиною $C_{12} – C_{20}$.

11.14. Вторинні метаболіти та їх біосинтез

Метаболіти умовно ділять на первинні та вторинні. Первинні метаболіти – це низькомолекулярні сполуки, необхідні для росту мікроорганізмів: амінокислоти, органічні кислоти, пуринові й піримідинові нуклеотиди, вітаміни і т. ін.

Вторинні метаболіти – це речовини мікробного походження, які не є суттєвими для росту організму, що їх утворює. Кожен вторинний метаболіт синтезується відносно обмеженою кількістю представників окремих видів. Вторинні метаболіти синтезуються в кінці експоненціальної або впродовж стаціонарної фаз росту, та їх формування значною мірою залежить від умов культивування, особливо складу поживного середовища. Багато вторинних метаболітів мають хімічну структуру, незвичайну для біологічної матерії, проте їхнє утворення бере початок від інтермедіатів первинного метаболізму.

До вторинних метаболітів відносять антибіотики, токсини, імунодепресанти, стимулятори росту, а також деякі запасні речовини (полі-β-алканоати). Ці сполуки належать до різноманітних класів органічних речовин (аміноциклітоли, кумарини, епоксиди, нерибосомні пептиди, поліени, піроли, терпеноїди, тетрацикліни, полікетиди, ізопреноїди, стероїди, гібереліни, фітоалексини і т. ін.).

Про фізіологічну роль вторинних метаболітів у житті власного продуцента достовірно відомо дуже мало.

Питання для самостійного контролю

1. Які компоненти потрібні для біосинтетичних процесів?
2. Як пов’язані катаболічні та анаболічні процеси?
3. Охарактеризуйте основні шляхи фіксації CO_2.
4. Скільки електронів і скільки АТФ потрібно для утворення однієї молекули гексози за циклом Кальвіна?
5. Які джерела азоту здатні використовувати мікроорганізми?
6. Які компонети беруть участь у фіксації молекулярного азоту?
7. Скільки електронів і скільки АТФ потрібно для фіксації однієї молекули N_2 на дві молекули NH_3?
8. Опишіть два способи, за допомогою яких організми, що фіксують N_2, можуть захищати свою нітрогеназу від O_2.
9. Охарактеризуйте шляхи введення азоту до складу органічних сполук?
10. Як вводиться сірка до складу органічних сполук?
11. Які шляхи використовують мікроорганізми для асиміляції заліза?

РОЗДІЛ 12
РЕГУЛЯТОРНІ МЕХАНІЗМИ ТА ФЕНОТИПОВА МІНЛИВІСТЬ

У одноклітинних організмів кожна клітина є повноцінним, повністю самодостатнім організмом, тоді як клітини більшості багатоклітинних організмів входять в склад спеціалізованих тканин і виконують лише якусь частину життєво важливих функцій організму.

Клітини мікроорганізмів знаходяться у безпосередньому контакті з навколишнім середовищем, часто далеким від оптимального для підтримки життя. Умови середовища – непостійні, тому мікроорганізм повинен бути завжди готовими адаптуватися (підлаштуватися) до умов, що змінюються. Для цього мікроорганізм повинен або тримати напоготові всі функції, які будь-коли можуть стати в нагоді, при цьому потрібно марно витрачати ресурси для підтримки непотрібних зараз функцій, або "вмикати" певні функції лише тоді, коли вони потрібні та "вимикати" непотрібні. Така стратегія призводить до значної економії ресурсів організму, однак вона потребує складних регуляторних механізмів для адаптації до мінливих умов середовища.

Для існування та функціонування живих клітин важлива не тільки регуляція активності окремих шляхів метаболізму, а й координація діяльності цих шляхів. Без адекватного контролю відбувається дезорганізація метаболізму. Завдання регуляторних механізмів надзвичайно складне. Усі шляхи метаболізму повинні регулюватись і координуватись так ефективно, щоб усі клітинні компоненти були присутні в даний момент у точно необхідних кількостях.

Для цього мікробні клітини повинні ефективно «відповідати» на зміни навколишнього середовища використанням наявних на даний момент поживних речовин і включенням нових катаболічних шляхів, коли доступними стають інші речовини. Це є фактично механізми *фенотипової мінливості*, за рахунок яких мікроорганізми використовують необхідні із наявного набору генів.

Оскільки композиція хімічних сполук навколишнього середовища безперервно змінюється, то регуляторні процеси повинні постійно відповідати новим умовам. Регуляція важлива для підтримки балансу між енергогенеруючими та синтетичними реакціями в клітині.

Потік вуглецю та енергії тим чи іншим шляхом може регулюватися трьома основними способами:

– локалізацією метаболітів та ферментів у різних частинах клітини;

– регуляцією на рівні активності ферментів – стимуляція або пригнічення активності певних ферментів, що дозволяє швидко змінювати шляхи метаболізму (рис.12.1);

– регуляцією на рівні синтезу ферментів, коли контроль за кількістю молекул ферменту в мікроорганізмах, зазвичай, здійснюється на рівні

транскрипції та трансляції (рис.12.1). Цей спосіб повільніший ніж на рівні активності ферментів, оскільки ферменти синтезуються лише тоді, коли в них є потреба, а на це потрібен певний час.

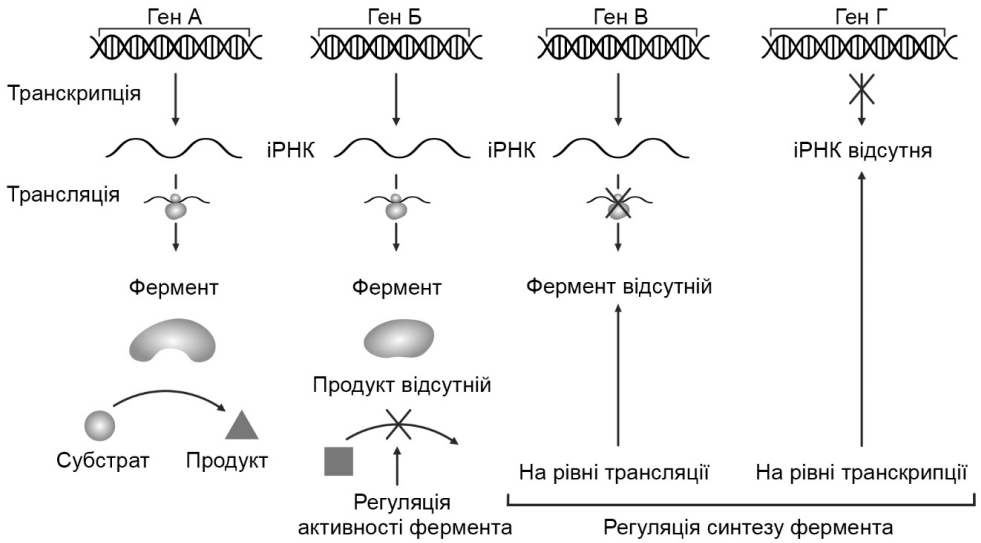


Рис. 12.1. Основні механізми регуляції метаболізму

Загальні процеси транскрипції та трансляції подібні для всіх організмів, хоча експресія генів відрізняється у представників різних доменів. Краще всього вивчені регуляторні процеси у бактерій, на яких зупинимося у цьому розділі.

12.1. Просторовий розподіл ферментів та метаболітів

Такий спосіб регуляції досягається в еукаріотичних мікроорганізмів створенням в клітині замкнутих ділянок (компартментів), обмежених мембранами, або компартменталізації, тобто розташуванням ферментів та метаболітів у різних структурах клітини чи органелах.

Компартменталізація особливо поширена в еукаріотичних мікроорганізмів, які мають значне число органел із власними мембранами. Наприклад, окиснення жирних кислот локалізовано в мітохондріях, тоді як синтез жирних кислот відбувається у цитоплазматичному матриксі.

Компартменталізація робить можливим одночасне протікання різноспрямованих процесів та окреме управління кожним процесом, наприклад, катаболічних і анаболічних шляхів. Активність конкретного шляху може координуватись у загальному метаболізмі шляхом регуляції транспорту метаболітів та коферментів між компартментами клітини. Неоднорідність клітинного внутрішнього середовища дозволяє створювати градієнти метаболітів для певних ферментних систем.

12.2. Контроль активності ферментів

Інший спосіб регуляції здійснюється шляхом збільшення (активації) чи зменшення (інгібування) активності уже існуючих в клітині ферментів. Ферменти, що активуються, функціонують на шляхах катаболізму, а ферменти, що інгібуються, – на шляхах біосинтезу. Це найбільш швидкий та тонкий механізм регуляції, якому піддаються алостеричні ферменти.

Алостеричні ферменти – це білки з великою молекулярною масою, що складаються з кількох субодиниць одного чи різного типу. Кожна субодиниця містить, як правило, каталітичний центр, який зв'язується з субстратом, та регуляторний, або алостеричний центр. Останній приєднує сполуку-ефектор, що може підвищувати або знижувати активність ферменту.

Нековалентне зв'язування ефектора з алостеричним центром викликає конформаційні зміни молекули ферменту, що відбуваються лише на рівні третинної структури, у результаті чого змінюється спорідненість ферменту до субстрату (рис. 12.2).

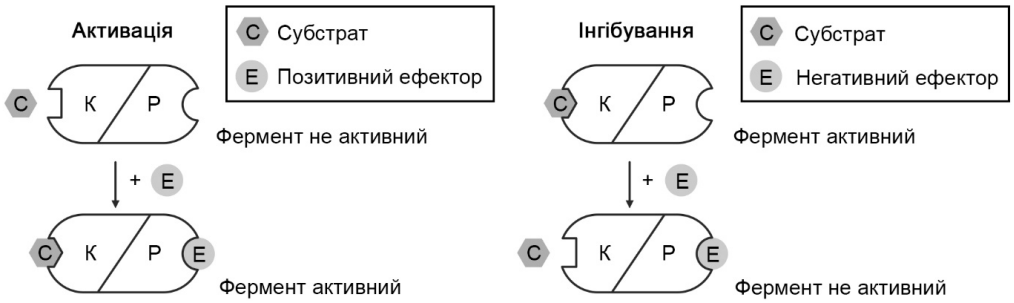
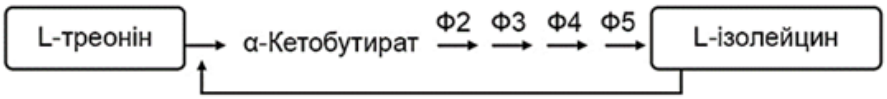


Рис. 12.2. Схема зміни активності алостеричних ферментів.
К – каталітичний центр, Р – регуляторний центр

Ефекторами можуть бути кінцеві продукти метаболічного шляху, субстрати ферментів, а також деякі кінцеві продукти споріднених метаболічних шляхів. Якщо дія ефектора призводить до зменшення каталітичної активності ферменту, такий ефектор називається негативним або інгібітором. Позитивним називають ефектор, дія якого збільшує каталітичну активність ферменту. Позитивним ефектором або активатором найчастіше буває субстрат даного регуляторного ферменту. Так, для аспартаткарбомоїлтрансферази *E. coli* цитозинтрифосфат (кінцевий продукт біосинтезу піримідинів) є негативним ефектором, а АТФ – позитивним ефектором.

Кожен біохімічний шлях має хоча б один фермент, що визначає швидкість усього процесу, оскільки каталізує найповільнішу реакцію, що лімітує його швидкість. Зазвичай таким «вузьким місцем» є перша реакція процесу. Фермент «вузького місця» зазвичай інгібується кінцевим продуктом цього шляху.

Найпростіший випадок алостеричної регуляції – регуляція кінцевим продуктом активності першого (ключового) ферменту (Ф1) нерозгалуженого біосинтетичного шляху. Якщо накопичується надлишок кінцевого продукту, він виступає в ролі ефектора та пригнічує активність першого ферменту. Цей процес називається ретроінгібуванням або інгібуванням за принципом зворотного зв'язку. Прикладом такого типу регулювання є пригнічення біосинтезу ізолейцину. Перетворення L-треоніну на L-ізолейцин включає п'ять ферментативних реакцій



Перший фермент шляху синтезу L-ізолейцину L-треоніндезаміназа є алостеричним. Він інгібується лише L-ізолейцином. На поверхні молекули L-треоніндезамінази є два види ділянок: каталітична – для зв'язування субстрату (L-треоніну) і регуляторна – для зв'язування ефектора (L-ізолейцину). При накопиченні в клітині L-ізолейцину він зв'язується з алостеричним центром ферменту L-треоніндезамінази, пригнічуючи його активність, і синтез L-ізолейцину припиняється.

Розгалужені метаболічні шляхи досягають балансу між кінцевими продуктами через регулювання ферментів у місцях розгалуження. Активність алостеричних ферментів у них регулюється складніше, оскільки від активності першого ферменту залежить біосинтез кількох кінцевих продуктів. Регуляція розгалужених шляхів полягає в наявності ізоферментів, що здійснюють однакову біохімічну реакцію, але відрізняються структурою.

Ізоферменти каталізують ту саму реакцію, але піддаються контролю різними регуляторами. За наявності ізоферментів один із кінцевих продуктів зменшує активність каталітичного процесу, але не блокує його повністю, оскільки інші ізоферменти залишаються активними.

Прикладом такого регулювання є розгалужений шлях синтезу ароматичних амінокислот тирозину, триптофану та фенілаланіну у *Escherichia coli* (рис. 12.3). Три ізоферменти незалежно каталізують синтез першого продукту цього шляху 3-дезокси-D-арабіногептулозо-7-фосфату (ДАГФ) і кожен регулюється незалежно своєю амінокислотою, яка є кінцевим продуктом.

Таким чином синтез ДАГФ пригнічується поступово, а для повного інгібування шляху необхідний надлишок усіх трьох амінокислот – тирозину, триптофану та фенілаланіну. Ця форма інгібування за допомогою зворотного зв'язку запобігає блокуванню всього шляху надлишком лише однієї або двох амінокислот і, таким чином, забезпечує синтез третьої амінокислоти у разі її нестачі.

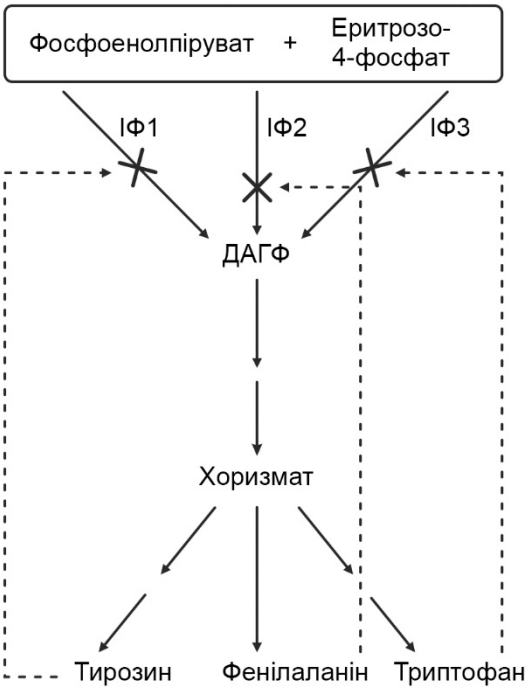


Рис. 12.3. Схема регулювання розгалуженого шляху синтезу ароматичних амінокислот тирозину, триптофану, фенілаланіну у *Escherichia coli* інгібуванням ізоферментів кінцевими продуктами: ДАГФ – 3-дезокси-D-арабіногептулозо-7-фосфату, ІФ1,ІФ2, ІФ3 – ізоферменти

Ковалентна модифікація ферментів, на відміну від нековалентної, – це необоротний процес, який полягає в ковалентному зв'язуванні або видаленні певної групи, що змінює активність ферменту. Наприклад, для активування глікогенфосфорилази *Neurospora crassa* потрібна ковалентна модифікація молекули ферменту. У *E. coli*, навпаки, ковалентно модифікована форма глутамінсинтетази менш активна.

Існують розгалужені метаболічні шляхи, в яких регуляція здійснюється таким чином, що одночасно відбувається активація та інгібування.

12.3. Контроль синтезу ферментів

Одним з перших і основних епігенетичних механізмів регуляції експресії генетичної інформації є метилювання ДНК. Метилювання ДНК – це її модифікація без зміни послідовності нуклеотидів, яка полягає в приєднанні метильної групи до цитозину або аденіну. Метилювання ДНК впливає на рівень транскрипції, тому є механізмом регулювання експресії генів. Такий механізм притаманний усім групам живих організмів, проте його рівень найбільший у еукаріотів.

У рослин і тварин зазвичай метилюється цитозин. У прокаріотичних мікроорганізмів може метилюватися як цитозин, так і аденін. Вважається, що у них метилювання є одним з способів захисту від фагів, деяких паразитів та, можливо, одним з механізмів регуляції клітинних процесів, зокрема процесів поділу клітини.

Виробництво білків може регулюватися на рівні транскрипції (шляхом зміни кількості створеної мРНК), або на рівні трансляції мРНК (шляхом блокування синтезу білка на рибосомі). У сукупності ці регуляторні процеси керують експресією генів. Після того як білок синтезовано, посттрансляційні регуляторні процеси можуть далі ковалентно модифікувати активність деяких ферментів.

Сігма-фактор. Одним з прикладів механізмів управління синтезом є зміна специфічності РНК-полімерази, яка потребує *сігма*-фактора для зв'язування з промотором та ініціації транскрипції. Складні процеси вимагають радикальних змін у транскрипції при синтезі продуктів різних генів у певній послідовності та може регулюватись серією сігма-факторів. Кожен сігма-фактор дає можливість *кор*-ферменту сприймати специфічну послідовність і транскрибувати саме ці гени.

Зміна сігма-фактора негайно замінює гени, що експресуються, на інші. Фаги після проникнення в бактеріальну клітину використовують сігма-фактори при синтезі власних мРНК у своєму життєвому циклі. Цей регуляторний механізм поширений як серед грамнегативних, так і серед грампозитивних бактерій та їх бактеріофагів. Так, *E. coli* синтезує кілька сігма-факторів, що контролюють РНК-полімеразну активність вироблення білків-флагелінів та білків теплового шоку для захисту клітини від термічної деструкції.

12.4. Репресія та індукція

Ферменти, що синтезуються незалежно від умов вирощування мікроорганізму, називаються конститутивними (наприклад, ферменти катаболізму глюкози), а ферменти, синтез яких вмикається або блокується – індуцибельними та репресибельними, відповідно.

Індукція та репресія – це широко відомі механізми управління синтезом потрібного ферменту (рис. 12.1). Наприклад, фермент *E. coli* β-галактозидаза – індуцибельний фермент. Рівень його підвищується у присутності невеликої молекули індуктора – алолактози, яка утворюється з лактози.

З іншого боку, наявні в навколишньому середовищі амінокислоти можуть репресувати утворення ферментів, відповідальних за їхній біосинтез. Ці ферменти відносять до репресибельних, а метаболіти, що спричиняють зниження синтезу такого ферменту, називають корепресорами. Індуцибельні ферменти синтезуються лише тоді, коли в них є потреба. Цей спосіб керування метаболізмом повільніший ніж зміна активності алостеричних ферментів.

Транскрипція є першим кроком у потоці біологічної інформації. Через це контролювати експресію генів в такий момент просто й ефективно. Якщо один ген транскрибується частіше, ніж інший, буде більше його матричної (інформаційної) РНК, доступної для трансляції, тому буде більша кількість його білкового продукту в клітині. Розглянемо прості процеси регуляції шляхом репресії та індукції, які регулюють експресію генів на рівні транскрипції.

Як правило, ферменти, які каталізують синтез певного продукту, не утворюються, якщо продукт уже присутній в достатній кількості. Наприклад, у кишкової палички та багатьох інших бактерій ферменти, необхідні в синтезі амінокислоти аргінін виробляються лише тоді, коли аргінін відсутній у середовищі. Надлишок аргініну знижує утворення ферментів, що відповідають за її синтез. Це називається репресією ферментів. Якщо аргінін додати до культури, що експоненційно росте в середовищі, позбавленому аргініну, то ріст бактерій продовжується з попередньою швидкістю, але утворення ферментів синтезу аргініну припиняється (рис. 12.4). Цей ефект – специфічний, оскільки утворення всіх інших білків у клітині продовжується.

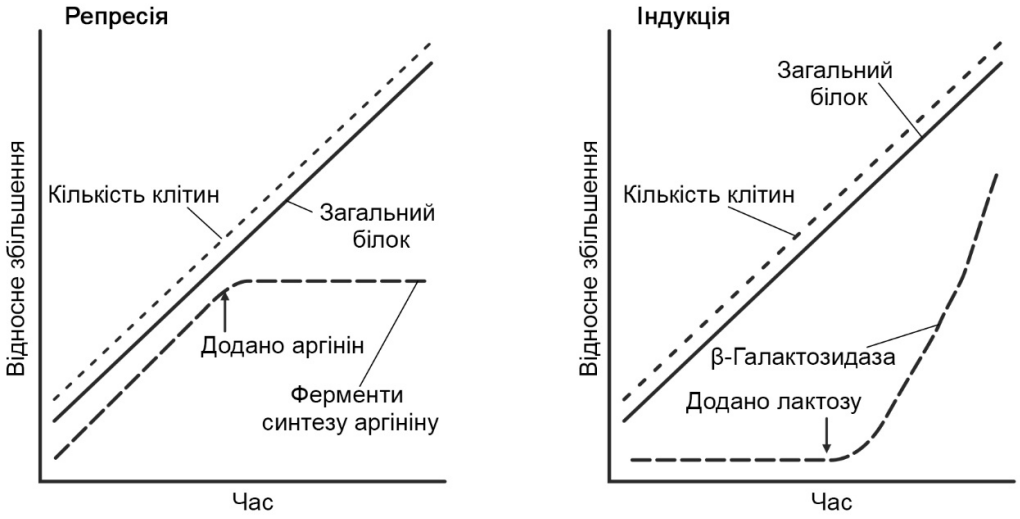


Рис. 12.4. Репресія синтезу ферментів утворення аргініну та індукція синтезу ферменту β-галактозидази, що бере участь в утилізації лактози, у *E. coli*

У бактерій широко поширений механізм репресії як засіб контролю синтезу ферментів, необхідних для виробництва амінокислот і попередників нуклеотидів пуринів і піримідинів. У більшості випадків кінцевий продукт певного шляху біосинтезу репресує ферменти цього шляху. Це гарантує, що організм не витрачає енергію і поживні речовини, синтезуючи наявні та непотрібні в даний момент ферменти.

Індукція ферменту концептуально протилежна репресії. При індукції фермент утворюється лише тоді, коли присутній субстрат. Репресія синтезу ферментів зазвичай впливає на біосинтетичні (анаболічні) шляхи, а індукція ферменту зазвичай впливає на ферменти шляхів катаболізму (утилізації).

Для ілюстрації індукції, розглянемо використання цукру лактози як джерела вуглецю та енергії *E. coli*, ферменти якої кодуються *lac*-опероном. На рис. 12.4 показано індукцію *β*-галактозидази – ферменту, який розщеплює лактозу на глюкозу та галактозу. Цей фермент необхідний для росту *E. coli* на лактозі. Якщо лактоза відсутня, фермент не виробляється, але синтез починається майже відразу після додавання лактози. Три гени в *lac*-опероні кодують три білки, включаючи *β*-галактозидазу, які індукуються одночасно при додаванні лактози. Такий тип механізму управління забезпечує синтез специфічних ферментів лише за їх потреби.

Механізми репресії та індукції. Сполука, яка індукує синтез ферментів, називається індуктором; сполука, що репресує синтез ферментів, називається корепресором. Ці речовини, що зазвичай є невеликими молекулами, разом називають ефекторами. Не всі індуктори та корепресори є справжніми субстратами або кінцевими продуктами залучених ферментів. Індукувати або репресувати синтез ферменту можуть структурні аналоги, незважаючи на те, що вони не є субстратами цього ферменту.

Ізопропілтіогалактозид, наприклад, є індуктором *β*-галактозидази, хоча він не може гідролізуватися цим ферментом. У природі, однак, індуктори та корепресори, ймовірно, є нормальними метаболітами клітин. Дослідження утилізації лактози в *E. coli* показали, що справжнім індуктором *β*-галактозидази є не лактоза, а її ізомер алолактоза, яка виробляється з лактози.

Індуктори та корепресори впливають на транскрипцію опосередковано, прив'язуючись до конкретного ДНК-зв'язувального білка, який, у свою чергу, впливає на транскрипцію. Як приклад ферментів, що репресуються, розглянемо аргініновий оперон.

Транскрипція генів аргініну здійснюється, коли клітина потребує аргініну. При цьому оперон транскрибується, оскільки репресор не може зв'язуватися з оператором (рис. 12.5 а).

Але коли аргініну багато, (рис. 12.5 б), він зв'язується зі специфічним білком-репресором синтезу аргініну, який у достатній кількості присутній у клітині. Білок-репресор є алостеричним, тобто його конформація змінюється, коли з ним зв'язується ефекторна молекула. Для оперона *arg*СВН корепресором є амінокислота аргінін, який зв'язується з репресором синтезу аргініну. Зв'язуючи свій ефектор, білок-репресор активується і стає спроможним приєднатися до оператора (специфічна ділянка ДНК поблизу гена промотора).

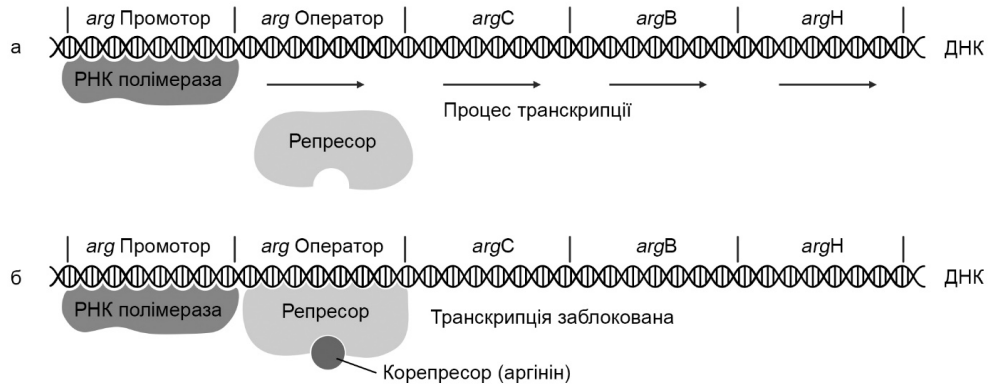


Рис. 12.5. Репресія синтезу ферменту в операні аргініну

Кластер послідовних структурних генів, експресія яких знаходиться під контролем одного оператора, названо опероном. Усі гени в операні транскрибується як одна одиниця, утворюючи єдину мРНК. Відповідно порядку зчитування, оператор розташований за промотором, який ініціює синтез мРНК (рис. 12.5). Якщо репресор зв'язується з оператором, то транскрипція фізично блокується, тому що РНК-полімераза не може зв'язатися з промотором та здійснити зчитування інформації зі структурних генів. Отже, всі поліпептиди, кодовані генами оперону, не можуть бути синтезовані.

Індукцію ферменту також може контролювати репресор. У цьому випадку білок-репресор активний за відсутності індуктора, тому повністю блокує транскрипцію. Коли індуктор додається, він з'єднується з білком-репресором та інактивує його, при цьому репресія подолана і транскрипція продовжується.

Як приклад механізму індукції, розглянемо використання лактози як джерела вуглецю та енергії для *E. coli*, ферменти утилізації якої кодуються *lac*-опероном. На рис. 12.6 показано індукцію *β*-галактозидази – ферменту,

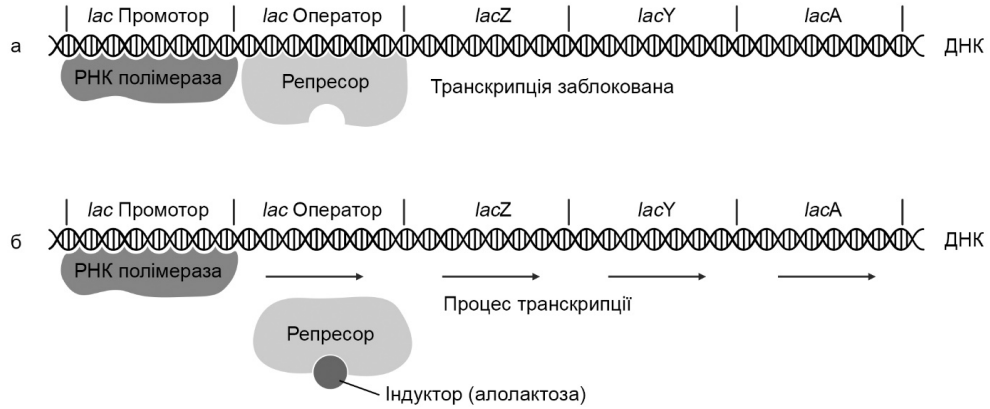


Рис. 12.6. Індукція синтезу ферменту в лактозному операні

який розщеплює лактозу на глюкозу та галактозу. Цей фермент необхідний для росту *E. coli* на лактозі. Якщо лактоза відсутня, фермент не виробляється, але синтез починається майже відразу після додавання лактози (рис. 12.4).

Для lac-оперону цукор алолактоза є індуктором, який зв'язується з репресором оперону лактози. Три гени в *lac*-опероні кодують три білки, включаючи *β*-галактозидазу, які індукуються одночасно при додаванні лактози. Після чого РНК-полімераза транскрибує ДНК і синтезує мРНК цього оперону. Такий механізм управління забезпечує синтез специфічних ферментів лише за їх потреби.

Усі регуляторні системи, в яких використовуються репресори, мають той самий основний механізм – запобігання синтезу мРНК завдяки активності специфічних білків-репресорів, які самі знаходяться під контролем специфічних малих ефекторних молекул. Оскільки роль репресора полягає в припиненні транскрипції, регуляція репресорами називається негативним контролем.

Важливо зазначити, що гени не вмикаються і не вимикаються повністю як вимикачі світла. ДНК-зв'язувальні білки розрізняються за концентрацією та спорідненістю, таким чином, контроль є кількісним. Навіть коли ген «повністю пригнічений», часто зберігається низький рівень його транскрипції.

Такі оперони, що кодують ферменти шляхів катаболізму як *lac*-оперон, регулюються також CAP-білком (catabolite activator protein) та цАМФ. Якщо *E. coli* росте в середовищі з глюкозою та лактозою, то спостерігається явище диауксії. При цьому спочатку бактерії використовують всю глюкозу, а потім після короткої лаг-фази починають споживати лактозу (рис. 12.7).

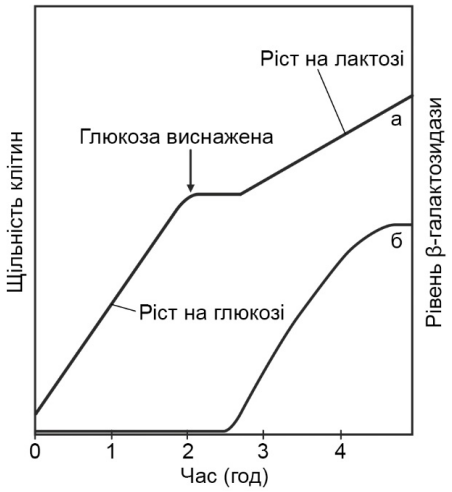


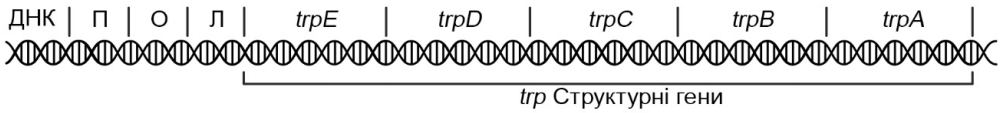
Рис. 12.7. Катаболітна репресія утилізації лактози: а – концентрація клітин, б – активність *β*-галактозидази

Ферменти катаболізму глюкози конститутивні, тому САР-білок на них не впливає. Коли бактерії ростуть на глюкозі, рівень цАМФ падає, що призводить до дезактивації САР-білка, при цьому *lac*-оперон не експресується. Коли глюкоза вичерпується, САР-білок активується і запускається процес індукції синтезу ферментів *lac*-оперону, як описано вище. Такий механізм регуляції назвали катаболітною репресією.

12.5. Механізм атенуації

Бактерії можуть також регулювати транскрипцію за допомогою механізму атенуації. Атенуація є формою контролю транскрипції у бактерій і архей, яка функціонує шляхом передчасного припинення синтезу мРНК. Тобто при атенуації контроль здійснюється уже після ініціації транскрипції, але до її завершення.

Прикладом такого механізму є процес синтезу триптофану у *Escherichia coli* (рис. 12.8). Якщо триптофан у середовищі є, то в клітині є багато триптофаніл-тРНК. Трансляція та транскрипція тісно пов'язані: якщо після транскрипції РНК-полімеразою лідерної послідовності (послідовність нуклеотидів, яка розташована між 5'-кінцем та ініціюючим кодоном, що не транслюється) та кількох сегментів до гена *trpE* не починається трансляція, то РНК-полімераза від'єднується від ДНК. Для продовження транскрипції необхідно, щоб йшла трансляція вже утвореної ділянки мРНК.



Триптофановий лідерний пептид

Met-Lys-Ala-Ile-Phe-Val-Leu-Lys-Gly-**Trp**-**Trp**-Arg-Thr-Ser

Рис. 12.8. Структура оперону триптофану (trp) і лідерного пептиду (Л) триптофану *Escherichia coli*: П – промотор, О – оператор, *trp*E, *trpD, trpC, trpB, trp*A – гени, що кодують ферменти синтезу триптофану

Триптофановий оперон містить структурні гени п'яти білків шляху біосинтезу триптофану плюс звичайний промотор і регуляторні послідовності на початку оперона. Як і багато інших оперонів, триптофановий оперон має більше ніж один тип регулювання. Транскрипція всього триптофанового оперону контролюється білком-репресором і його корепресором (триптофаном). Щоправда, крім промотора та оператора, необхідних для негативного контролю, в опероні є послідовність, яка називається лідерною послідовністю. Вона кодує короткий поліпептид (лідерний пептид), що функціонує як трансляційний барометр. Лідерна послідовність, яка є

«атенуатором» системи атенуації, містить тандемний триптофановий кодон поблизу свого кінця.

Регуляція триптофановим атенуатором полягає в тому, що якщо в клітині багато триптофану, то будуть синтезовані триптофанові тРНК і лідерний пептид. Синтез лідерного пептиду призводить до припинення транскрипції решти trp-оперона, який включає структурні гени для біосинтетичних ферментів. Навпаки, якщо триптофану мало, то багатий триптофаном лідерний пептид не буде синтезований. Коли синтез лідерного пептиду зупиняється через нестачу триптофану, решта оперона транскрибується.

На відміну від ситуації в прокаріотичних клітинах, процеси транскрипції та трансляції в еукаріотів просторово розділені і, тому у еукаріотів відсутній механізм атенуації.

12.6. Регуляторні РНК

Молекули РНК, що не транслюються з утворенням білків, спільно відомі як некодуючі РНК (нкРНК). Вони включають рРНК і тРНК. Некодуюча РНК також включає невеликі молекули РНК, необхідні для процесингу РНК, особливо для сплайсингу (дозрівання мРНК) в еукаріотів. Малі РНК довжиною від 40 до 400 нуклеотидів, що регулюють експресію генів, поширені в прокаріотичних і еукаріотичних клітинах. У *Escherichia coli*, наприклад, ряд малих РНК регулюють кілька аспектів фізіології клітинної відповіді на сигнали навколишнього середовища та контролюють експресію генів.

Малі РНК проявляють свою дію шляхом спаровування основ безпосередньо з іншими молекулами РНК, як правило, в ділянках комплементарної послідовності. Це зв'язування негайно змінює швидкість трансляції цільової мРНК, оскільки рибосома не може транслювати дволанцюгову РНК. Таким чином, малі РНК забезпечують додатковий механізм регулювання синтезу білка, коли його відповідна мРНК вже синтезована. Цей спосіб регуляції широко поширений серед бактерій та вірусів. Такій регуляції може піддаватися реплікація плазмід, синтез білків-поринів, репродукція фага λ.

12.7. Двокомпонентні системи регулювання

Двокомпонентні системи регулювання зазвичай складаються зі специфічного білка – сенсорної кінази, розташованої в цитоплазматичній мембрані та білка-регулятора відповіді, присутнього в цитоплазмі. Кіназа – це фермент, який зазвичай фосфорилює сполуки, використовуючи фосфат з АТФ. Сенсорні кінази приймають сигнал з середовища та фосфорилюються. Потім фосфат переноситься всередині клітини до іншого білка – регулятора відповіді, що зазвичай є ДНК-зв'язуючим білком, який регулює транскрипцію в позитивний або негативний спосіб.

У *Escherichia coli* відомо майже 50 різних двокомпонентних регуляторних систем. Двокомпонентні системи регулюють велику кількість генів у різних бактерій: нітратне та нітритне дихання, реагують на нестачу фосфатів, азоту, осмотичний тиск та ін.

12.8. Регуляція хемотаксису

Значно менше відомо про регуляцію складних процесів у клітині, зокрема таких як хемотаксис або клітинний поділ. Рухливі бактерії та археї реагують на поживні речовини та токсини шляхом руху до атрактантів і від репелентів. Така поведінка називається хемотаксисом. Прокаріотичні клітини занадто малі, щоб відчувати просторові градієнти хімічної речовини, але вони можуть реагувати на часові градієнти, тобто вони можуть відчувати зміну концентрації хімічної речовини в часі, а не абсолютну концентрацію хімічного подразника.

Хемотаксис добре вивчено у бактерій, які використовують модифіковану двокомпонентну регуляторну систему, щоб сприймати часові зміни в концентрації атрактантів та репелентів і обробляти цю інформацію для обрання напрямку обертання джгутиків.

Механізм хемотаксису залежить від каскаду кількох сигнальних білків. Сенсорні білки відчувають атрактанти або репеленти та взаємодіють з цитоплазматичними сенсорними кіназами. Ці сенсорні білки називаються метилакцепторними білками хемотаксису (МАБ). МАБ дозволяють клітині контролювати концентрації різних речовин в часі. Тисячі МАБ групуються, утворюючи великі шестикутні білкові структури хеморецепторів. Залежно від мікроорганізму ці хеморецептори можуть розташовуватися в цитоплазматичній мембрані або цитоплазмі.

МАБ *E. coli* сприймають атрактанти аспартат і мальтозу та репеленти кобальт і нікель та зв'язують їх безпосередньо або опосередковано через взаємодію з периплазматичними зв'язуючими білками, що дозволяє сприймати більш широкий діапазон сигналів.

Центральним у цій регуляторній системі *E. coli* є білок CheY. Він керує напрямком обертання джгутика проти годинникової стрілки, внаслідок чого джгутик, обертаючись, штовхає та плавно рухає бактерію. Фосфорильований білок CheY-P взаємодіє з двигуном джгутика, але викликає обертання його за годинниковою стрілкою, і тоді джгутик, обертаючись, тягне бактерію, яка рухається ривками шляхом тамблінгу.

12.9. Контроль транскрипції в архей

Існує два альтернативні підходи до регулювання активності РНК-полімерази. Стратегія, яка поширена в прокаріотів, полягає у використанні ДНК-зв'язуючих білків, які або блокують активність РНК-полімерази (білки-репресори) або стимулюють активність РНК-полімерази (білки-активатори).

Альтернативна стратегія, поширена в еукаріотів, полягає в координації зв'язування кількох білків з ДНК для взаємодії з РНК-полімеразою. Оскільки ці білки впливають на швидкість транскрипції генів, вони також вважаються факторами транскрипції.

Враховуючи більшу загальну подібність механізмів транскрипції в архей та еукарій, дивним є те, що система регулювання транскрипції в архей більше нагадує таку в бактерій. Археї мають як позитивні, так і негативні системи контролю. Білки-репресори архей або блокують зв'язування самої РНК-полімерази, або блокують зв'язування ТАТА-зв'язувального білка і фактора транскрипції В – білків, які необхідні для зв'язування РНК-полімерази з промотором архей.

Поширена в архей стратегія полягає у використанні ДНК-зв'язуючих білків, які або блокують транскрипцію РНК-полімерази (білки-репресори) або стимулюють активність РНК-полімерази синтезу амінокислоти глутаміну. Наприклад, у випадку, коли органічний азот є в великій кількості в клітинах морських метаногенних архей *Methanococcus maripaludis*, білок NrpR (евріархейний транскрипційний репресор), репресує гени фіксації молекулярного азоту.

Якщо рівень органічного азоту стає граничним і обмежує ріст мікроорганізму, α-кетоглутарат накопичується в клітині, оскільки він є основним акцептором аміаку під час асиміляції азоту. Підвищений рівень α-кетоглутарату сигналізує клітині про необхідність активувати додаткові шляхи, такі як фіксація азоту.

α-Кетоглутарат при підвищеній його концентрації діє як індуктор зв'язування з білком NrpR. У цьому стані NrpR втрачає спорідненість до промоторної області своїх цільових генів і більше не блокує транскрипцію з промоторів. У цьому відношенні білок NrpR нагадує ДНК-звязувальний білок бактерій, що репресує експресію ферментів лактозного оперону.

12.10. Обмін сигналами між клітинами

Бактерії та археї в популяції здатні спілкуватися між собою шляхом синтезу та передачі позаклітинних молекул – пептидів або непептидних органічних молекул. Накопичення цих сигнальних молекул призводить до скоординованої групової поведінки, наприклад, утворення біоплівки. Ступінь щільності клітин, що виробляють специфічні сигнальні молекули в локальному середовищі, зрештою контролює їх поведінку.

Це явище називається *quorum sensing* – відчуття кворуму («кворум» означає «достатнє число»). Це засіб виявляти щільність популяції клітин та разом реагувати на зміни умов навколишнього середовища. Відчуття кворуму – це регуляторний механізм, який оцінює щільність популяції. Багато бактерій використовують цей підхід, щоб забезпечити достатню кількість клітин їх виду для ефективної дії.

Наприклад, патогенна бактерія, яка виділяє токсин, не матиме ефекту як одна клітина, однак якщо в популяції присутня значна кількість клітин, то скоординована експресія токсину може викликати токсичну дію на клітини хазяїна та вивільняти ресурси, які збудник може використовувати для підтримки свого росту.

Відчуття кворуму широко поширене серед грамнегативних, але також зустрічається у грампозитивних бактерій і деяких архей. Мікроорганізми кожного виду, які використовують механізм quorum sensing, синтезують певні сигнальні молекули – автоіндуктори.

Автоіндуктори вільно дифундують з клітини, завдяки чому досягають високих концентрацій якщо поруч розташовано багато клітин, які синтезують той самий автоіндуктор. У цитоплазмі аутоіндуктор зв'язується зі специфічним білком-активатором транскрипції або двокомпонентною сенсорною кіназою та запускає транскрипцію відповідних генів.

Відомо кілька різних класів аутоіндукторів, першим з яких ідентифіковано ацилгомосеринлактон (АГЛ) (рис. 12.9). У різних видів грамнегативних бактерій знайдено кілька різних АГЛ з ацильними групами різної довжини. Різні грамнегативні бактерії виробляють аутоіндуктори, які сприймаються бактеріями різних видів, що залучає широке коло бактерій до міжвидової комунікації.

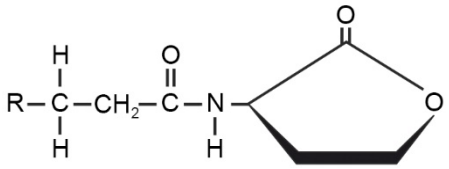


Рис. 12.9. Загальна структура ацилгомосеринлактону.
R – алкільна група (C1-C17)

Феномен відчуття кворуму було виявлено як механізм, який регулює випромінювання світла фотобактеріями, зокрема морською бактерією *Aliivibrio fischeri*. Світло генерується ферментом люциферазою. *lux*-Оперони кодують білки, необхідні для біолюмінесценції, що знаходяться під контролем білка активатора LuxR. *lux*-Оперон індукується при високій концентрації специфічного для *A. fischeri* АГЛ – N-3-оксогексаноілгомосеринлактону. При цьому білок-активатор LuxR зв'язується з *lux*-опероном і активує його транскрипцію.

Відчуття кворуму також спостерігається у мікробних еукаріотів. Наприклад, дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* продукують як аутоіндуктори специфічні ароматичні спирти, що контролюють перехід між ростом дріжджів у формі окремих клітин та філаментів. Подібні переходи спостерігаються також в інших диморфних грибів, наприклад, у дріжджів роду *Candida*.

12.11. Контроль факторів вірулентності

Відчуття кворуму контролює також деякі гени патогенних бактерій. Наприклад, бактерії харчового патогену *E. coli* O157:H7, що продукує токсин Шига, виробляють ацилгомосеринлактон під назвою AI-3, який індукує гени вірулентності. Збільшення популяції *E. coli* в кишечнику призводить до продукції бактеріями автоіндуктора AI-3, а клітинами хазяїна – утворення гормонів стресу адреналіна та норадреналіна.

Усі три сигнальні молекули зв'язуються з двома сенсорними кіназами в цитоплазматичній мембрані *E. coli*, що призводить до фосфорилювання та активації двох білків-активаторів транскрипції. Ці білки активують транскрипцію генів, що кодують функції рухливості, секрецію токсину та синтез білків, що вражають епітелій кишечника хазяїна. Вивільнені за лізису сполуки можуть використовуватися збудником як поживні речовини. Це рідкісний приклад системи, що сприймає як бактеріальні, так і еукаріотичні хімічні сигнали, які регулюють експресію генів.

Патогенез грампозитивної бактерії *Staphylococcus aureus* вимагає серед багатьох інших речей виробництва та секреції малих позаклітинних пептидів, які пошкоджують клітини хазяїна, або перешкоджають імунній системі хазяїна. Гени кодування цих факторів вірулентності знаходяться під контролем системи відчуття кворуму, яка використовує автоіндукуючий пептид (АІП), що секретується за межі клітини. Зі збільшенням щільності клітин *S. aureus* зростає також концентрація АІП. Цей пептид через ряд подій, повязаних з фосфорилюванням, збільшує транскрипцію генів, що кодують систему передачі сигналу, а також молекулу РНК, яка контролює виробництво вірулентних білків. Деякі еукаріоти виробляють молекули, що спеціально заважають сприйняттю бактеріального кворуму.

12.12. Регулювання поділу клітини

Процес поділу клітини, тобто від моменту утворення нової клітини до наступного поділу, найбільш вивчені у *E. coli*. Молода клітина, що росте з постійною швидкістю, подвоюється в об'ємі, а потім ділиться на дві клітини одного розміру шляхом поперечного поділу. Так як кожна дочірня клітина має хоча б одну копію генетичного матеріалу, реплікація ДНК і клітинний поділ повинні бути тісно скоординовані. За штучного інгібування реплікації ДНК поділ клітини також блокується. При цьому клітини продовжують подовжуватись, утворюючи довгі філаменти.

У *E. coli* при температурі 37 °С поділ зазвичай відбувається через 20 хв після завершення реплікації. За цей час генетичний матеріал має бути розподілений між дочірніми клітинами. Переміщення копій ДНК здійснюється за участі певних білків, що локалізовані на полюсах клітини та завдяки росту мембрани та клітинної стінки.

Ініціація реплікації ДНК вимагає, щоб сайт початку реплікації приєднав кілька молекул білка DnaA. Активна форма цього білка пов'язана з використанням АТФ, тому регулювання ініціації може здійснюватися взаємопереходом DnaA-АТФ та DnaA-АДФ. Наступний цикл реплікації починається не відразу, оскільки батьківська нитка ДНК метилюється відразу після реплікації та стає неактивною.

Отже, для утворення перегородки та поділу необхідні як завершення реплікації ДНК, так і досягнення порогового об'єму клітини. Для ініціації утворення перегородки важливою є наявність FtsZ-білка. Цей білок між поділами рівномірно розподілений у цитоплазмі клітини, а з початком поділу він формує z-кільце у місці утворення прегородки.

Необхідна також участь білків, що здійснюють трансглікозилювання та транспептидацію в процесі синтезу пептидоглікану при створенні нової клітинної стінки. Регуляція процесів бактеріального клітинного циклу дуже складна та включає кілька взаємодіючих регуляторних механізмів.

Таким чином, для існування та функціонування живих клітин важлива як регуляція активності окремих шляхів метаболізму, так і координація діяльності цих шляхів. Мікроорганізмам необхідно ефективно регулювати обмін для швидкого підлаштування життєдіяльності до нових умов та для підтримки балансу між енергогенеруючими та синтетичними процесами в клітині.

Питання для самостійного контролю

1. У чому сенс фенотипової мінливості?
2. Яке значення процесів регуляції у житті мікробної клітини?
3. Назвіть основні способи регуляції мікробного метаболізму.
4. Який спосіб регулювання дозволяє швидко змінювати шлях метаболізму?
5. Яким чином здійснюється регуляція на рівні активності ферментів?
6. Поясніть чому активація ферментів та індукція синтезу ферментів працюють на шляхах катаболізму, а інгібування активності ферменту та репресія синтезу – на шляхах анаболізму.
7. Яким чином здійснюється регуляція на рівні синтезу ферментів?
8. У чому схожість і відмінність молекулярних механізмів індукції та репресії синтезу ферментів?
9. Охарактеризуйте доцільність для мікроорганізмів механізму катаболітної репресії?
10. Яка роль лідерного пептиду в регуляторному механізмі атенуації?
11. Охарактеризуйте механізм відчуття кворуму (quorum sensing)?

РОЗДІЛ 13
ГЕНОМ І ГЕНОТИПОВА МІНЛИВІСТЬ

Генетика мікроорганізмів містить універсальні теми генетики всіх організмів, динамічно розвивається, породила багато відомих сьогодні загальних генетичних концепцій та відкрила механізми горизонтального обміну генетичною інформацією.

Різноманітність і дивовижна здатність бактерій виживати в умовах навколишнього середовища, що постійно змінюються, і безліч стресових факторів контролюється складом їх генів. Розуміння різноманітних механізмів, за допомогою яких бактерії та археї обмінюються генами, допомогло зрозуміти як мікроорганізми можуть демонструвати велику різноманітність і зберігатися в мінливому середовищі існування, де інші форми життя не можуть існувати.

Обмін генами між клітинами разом із генетичними змінами, які виникають внаслідок випадкових подій у генетичному плані клітини, відбуваються часто та надають вибіркові переваги, які зрештою сприяють виживанню мікроорганізмів та їх генетичній різноманітності.

У цьому розділі розглянемо структуру геномів бактерій і архей, зміни, які відбуваються в геномі, що спричинені випадковими помилками в реплікації ДНК або пошкодженням ДНК, а також процеси перенесення генів від однієї клітини до іншої. Крім мутаційних процесів та генетичних процесів обміну, що лежать в основі мікробної різноманітості та адаптації до середовища проживання, мікроорганізми мають також механізми підтримки геномної стабільності, які разом забезпечують еволюцію мікроорганізмів та їх конкурентність у природі.

13.1. Генетичні елементи

Геном – це загальна сума генетичного матеріалу (ДНК) в клітині. Хоча більша частина геному існує в хромосомах, генетичний матеріал міститься також у нехромосомних генетичних елементах. Наприклад, бактерії мають маленькі додаткові фрагменти ДНК – плазміди та транспозони, а мітохондрії та хлоропласти еукаріотів забезпечені власними функціональними хромосомами. Геноми клітин складаються виключно з ДНК, в той час як віруси містять або ДНК, або РНК як основний генетичний матеріал. Незважаючи на те, що конкретний геном індивідуума або організму унікальний, загальна схема структури та функції нуклеїнової кислоти подібна для всіх організмів і вірусів.

13.1.1. Хромосома

Хромосома – це окрема структура клітини, що складається з акуратно упакованої молекули ДНК. Хромосоми еукаріотів і прокаріотів відрізняються кількома аспектами. Хромосома еукаріотів складається з молекули

ДНК та білків гістонів, шо щільно з'єднані з нею, тоді як бактеріальна хромосома конденсується та закріплюється в пакеті за допомогою іншого типу білків. Хромосоми еукаріотів розташовані в ядрі та варіюють кількісно від кількох до сотень. Вони мають лінійну форму та можуть зустрічатися парами (диплоїдні) або поодиноко (гаплоїдні).

Більшість бактерій і архей мають одну кільцеву хромосому, яка містить усі (або більшість) генів організму. Хоча одна хромосома є правилом для прокаріотичних клітин, спостерігаються винятки, коли деякі клітини містять дві або навіть три хромосоми. Еукаріотичні геноми, навпаки, складаються з двох або більше хромосом, що містять лінійну ДНК. Геноми вірусів складаються з ДНК або РНК і можуть бути одно- або дволанцюговими, лінійними або кільцевими.

Хромосома прокаріотів представлена молекулою (молекулами) ДНК, укладеною в компактну структуру. Локалізована в обмеженій ділянці цитоплазми, що не має власної ядерної мембрани, вона називається нуклеоїдом (рис. 13.1).

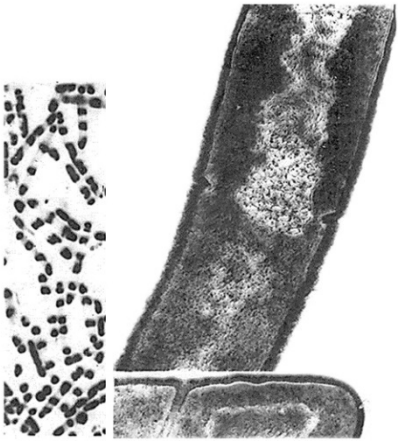


Рис. 13.1. Нуклеоїди *Clostridium bifermentans*

Так, хромосома бактерій *E. coli* має форму нитки, замкнутої в кільце (рис. 13.2). Ця замкнута в кільце молекула ДНК містить кілька тисяч генів, розташованих лінійно.

Нуклеоїд займає значну частину бактеріальної клітини. При мікроскопуванні ультратонких зрізів бактерій в електронному мікроскопі нуклеоїд нагадує клубок мотузки з безлічі ниток. Повністю «складений» нуклеоїд є достатньо компактним утворенням. Нитка хромосомної ДНК у бактерій *E. coli* має лінійний розмір 1,6 мм, а упакований нуклеоїд – 1 мкм.

Стабілізаційну роль такої організації визначають специфічні білки, які упаковують ДНК шляхом її спіралізації (скручування). Вони подібні за складом амінокислот та іншими характеристиками з гістонами еукаріотів, мають порівняно невеликі розміри та здебільшого відносяться до основних

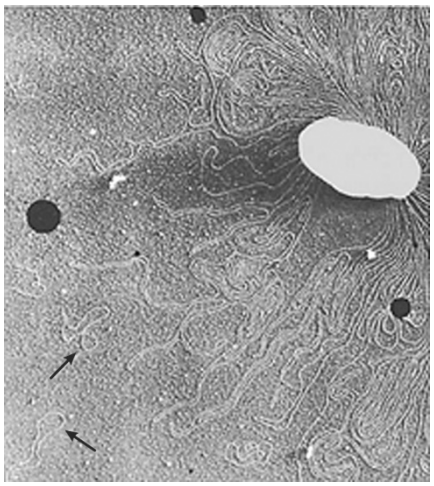


Рис. 13.2. Бактеріальна хромосома та плазміда (див. стрілки) під електронним мікроскопом

білків. Схожі білки, які сприяють «упаковці» ДНК, виділені з самих різних мікроорганізмів, зокрема й архей. Зв'язуючись із ДНК, вони змінюють конформацію її витків. Важливу роль як для збереження цілісності структури, так і функціонування геному бактерій грає прикріплення хромосоми до цитоплазматичної мембрани.

Більшість прокаріот – гаплоїдні організми. Кожна клітина бактерій і архей, як правило, містить одну хромосому, але залежно від умов культивування в клітині може бути кілька копій однієї й тієї ж хромосоми. Так, у *Azotobacter chroococcum* в експоненційній фазі росту на одну клітину припадає 20–25 копій хромосоми.

У різних видів бруцел – *Rhodobacter sphaeroides, Agrobacterium tumefaciens, Leptospira interrogans* – клітини мають по дві хромосоми, що різняться між собою розміром, а *Burkholderia cepacia* – навіть три хромосоми.

Хромосомна ДНК бактеріальної клітини, як правило, замкнена в кільце, однак хромосоми *Borrelia burgdorferi,* збудника кліщового спірохетозу та деяких видів актиноміцетів і фітопатогенних бактерій *Rhodococcus fascians* – лінійні.

Тисячі геномів різних видів бактерій і архей повністю секвеновано і таким чином виявлено кількість і місцезнаходження генів, якими вони володіють. Генетична карта хромосоми добре вивченого штаму *Escherichia coli* (4,6 млн п.н.) містить 4288 можливих генів, з яких 88% кодують білки. Приблизно 1% геному кодує тРНК і рРНК, а решта генів кодують регуляторні послідовності, які можуть або не можуть транскрибуватися, та послідовності, які мають інші функції. Розміри хромосомної ДНК у різних видів бактерій суттєво відрізняються. В однієї з найменших за розміром бактерії

Mycoplasma genitalium, що викликає у людей уретрити, хромосомна ДНК дорівнює 580 т.п.н.

Перша послідовність бактеріального геному була опублікована в 1995 році. Розшифровано послідовності ДНК понад 435 000 бактерій, 5300 архей і 22 000 вірусів, 50 000 еукарій (https://gold.jgi.doe.gov). У таблиці 13.1 наведено геноми деяких бактерій і архей. Геноми багатьох еукаріотичних організмів (табл. 13.2) також секвеновані, включаючи гаплоїдний геном людини, який містить приблизно 3,2 млрд п.н. (21 000 генів, що кодують білки).

Найменші клітинні геноми належать бактеріям *Tremblaya* і *Hodgkinia* (близько 140 т.п.н.) та *Nasuia deltocephalicola* (120 т.п.н.), які паразитують або є ендосимбіотами комах (табл. 13.1). Через малий розмір геному такі симбіонти повністю метаболічно залежать від клітин-хазяїнів.

Серед архей найменший геном має *Nanoarchaeum equitans* – гіпертермофіл і паразит іншого гіпертермофіла – *Ignicoccus*. У *N. equitans* відсутні практично всі гени, які кодують метаболічні білки.

Деякі збудники, такі як *Mycobacterium tuberculosis,* мають досить великі геноми (більше 4,4 млн п.н.), а геноми більшості патогенів людини, такі як мікоплазма, хламідія та рикетсія менші ніж найбільший відомий вірусний геном пандоравірусу (2,5 млн п.н.).

Деякі бактерії мають такі ж великі геноми, як і окремі еукаріотичні мікроорганізми. Один з найбільших за розміром відомих геномів бактерій є в міксобактерій *Sorangium cellulosum*. Маючи трохи менше 14,8 млн п.н. на одну кільцеву хромосому, *S. cellulosum* має більше ДНК, ніж деякі еукаріоти, включаючи дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* (12,1 млн п.н.) і патогенні найпростіші *Cryptosporidium* і *Giardia* (табл. 13.2).

Геном *S. cellulosum* складається приблизно з 10,5% некодуючої ДНК і 11 559 генів, які кодують білки, що майже втричі більше, ніж геном *E. coli*. На відміну від бактерій, найбільші геноми знайдені у представників видів архей, мають лише близько 5 млн п.н. (табл. 13.1).

Компактні геноми бактерій і архей відрізняються від геномів еукаріотів, які зазвичай містять набагато більше ДНК, ніж потрібно для кодування білків, необхідних для функціонування клітини. Ця «додаткова» ДНК в еукаріотах присутня як вставна ДНК між кодуючими послідовностями або як повторювані послідовності, що повторюється сотні разів.

Найбільша різниця між еуаріотами та прокаріотами в організації спадкового апарату – оточене мембраною ядро в еукарій, наявність гістонів та упаковка ДНК у нуклеосоми. У бактерій не знайдені поки що гістони та нуклеосоми, тому упаковка ДНК у них, ймовірно, відбувається інакше. В той час як деякі археї мають гістоноподібні білки та стабільні нуклеосоми, деякі одноклітинні еукаріоти позбавлені того та іншого. Таким чином, на рівні організації хромосом відмінності між про- та еукаріотами не є принциповими.

Таблиця 13.1

Хромосоми деяких бактерій і архей

Мікрорганізм	Спосіб життя	Розмір (млн п.н.)	ВРЗ	Особливості
Bacteria				
Nasuia deltocephalinicola	Е	0,112	137	Дегенеративний ендосимбіонт комах
Tremblaya princeps	Е	0,139	121	Дегенеративний ендосимбіонт борошнистого червця
Hodgkinia cicadicola	Е	0,144	169	Дегенеративний ендосимбіонт цикади
Mycoplasma genitalium	П	0,580	525	Найменший несимбіотичний бактеріальний геном
Rickettsia prowazekii	П	1,112	834	Внутрішньоклітинний паразит, збудник епідемічного висипного тифу
Treponema pallidum	П	1,138	1 041	Спірохета, збудник сифілісу
Methylophilaceae, штам HTCC2181	ВЖ	1,304	1 354	Морський метилотроф, найменший геном вільноживучої бактерії
Thermotoga maritima	ВЖ	1,861	1 877	Гіпертермофіл
Deinococcus radiodurans	ВЖ	3,284	2 185	Радіаційно стійкий, багатохромосомний
Bacillus subtilts	ВЖ	4,215	4 100	Грампозитивна генетична модель
Mycobacterium tuberculosis	П	4,412	3 924	Збудник туберкульозу
Escherichia coli K-12	ВЖ	4,639	4 288	Грамнегативна генетична модель
Escherichia coli O157:H7	ВЖ	5,594	5 361	Ентеропатогенний штам
Bradyrhizobium japonicum	ВЖ	9,106	8 317	Азотфіксатор, бульбочки сої
Sorangium cellulosum	ВЖ	14,782	11 559	Утворює багатоклітинні плодові тіла
Minicystis rosea	ВЖ	16,041	14 018	Утворює багатоклітинні плодові тіла
Archaea				
Nanoarchaeum equitans	П	0,491	552	Найменший несимбіотичний клітинний геном
Methanocaldococcus jannaschii	ВЖ	1,665	1 738	Метаноген, гіпертермофіл
Pyrococcus horikoshii	ВЖ	1,738	2 061	Гіпертермофіл
Sulfolobus solfataricus	ВЖ	2,992	2 977	Гіпертермофіл, сірчаний хемолітотроф
Haloarcula marismortui	ВЖ	4,275	4 242	Екстремальний галофіл, має бактеріородопсин
Methanosarcina acetivorans	ВЖ	5,751	4 252	Метаноген, використовує ацетат

Примітка: Е – ендосимбіонт; П – паразит; ВЖ – вільноживучий, ВРЗ – відкрита рамка зчитування. Інформацію про геноми прокаріотів можна знайти на ttps://gold.jgi.doe.gov.

Таблиця 13.2

Хромосоми деяких еукарій

Організм	Спосіб життя	Розмір геному (млн п.н.)	Гаплоїдні хромосоми	ВРЗ (тис.)	Коментар
Нуклеоморфа *Bigelowiella natans*	Е	0,37	3	0,33	Дегенеративне ендосимбіотичне ядро
Encephalitozoon intestinalis	П	2,3	11	1,8	Найменший відомий еукаріотичний геномний патоген
Cryptosporidium parvum	П	9,1	8	3,8	Паразитичні найпростіші
Plasmodium falciparum	П	23	14	5,3	Злоякісна малярія
Saccharomyces cerevisiae	ВЖ	12,1	16	5,4	Дріжджі, модель еукаріотів
Ostreococcus tauri	ВЖ	12,6	20	8,2	Морська зелена водорость, найменший вільноживучий еукаріот
Aspergilus nidulans	ВЖ	30	8	9,5	Нитчатий гриб
Giardia lamblia	П	12	5	9,7	Джгутикові найпростіші, викликають гострий гастроентерит
Drosophila melanogaster	ВЖ	180	4	13,6	Дрозофіла, модельний організм для генетичних досліджень
Caenorhabditis elegans	ВЖ	97	6	19,1	Круглий черв, модель розвитку тварин
Mus musculus	ВЖ	2 500	23	25,0	Миша, модель ссавця
Homo sapiens	ВЖ	2 850	23	25,0	Людина
Arabidopsis thaliana	ВЖ	125	5	26,0	Генетична модель рослини
Paramecium tetraurelia	ВЖ	72	>50	40,0	Війчасті найпростіші
Pinus taeda	ВЖ	20 000	19	50,0	Сосна
Trichomonas vaginalis	П	160	6	60,0	Джгутикові, патогени людини

Примітка: Е – ендосимбіонт; П – паразит; ВЖ – вільноживучий, ВРЗ – відкрита рамка зчитування. Усі дані наведено для гаплоїдних ядерних геномів

Основнм генетичним елементом у прокаріотичній клітині є хромосома, однак інші генетичні елементи відіграють важливу роль в адаптації до змін навколишнього середовища та еволюції мікроорганізмів, зокрема: плазміди, профаги (інтегровані вірусні геноми), IS-елементи, транспозони, інтегрони та геноми органел (в еукаріотів).

13.1.2. Плазміди

У багатьох мікроорганізмів на додаток до основної хромосоми виявлено плазміди. Це кільцеві дволанцюгові молекули ДНК (рис. 13.2), які можуть існувати та реплікуватися як незалежно від бактеріальної хромосоми, так і бути інтегрованими в неї. Плазміда не є обов'язковим для клітини елементом, хоча може надавати їй певні переваги. Відомо, що плазміди можуть нести гени стійкості до антибіотиків, важких металів, різних лікарських препаратів, гени факторів патогенності; гени, що визначають додаткову метаболічну активність.

Відомо більше тисячі різних плазмід. Лише з бактерій *E. coli* виділено 300 різних плазмід. Практично всі плазміди складаються з дволанцюгової ДНК та існують у цитоплазмі в формі вільної ДНК. Більшість плазмід кільцеві, але є багато лінійних. Вони різні за розміром, приблизно 1–400 т.п.н. Типові плазміди становлять менше 5% розміру хромосоми. Деякі бактерії містять кілька різних плазмід. Крім того, різні плазміди можуть бути присутніми в різній кількості копій. Наприклад, деякі плазміди можуть бути присутніми лише в одній або кількох копіях на клітинку, тоді як інші – в кількості понад 100 копій.

Ферменти, які копіюють хромосомну ДНК, також реплікують і плазміди. Хоча плазміди, за визначенням, не кодують істотні функції для хазяїна, вони можуть нести гени, які глибоко впливають на фізіологію клітини. Серед найбільш поширених і добре вивчених груп плазмід є плазміди резистентності (R-плазміди). Вони забезпечують стійкість до антибіотиків або інших інгібіторів росту. В одній R-плазміді можуть бути закодовані кілька генів резистентності до різних антибіотиків. Наприклад, плазміда R100 (рис. 13.3) кодує стійкість до сульфаніламідів, стрептоміцину, спектиноміцину, фузидової кислоти, хлорамфеніколу та тетрацикліну, а також до ртуті.

Стійкість хвороботворних бактерій до антибіотиків має значне лікувальне значення. У патогенних бактерій виявляють різні кодовані плазмідами фактори вірулентності, які беруь участь у процесі інфекції. Наприклад, здатність збудника прикріплюватися до певних тканин хазяїна, колонізувати їх, виробляти токсини, ферменти та інші молекули інвазивності, які завдають шкоду хазяїну, іноді кодуються плазмідами.

Деякі бактерії виробляють бактеріоцини, що пригнічують або вбивають бактерії близькоспоріднених видів (або різних штамів одного виду). Гени, що кодують ці антибіотики білкової природи та інші білки, які захищають мікроорганізм, зазвичай, знаходяться в плазмідах.

У деяких випадках плазміди кодують фундаментальні властивості бактерій. Наприклад, здатність бактерій *Rhizobium* до утворення азотфіксуючих бульбочок на коренях рослин вимагає певних функцій, закодованих у плазміді. Інші плазміди надають особливі метаболічні властивості. На-

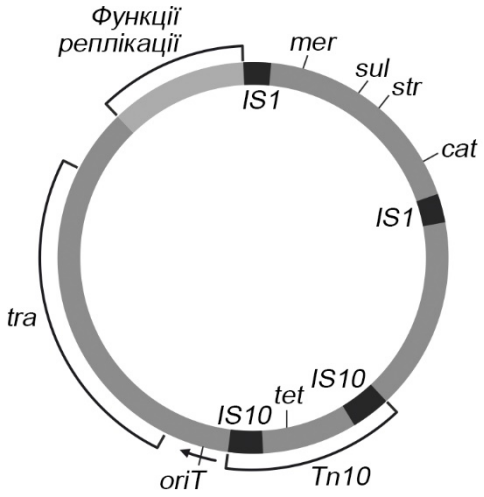


Рис. 13.3. Генетична карта плазміди резистентності R100.
Позначено розташування основних генів стійкості до антибіотиків та інших ключових функцій: mer – резистентність до йонів ртуті; sul – стійкість до сульфаніламіду; str – резистентність до стрептоміцину; cat – резистентність до хлорамфеніколу; tet – резистентність до тетрацикліну; oriT – початок кон'югативного переносу; tra – функція переносу, IS1 – інвертований елемент, Tn10 – транспозон.

приклад, здатність розкладати вуглеводні або токсичні забруднювачі, такі як поліхлоровані біфеніли та інші пестициди, часто кодується плазмідою. Крім того, F-плазміди відіграють вирішальну роль у горизонтальному процесі перенесення генів при кон'югації.

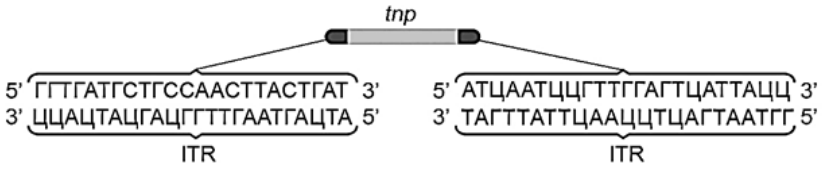
13.1.3. Мобільні генетичні елементи

Двома основними типами мобільних елементів у бактерій є інсерційні послідовності (IS) і транспозони (Tn). Така мобільна ДНК відноситься до окремих сегментів ДНК, які переміщуються як одиниці з одного місця в інше в межах іншої молекули ДНК. Це дискретні сегменти ДНК, які можуть переміщуватися з одного місця в інше. Мобільні елементи завжди вставлені в іншу молекулу ДНК, таку як плазміда, хромосома або вірусний геном. Вони не мають власного джерела реплікації, натомість реплікуються, коли реплікується молекула ДНК хазяїна, в яку вони вставлені.

Транспозовані елементи переміщуються шляхом транспозиції – процесу, важливому як для перебудови геному, так і для генетичного аналізу. Транспозовані елементи надзвичайно численні, широко поширені в природі та присутні в геномах усіх трьох доменів життя, а також у багатьох вірусах і плазмідах. Інсерційні послідовності та транспозони мають дві важливі спільні риси: вони несуть гени, що кодують транспозазу – фермент,

необхідний для транспозиції, і мають короткі інвертовані кінцеві повтори на своїх кінцях, які також необхідні для транспозиції.

IS-елементи – це прості мобільні елементи – фрагменти дволанцюгової ДНК розміром від 200 до 2000 п.н. (IS2 має 1327 п.н.), які складаються з гена транспозази (*tnp*), фланкованого інвертованими транспозованими повторами (inverted transposed repeats – ITR), необхідного для переміщення або транспозиції (рис. 13.4). Транспозаза – це фермент, який розпізнає інвертовані повтори і каталізує негомологічну рекомбінацію, що дозволяє послідовностям вставки переміщуватися між різними сегментами ДНК за допомогою механізму «вирізання та вставляння». Якщо в геномі присутні кілька інсерційних послідовностей, ці елементи можуть генерувати хромосомні перебудови, такі як делеції, інверсії або транслокації. Інвертовані повтори (інвертований – значить перевернутий, тобто нуклеотиди знаходяться на різних кінцях перевернуто або протилежно орієнтовані) розташовані на кінцях IS-елементів. У різних IS-елементів довжина кінцевих повторів ITR варіює від 10 до 50 п.н. Інвертовані повтори також беруть участь у транспозиції. Схематично будову IS-елементу можна зобразити так:



Розрізняють кілька типів IS-елементів, які відрізняються за довжиною та структурою кінцевих повторів. Вони є нормальними компонентами бактеріальних хромосом та плазмід. IS-елементи можуть переміщатися з однієї ділянки геному в іншу, зокрема з бактеріальної хромосоми в плазміду і, навпаки, або з плазміди до плазміди, включаючись до різних ділянок геному. При переміщеннях вони можуть вбудовуватися в межах одного гена та інактивувати або змінювати його регуляцію.

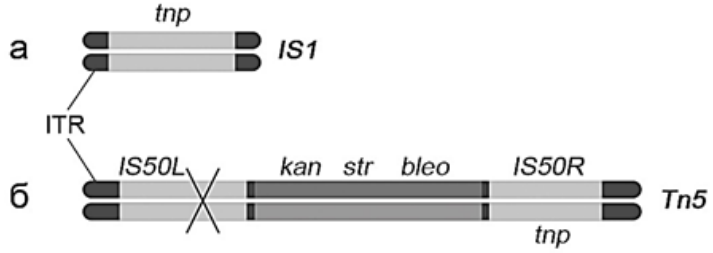


Рис. 13.4 Карти інвертованих елементів IS1 (а) і Tn5 (б): *tnp* – ген кодування транспозази; *kan, str, bleo* – гени стійкості до канаміцину, стрептоміцину, блеоміцину; IS50L, IS50R – IS-елементи

Відомо кілька сотень різних IS-елементів. Вони знаходяться в хромосомах і плазмідах як бактерій, так і архей, а також у деяких бактеріофагах. Окремі штами одного виду бактерій відрізняються за кількістю та розташуванням IS-елементів, які вони містять. Наприклад, геном одного штаму *Escherichia coli* містить п'ять копій IS2 і п'ять копій IS3. Багато плазмід, такі як F-плазміда, також несуть IS-елементи.

Транспозони – складні генетичні елементи, що переміщуються між хромосомою та плазмідами як IS-елементи. Від IS-елементів вони відрізняються тим, що крім гена транспозази та транспонованих інвертованих повторів (ITR) вони містять структурні гени, що визначають функції, які не мають відношення до процесу транспозиції (переміщення), тобто відповідальні за прояв будь-якої фенотипової ознаки (рис. 13.4).

Транспозони можуть контролювати резистентність до антибіотиків та йонів важких металів, здатність до катаболізму лактози, рафінози, деградації толуолу, синтезу ентеротоксинів тощо, тому їх легше виявити, ніж IS-елементи.

Довжина транспозонів понад 2000 п.н. Як і IS-елементи, транспозони мають кінцеві повтори (ITR). Tn5 є складним транспозоном 5,7 т.п.н. містить послідовності вставки IS50L і IS50R на лівому і правому кінцях, відповідно (рис. 13.7). IS50L не здатний до незалежного транспортування, оскільки має нонсенс-мутацію, позначену хрестиком, у гені транспозази. Гени *kan, str* і *bleo* кодують стійкість до антибіотиків канаміцину, стрептоміцину та блеоміцину.

Інтегрони. Інтегрон – це потужна генетична система, яка здатна захоплювати, накопичувати та перегруповувати гени, розташовані в касеті. Інтегрони містять ген інтегрази, фланкований промотором, і сайт рекомбінації, який містить прямі повтори. Типово інтегрони містять генну касету, що складається з одного або кількох генів, фланкованих рядом відповідних сайтів рекомбінації. Промотор інтегрону керує експресією генів у касеті. Інтеграза каталізує сайт-специфічне переміщення (рекомбінацію) генів (ДНК) по інтегрону.

Таким чином, послідовності ДНК, фланковані відповідними сайтами рекомбінації, можуть бути вставлені або вирізані з генної касети інтегрону та перенесені. Інтегрони часто зустрічаються на інших мобільних елементах, таких як плазміди або транспозони. Цей механізм полегшує швидке отримання та перебудову генів в геномі та надає мікроорганізмам здатність до швидкої адаптації в умовах мінливого середовища.

13.2. Мутації

Геноми усіх організмів містять певну послідовність нуклеотидів, їх генетичний план. Мутації – це зміни базової послідовності нуклеотидів генетичного апарату, які передаються у спадок від материнської клітини до

клітин-нащадків і можуть привести до зміни властивостей організму. Деякі мутації – корисні, деякі – шкідливі, але більшість є нейтральними та не мають ніякого ефекту.

Мутації бувають *спонтанні* та *індуковані*. Мутації, що виникають в популяції бактерій без цілеспрямованого експериментального втручання, називають *спонтанними*. Як правило, спонтанні мутації можна пояснити випадковими помилками при реплікації ДНК. Наприклад, тімін, який зазвичай спарюється з аденіном, може перейти в енольную форму і утворити водневі зв'язки з гуаніном. У результаті в синтезованій знову молекулі ДНК замість пари Т-А з'являється пара Г-Ц. Виникають такі мутації досить рідко. У середньому частота спонтанних мутацій становить 10^{-4}–10^{-10}, тобто зміненою виявляється одна клітина на 10^4–10^{10} клітин.

Індуковані мутації виникають за допомогою впливу тих чи інших чинників – мутагенних агентів, які значно підвищують частоту виникнення мутацій. Мутагенами можуть бути хімічні, фізичні та біологічні агенти, що діють на генетичний апарат бактерій (табл. 13.3). До них відносяться УФ-промені, іонізуюче випромінювання, азотиста кислота, нітрозогуанідин, аналоги азотистих основ, деякі антибіотики, акридинові барвники, сірчистий іприт, транспозони, IS-елементи, бактеріофаг *Ми* та ін. Мутагенні агенти характеризуються неспецифічністю дії, тобто мутагени здатні лише підвищувати частоту виникнення мутацій.

За фенотиповими наслідками мутації поділяють на *прямі* та *зворотні* (або реверсії). Мутації, що призводять до втрати або зміни якоїсь функції клітини, відносяться до класу прямих, оскільки вони викликають у клітин появу іншого фенотипу, який відрізняє їх від бактерій дикого типу. Наприклад, бактерії *E. coli*, здатні в нормі зброджувати лактозу (Lac^+- фенотип), можуть втрачати цю ознаку, і тому мутація $Lac^+ \rightarrow Lac^-$, вважатиметься прямою. Внаслідок зворотної мутації у мутантного організму відновлюється вихідний (або дикий) фенотип: $Lac^- \rightarrow Lac^+$ – зворотна мутація, або реверсія.

Зворотні мутації бувають дійсними (справжні реверсії) та вторинними. Про справжні зворотні мутації говорять лише в тих випадках, коли в результаті другої мутації відновлюється вихідний генотип, тобто коли змінений при першій мутації триплет нуклеотидів буде знову відновлено. Іноді виникають мутації в інших ділянках геному, які за рахунок різних механізмів забезпечують обхідні шляхи для зняття ефекту першої мутації. Їх називають супресорними мутаціями. Супресорні мутації відновлюють у мутантів лише дикий фенотип, не відновлюючи початкового стану мутантного гена.

Точкові мутації – мутації, що зачіпають лише одну пару основ і призводять до заміни однієї пари основ на іншу. Наприклад, пара А-Т може бути замінена на Г-Ц, або навпаки. Для точкових мутацій характерна висо-

Таблиця 13.3

Хімічні та фізичні мутагени

Агент	Дія	Результат
Базові аналоги		
5-Бромурацил	Включається як Т; іноді помилкове поєднання з Г	АТ → ГЦ та іноді ГЦ → АТ
2-амінопурин	Включається як А; неправильне сполучення з Ц	АТ → ГЦ та іноді ГЦ → АТ
Хімічні речовини, які реагують з ДНК		
Азотиста кислота (HNO_2)	Дезамінує А і Ц	АТ → ГЦ та ГЦ → АТ
Гідроксиламін (NH_2OH)	Реагує з Ц	ГЦ → АТ
Алкілуючі агенти		
Монофункціональні (н.п. етилметансульфонат)	Метилює Г; неправильне сполучення з Т	ГЦ → АТ
Біфункціональні (н.п., мітоміцин, азотні іприти, нітрозогуанідин)	Утворення перехресних зв'язків між ланцюгами ДНК; вилучення ділянки ДНКазою	Як точкові мутації, так і делеції
Інтеркалюючі агенти		
Акридини, бромистий етидій	Вставляється між двома парами основ	Мікроінсерції та мікроделеції
Випромінювання		
Ультрафіолет (УФ)	Утворює піримідиновий димер	Репарація може призвести до помилки або делеції
Іонізуюче випромінювання (н.п., рентгенівське випромінювання)	Атакує вільні радикали на ДНК, розриває ланцюг	Репарація може призвести до помилки або делеції

ка частота реверсії. Такі мутації можуть бути двох типів. *Транзиції*, внаслідок яких відбувається заміна пурину на інший пурин або піримідину на інший піримідин. Наприклад, пара Г-Ц може бути замінена на пару А-Т, або навпаки. Та *трансверсії*, що призводять до заміни пурину піримідином, і навпаки, тобто замість пари А-Т з'являється пара Т-А або Г-Ц.

Мутації, пов'язані з заміною основ, часто виявляються міссенс-мутаціями (мутаціями зі зміною сенсу), в яких триплет, що кодує, після заміни забезпечує включення в білок вже іншої амінокислоти. Значна частина мутацій із заміною основ являє собою нонсенс-мутації (безглузді мутації), що характеризуються тим, що триплет, що кодує яку-небудь амінокислоту, перетворюється на триплет, що не кодує жодної амінокислоти, або стоп-кодон.

Під впливом деяких мутагенів можуть відбуватися вставки або випадання основ, а мутації, що виникають в результаті цього, називаються мутаціями зі *зсувом рамки зчитування*. Якщо в молекулу ДНК при реплікації включається або втрачається з неї основа, це призводить до зсуву рамки при зчитуванні генетичної інформації і, як наслідок, зміна послідовності амінокислот у білку мутантного штаму.

Мутації, що зачіпають безліч пар нуклеотидів, називають хромосомними. Вони поділяються на дуплікації, делеції, інсерції, інверсії, транслокації. *Дуплікації* – виникнення в даній нуклеотидній послідовності одного або частіше кількох повторів. *Делеції* – втрата двох чи кількох пар основ. *Інсерції* – вставка двох чи кількох пар основ. *Інверсії* – зміна порядку нуклеотидів у ДНК на зворотний по відношенню до орієнтації в штамах дикого типу. *Транслокації* – перенесення фрагмента ДНК у нове положення.

Мутації можуть мати летальні наслідки для клітини, тому у бактерій, архей і еукарій існують механізми репарації пошкодженого геному, що підтримують стабільність геному. Так, ДНК-полімераза оцінює водневі зв'язки неправильно вставленого нуклеотиду під час реплікації та негайно виправляє цю помилку, перш ніж буде додано наступний нуклеотид.

Помилково вставлені основи в новий ланцюг під час реплікації, зазвичай, виявляються (оскільки їх вставлені азотисті основи поки тимчасово не мають метильних груп, тоді як батьківська нитка ДНК метильована) та виправляються системою репарації шляхом вирізаня невідповідних основ з неметильованого ланцюга.

Системи ексцизійної репарації використовують один і той самий підхід: вони видаляють пошкоджену частину ланцюга ДНК та використовують неушкоджений комплементарний ланцюг як шаблон для нової ДНК. Рекомбінаційне відновлення виправляє пошкоджену ДНК, в якій обидві основи пари відсутні або пошкоджені.

13.3. Генетична рекомбінація

Окрім мутацій мікроорганізми використовують інші механізми для створення генетичної мінливості. Механізми, за допомогою яких генеруються нові комбінації генів, пов'язані з рекомбінацією, процесом, у якому одна або декілька молекул нуклеїнової кислоти перебудовуються або комбінують для утворення нового рекомбінантного генотипу. Генетична рекомбінація – це обмін сегментами ДНК між генетичними елементами, що призводить до створення нових комбінацій генів. Вона може бути *гомологічна* та *сайтспецифічна*.

Гомологічна рекомбінація призводить до генетичного обміну між гомологічними послідовностями ДНК з двох різних джерел. Гомологічні послідовності ДНК – це ті, які мають таку ж послідовність нуклеотидів та можуть утворювати пари по всій довжині двох молекул ДНК.

Центральним у гомологічній рекомбінації є білок RecA, який необхідний майже в кожному випадку гомологічної рекомбінації. RecA-подібні білки були ідентифіковані в усіх досліджених бактерій, а також архей та більшості еукарій.

У цьому процесі беруть участь два основні білки – білок одноланцюгового зв'язування (SSB), білок RecA та інші білки. Перерозподіл відбувається шляхом розрізання та повторного зшивання крос-лінкованої молекули ДНК.

Процес рекомбінації починає фермент ендонуклеаза шляхом надрізу в середині одного ланцюга донорної молекули ДНК. Ця надрізана нитка відокремлюється від гомологічної нитки білком з активністю гелікази (фермент, що розриває водневі зв'язки між основами). Отриманий одноланцюговий сегмент з'єднується із зв'язуючим білком, а потім з RecA. Це призводить до спаровування основ сегмента донора з комплементарною послідовністю в молекулі ДНК-реципієнта і відбувається обмін гомологічними сегментами ДНК.

Гомологічна генетична рекомбінація у бактерій відбувається, коли фрагменти донорської гомологічної ДНК переносяться в клітину-реципієнта шляхом трансформації, трансдукції або кон'югації. Отже, гомологічна рекомбінація відбувається тільки після передачі фрагмента ДНК від донора в клітину-реципієнта.

Інший тип рекомбінації, важливий для процесів еволюції – це сайт-специфічна рекомбінація. Сайтспецифічна рекомбінація відрізняється від гомологічної рекомбінації трьома суттєвими ознаками. По-перше, вона не вимагає довгих ділянок гомології послідовностей. По-друге, рекомбінація відбувається в специфічних сайтах молекул ДНК, і, по-третє, каталізується ферментами, які спільно називають рекомбіназами.

Сайтспецифічна рекомбінація – це механізм, за допомогою якого деякі плазміди та вірусні геноми інтегруються в хромосоми хазяїна. Це також тип рекомбінації, який використовують мобільні генетичні елементи для переміщення з одного місця в інше в молекулах ДНК.

13.4. Горизонтальне перенесення генів та їх рекомбінація

Мутації викликають зміни у геномі, які можуть бути корисними для виживання та адаптації до мінливих умов середовища, але вони не є єдиним чинником еволюції мікроорганізмів. Механізми горизонтального перенесення генетичного матеріалу забезпечують більш значні зміни, які дозволяють організму отримувати та виконувати нові функції.

Горизонтальному перенесенню генів сприяє *мобілом* – сукупність усіх мобільних генетичних елементів у геномі. Мобільні генетичні елементи – це окремі сегменти ДНК, які кодують гени їх власної реплікації, рекомбінації та передачі. Мобільні генетичні елементи включають плазміди,

профаги (інтегровані вірусні геноми), IS-елементи, транспозони та інтегрони. Завдяки здатності переміщувати гени в геномах і між ними мобільні генетичні елементи відіграють важливу роль в еволюції.

Усередині видів та між бактеріями різних видів існує горизонтальний потік генів, якому активно сприяє принаймні три основні механізми. Такий генетичний обмін відрізняється від традиційного успадкування – від материнської до дочірньої клітини та дозволяє клітині швидко набувати нових характеристик і підвищувати конкуренцію.

Порівняльний геномний аналіз близькоспоріднених мікробів, які демонструють різні фенотипи, виявив чіткі відмінності геномів. Часто ці характерні відмінності є результатом горизонтального перенесення генів, переміщення генів між клітинами, які не є прямими нащадками один одного. Горизонтальне перенесення генів дозволяє клітинам швидко набувати нових характеристик і метаболічної різноманітності.

У бактерій відомі три механізми генетичного обміну (рис. 13.10): *трансформація*, при якій переноситься фрагмент ДНК, що вивільнилася з лізованої клітини та поглинається іншою клітиною; *трансдукція*, під час якої відбувається перенесення ДНК бактерії бактеріофагом; *кон'югація*, при якій перенесення ДНК обумовлене прямим контактом клітин за допомогою пілуса і кон'югаційної плазміди клітини донора. При цьому перенесення ДНК відбувається тільки в одному напрямку, від клітини донора до клітини реципієнта.

Незалежно від того, як ДНК була передана в клітину реципієнта, вона може бути розщеплена ферментами рестрикції клітини-реципієнта, може реплікуватися сама по собі, якщо має власний механізм реплікації (наприклад, геном плазміди або фага), або може рекомбінувати з хромосомою клітини-реципієнта (може бути вставлена в ДНК хромосоми реципієнта).

13.5. Способи обміну генетичною інформацією у прокаріотів

Бактерії для відтворення собі подібних не потребують партнерів. Їх геном, що подвоївся після реплікації, щоразу передається клітині «по вертикалі» в нескінченному ряду поколінь. Але поряд з таким безстатевим способом передачі генів від предків до нащадків у бактерій існує також горизонтальне перенесення генів, при якому з клітини-донора в клітину-реципієнта передається частина генетичного матеріалу (хромосоми), в результаті утворюється неповна зигота (мерозигота). Потім переданий фрагмент хромосоми донора спаровується з хромосомою реципієнта з наступною гомологічною рекомбінацією.

За рекомбінацією відбуваються процеси реплікації ДНК і поділу клітини, в результаті чого виникають клітини, що містять тільки рекомбінантну хромосому, які називаються рекомбінантами.

Існують три основні способи обміну генетичною інформацією або горизонтального перенесення генів: трансформація, трансдукція та кон'ю-

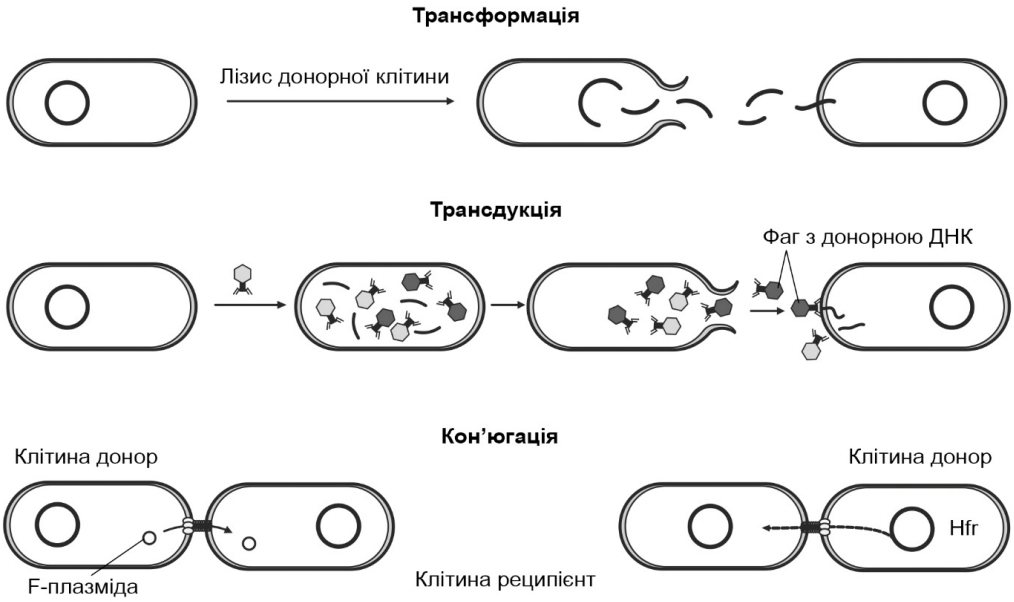


Рис. 13.5. Процеси, за допомогою яких ДНК переноситься від бактеріальної клітини донора до клітини реципієнта

гація (рис. 13.5). Ці процеси відрізняються один від одного способом транспортування ДНК.

13.5.1. Трансформація

Оскільки хромосомна ДНК у клітинах бактерій і архей присутня у вигляді великої молекули, під час лізису клітини вона вивільнюється та розпадається на фрагменти. Трансформація – це перенесення генетичної інформації, у якому вивільнена із загиблої бактерії ДНК з середовища надходить у клітину-реципієнта. Початковим етапом генетичної трансформації є адсорбція ДНК та її поглинання за участі специфічного механізму з залученням пілуса. До незворотної адсорбції та поглинання ДНК здатні лише клітини бактерій, що перебувають у стані компетентності, тобто готовності до сприйняття донорської ДНК.

Наступні етапи, як і в інших парасексуальних процесах, пов'язані з рекомбінацією трансформуючої хромосомної ДНК донора з хромосомою реципієнта та пострекомбінаційними подіями. Кількість ДНК, що переноситься під час трансформації, становить близько 10 т.п.н.

Генетична трансформація у бактерій може здійснюватися не лише хромосомною, а й плазмідною ДНК. Вихід ДНК із клітини обумовлений, головним чином, автолізом і при природній трансформації бактерія-донор ДНК обов'язково гине. Природна трансформація один із способів горизонтального перенесення генів у природних умовах.

Явище трансформації було відкрито Ф. Гріффітом в дослідах на пневмококах (*Streptococcus pneumoniae*). На час відкриття явища трансформації було відомо, що серед пневмококів одного і того ж виду, крім штамів, що мають полісахаридну капсулу, зазвичай є безкапсульні варіанти, які утворюються в результаті мутацій. Також було встановлено, що наявність та відсутність капсули визначає деякі важливі властивості клітин.

Клітини, що мають капсулу, ростуть у вигляді так званих S-колоній – слизових з гладкою поверхнею. Безкапсульні клітини утворюють дрібні з нерівною поверхнею (шорсткі) R-колонії. За рахунок наявності капсули бактерії з S-колоній мають вірулентні властивості та викликають септицемію, оскільки капсула захищає їх від фагоцитуючих клітин. Безкапсульні клітини є авірулентними.

Трансформація була відкрита в одному з варіантів дослідів імунізації мишей вакциною, що складається з пневмококів, вбитих нагріванням при температурі 80 ºС. Було встановлено, що якщо мишам підшкірно ввести суміш живих (непатогенних) безкапсульних клітин (R) та вбитих нагріванням вірулентних пневмококів (S), що мають капсулу, то миши гинуть. З органів мишей при цьому виділили живі капсульні клітини пневмококів.

Якщо мишам вводили живі невірулентні (R) клітини пневмококів і вбиті вірулентні (S) клітини пневмококів різних серотипів (клітини мали різні антигени), виділені з органів мертвої миші капсульні клітини мали змінений серотип – той, до якого належали вбиті клітини S-пневмококів (рис. 13.6). У контрольних дослідах введення окремо такої ж кількості живих авірулентних пневмококів або вбитих вірулентних не призводило до появи живих капсульних форм.

Рис. 13.6. Схема досліду Ф. Гріффіта

О. Евері, К. Мак-Леод та М. МакКарті встановили, що трансформацію можна відтворити, використовуючи як трансформуючий агент очищену ДНК, отриману з капсульних клітин. На цій підставі було зроблено висновок, що трансформуючим агентом є саме ДНК.

Трансформація, крім пневмококів, виявлена також у бактерій *Escherichia coli, Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* та інших видів. Її вдалося також здійснити між мікроорганізмами, що належать до різних видів. До трансформації здатні лише компетентні клітини бактерій, готові до сприйняття донорської ДНК. У багатьох видів бактерій компетентність виникає лише на певному етапі росту культури.

У компетентних культурах гемофільних бактерій до трансформації здатна майже кожна клітина, у *B. subtilis* ДНК можуть поглинати тільки 15% клітин популяції, у *Aspergillus niger* – 0,2%, у *Rhizobium japonicum* – до 0,1% клітин усієї популяції.

Компетентність – це складне явище, яке індукується в 10–15% популяції на певній стадії росту. Наприклад, бактерії *S. pneumoniae* стають компетентним під час ранньої експоненціальної фази, тоді як *B. subtilis* стають компетентними у стаціонарній фазі росту. Гени компетентності потребують активації за допомогою альтернативного сігма-фактора або білка-активатора транскрипції. Є кілька видів конститутивної компетентності (наприклад, *Neisseria spp.* і *Thermus spp.*).

Більшість бактерій здатні поглинати ДНК з будь-якого джерела (тобто іншої бактерії, археї та еукарії). Деякі приймають лише ДНК близькоспорідненого виду.

У бактерій родів *Vibrio, Neisseria, Acinetobacter, Thermus, Streptococcus* і *Bacillus* компетентність безпосередньо пов'язана з пілусом (рис. 13.7). Пілус – це універсальна мультибілкова структура, яка відіграє роль у фіксації на субстраті, рухливості, утворенні біоплівки, патогенезі, а також у зв'язуванні та поглинанні ДНК у природно компетентних клітинах.

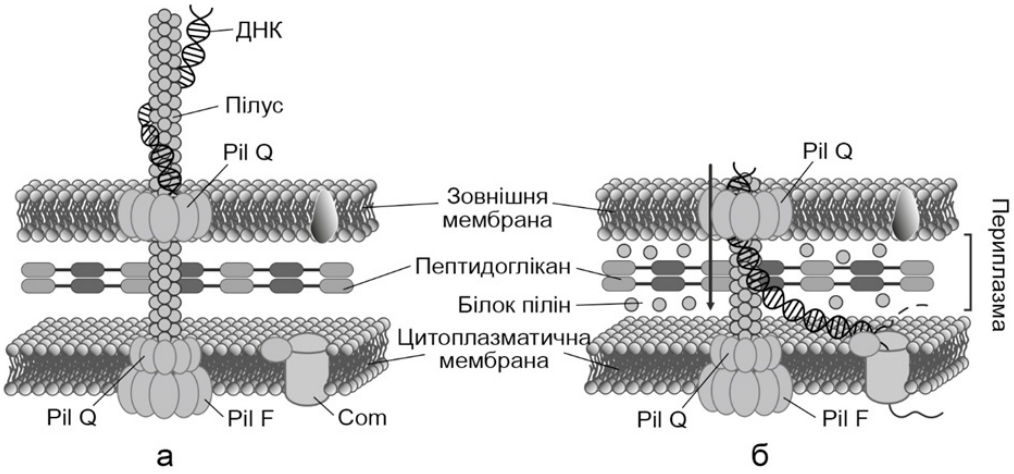


Рис. 13.7. Пілус *Vibrio* і поглинання ДНК: (а) пілус адгезує позаклітинну ДНК; (б) пілус скорочується та переносить позаклітинну ДНК через зовнішню мембрану до системи компетентності (Com), розташованої в цитоплазматичній мембрані

У грамнегативних бактерій пілус перетинає гідрофобну зовнішню мембрану через специфічний трансмембранний канал, а його білкові субодиниці розпізнають і зв'язуються з позаклітинною ДНК (рис. 13.7а).

Після зв'язування з ДНК пілус протягує ДНК через зовнішню мембрану в периплазму за допомогою процесу, який називається ретракцією (скороченням) пілуса. Втягнення пілуса є результатом деполімеризації окремих білків піліну, які утворюють його структуру (рис. 13.7б). У грампозитивних клітинах пілі або гомологи секреції систем II типу зв'язують ДНК і переносять її через клітинну стінку. Потрапляючи до цитоплазматичної мембрани, ДНК зв'язується з білками системи компетентності (Com), розташованої в ній. Система компетентності включає ДНК-зв'язуючий білок і різні нуклеази.

Фрагменти чужої ДНК далі розплітаються під час процесу поглинання нуклеазами системи компетентності та потрапляють в цитоплазму у формі одноланцюгових фрагментів ДНК, оскільки комплементарний ланцюг розщеплюється. Після надходження в цитоплазму специфічний для компетенції білок зв'язує одноланцюгову донорську ДНК, що захищає її від нуклеазної атаки клітини, поки вона не досягне хромосоми реципієнта.

Якщо донорна ДНК має спільну гомологію з послідовністями хромосоми, то вона замінює її та інтегрується в геном реципієнта шляхом рекомбінації за участі білка Rec-A.

Незважаючи на відмінності в архітектурі клітинної стінки, грампозитивні та грамнегативні бактерії використовують схожі білки як основні компоненти механізму поглинання ДНК. Ці білки використовуються в системах секреції II типу та пілі IV типу. Основні відмінності виникають через потребу грамнегативних бактерій переміщувати дволанцюгову ДНК через зовнішню мембрану.

Мікробні генетики використовують трансформацію для введення рекомбінантної ДНК у клітини. Оскільки бактерії багатьох видів, включаючи *E. coli,* природно не здатні до трансформації, ці бактерії піддають дії електричного струму або впливу хлориду кальцію, що робить клітинну мембрану тимчасово більш проникною для ДНК.

13.5.2. Кон'югація

Кон'югація – це механізм горизонтального перенесення генів, який потребує прямого контакту клітин і відбувається в багатьох видів грамнегативних і грампозитивних бактерій. Кон'югація кодується плазмідою, яка бере участь у перенесенні ДНК між близькоспорідненими бактеріями.

Кон'югацію було відкрито Дж. Ледербергом і Е. Татумом в експериментах із ауксотрофними штамами бактерій *E. coli* з різними серотипами. Експеримент полягав у тому, що два ауксотрофні штами мутантних *E. coli* з наступними генотипами:

штам А - met^- bio^- thr^+ leu^+ thi^+,
штам Б - met^+ bio^+ thr^- leu^- thi^-

вирощували в рідкому повноцінному середовищі з амінокислотами та вітамінами, які вони самі не синтезують. Після цього культури обох штамів змішували та інкубували протягом певного проміжку часу. Потім відмиті клітини змішаної культури висівали на агаризоване синтетичне середовище. Після інкубування на цьому середовищі сформувалися колонії, бактерії яких мали генотип $met^+bio^+thr^+leu^+thi^+$ (рис. 13.8).

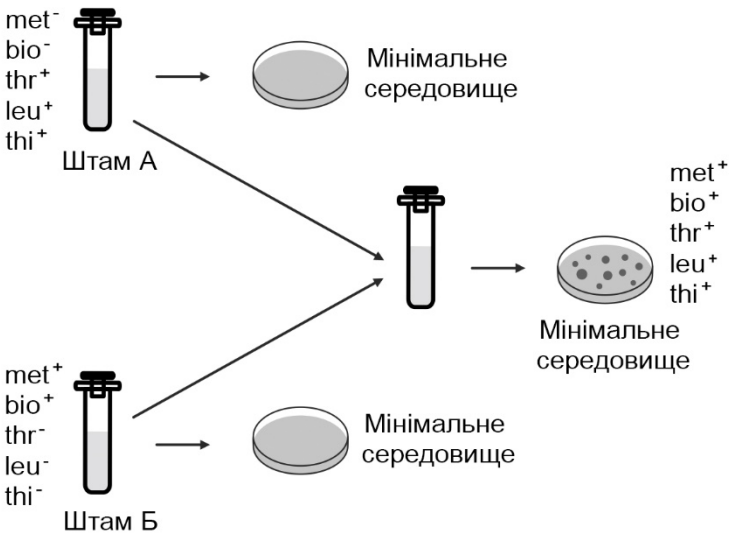


Рис. 13.8. Схема досліду Дж. Ледерберга та Е. Татума

На підставі отриманих результатів було зроблено висновок, що прототрофи, які утворюються у змішаній культурі, є генетичними рекомбінантами, які включили гени *met*$^+$ і *bio*$^+$ в геном штаму Б та гени *thr*$^+$, *leu*$^+$, *thi*$^+$ – в геном штаму А. Встановлено, що для їх появи необхідний безпосередній контакт між бактеріями штамів А і Б.

Механізм кон'югації, який відповідає за передачу ДНК між клітинами, кодується плазмідою. Для процесу кон'югації необхідна донорська клітина, яка містить кон'югативну плазміду, та клітина-реципієнт, яка не має плазміди. Клітини популяції, що містять F-плазміду або іншу кон'югативну плазміду (позначають як F^+), можуть виступати донорами ДНК, а клітини, що не містять плазміду (позначають як $F^–$), слугують реципієнтами ДНК.

В процесі кон'югації кон'югативна плазміда переходить з клітини-донора в клітину-реципієнта. При цьому інші плазміди або хромосома хазяїна, що не можуть самі передаватись, можуть інтегруватися з кон'югативною плазмідою та переноситися під час кон'югації.

F-плазміда (від fertility – плодючість) є кільцевою молекулою ДНК розміром 99 159 п.н., що становить 3% від розміру хромосоми кишкової палички (рис. 13.9). Вона переносить копії генів, які кодують її саму, та інші гени хромосоми, що інтегрувала плазміду. У процесі кон'югації бере участь клітина-донор, яка має кон'югативну плазміду, та клітина-реципієнт, яка її не має.

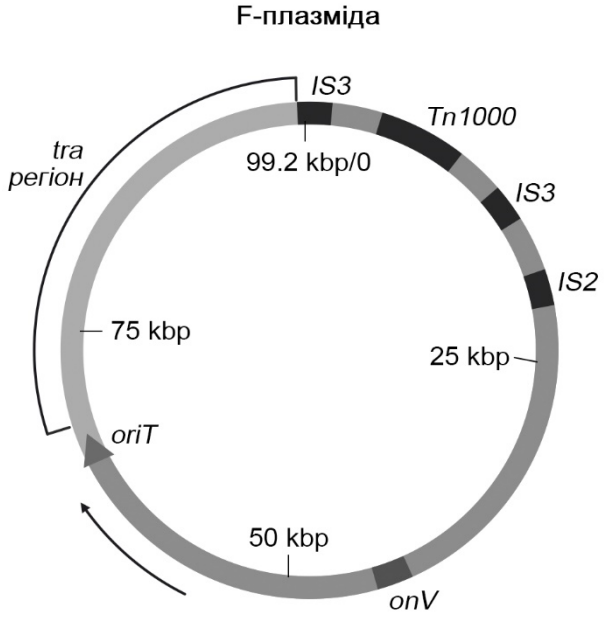


Рис. 13.9. Генетична карта F-плазміди *Escherichia coli*: *oriV* – початок реплікації; *tra* – гени для кон'югативного переносу; *oriT* – початок перенесення; цифри на внутрішній частині позначають розмір плазміди в т. п. н.

Одна ділянка плазміди містить гени, що відповідають за реплікацію ДНК та велику ділянку *tra* з генами, які кодують функції передачі ДНК, синтез кон'югативного пілуса та систему секреції IV типу, що беруть участь у перенесенні ДНК. Хоча дві структури мають спільні поліпептидні компоненти та виконують взаємодоповнюючі ролі в кон'югації, утворення пілуса та перенесення ДНК є незалежними процесами. Кон'югативні плазміди різних бактерій можуть мати дещо різні ділянки *tra*, і пілуси можуть дещо відрізнятися за структурою.

Пілус з'єднує клітини донора та реципієнта (рис. 13.10), вступає в специфічний контакт з рецептором на поверхні клітини-реципієнта та скорочується шляхом деполімеризації його білка піліна, аналогічно як скорочується пілус в процесі трансформації (рис. 13.7). Розбирання структури пілуса призводить до скорочення його розміру та стягування двох клітин.

Клітини донора та реципієнта вступають у контакт шляхом зв'язування сполучних білків, розташованих у зовнішніх мембранах клітин, та утворюють кон'югаційний канал, через який здійснюється перенесення ДНК F-плазміди з клітини-донора до клітини-реципієнта.

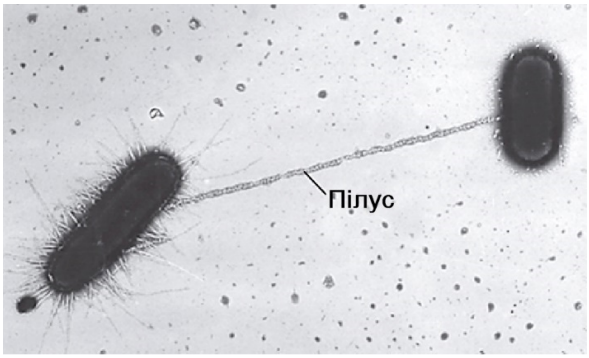


Рис. 13.10. Клітини *Escherichia coli*, що кон'югують

Перенесення генетичного матеріалу від донора до реципієнта відбувається у тому разі, коли утворюється ефективна кон'югуюча пара з кон'югаційним каналом. Пілус забезпечує взаємне впізнавання при контакті донорної та реципієнтної клітин (рис. 13.11 А). Він прикріплюється до специфічних рецепторів реципієнтної клітини. Завдяки здатності пілуса скорочуватися, клітини донора та реципієнта стягуються та вступають у тісний контакт, а між клітинами виникає кон'югаційний канал, яким ДНК переходить із клітини донора в клітину реципієнта.

F-плазміда може об'єднуватися з хромосомою або з іншою плазмідою клітини хазяїна, які не можуть самі передаватися, та переносити їх під час кон'югації в реципієнтну клітину (рис. 13.11 Б).

Клітини, що не містять F-плазміду (клітини F^-), можуть функціонувати тільки як реципієнти. При прямому контакті між клітинами під час кон'югації частота передачі F-плазміди близька до 100%. Таким чином, клітини-реципієнти в результаті кон'югації отримують F-плазміду та перетворюються в потенційних донорів.

Кон'югативні плазміди можуть інтегруватися з хромосомою або з іншою плазмідою клітини хазяїна (рис. 13.12). Такий процес подібний до інтеграції ДНК фага лямбда в хромосому клітини-хазяїна. Клітини-донори, що містять інтегровану в хромосому F-плазміду та забезпечують високу частоту рекомбінацій, отримали назву клітин Hfr (від анг. High frequency of recombinants).

Процес перенесення. Якщо змішати популяцію клітин Hfr з клітинами F^-, то майже кожна клітина Hfr знайде собі партнера F^- і буде з ним кон'югувати. Показано, що кожен ген клітини донора передається в клітину реципієнта в певний момент часу після початку кон'югації. Часова

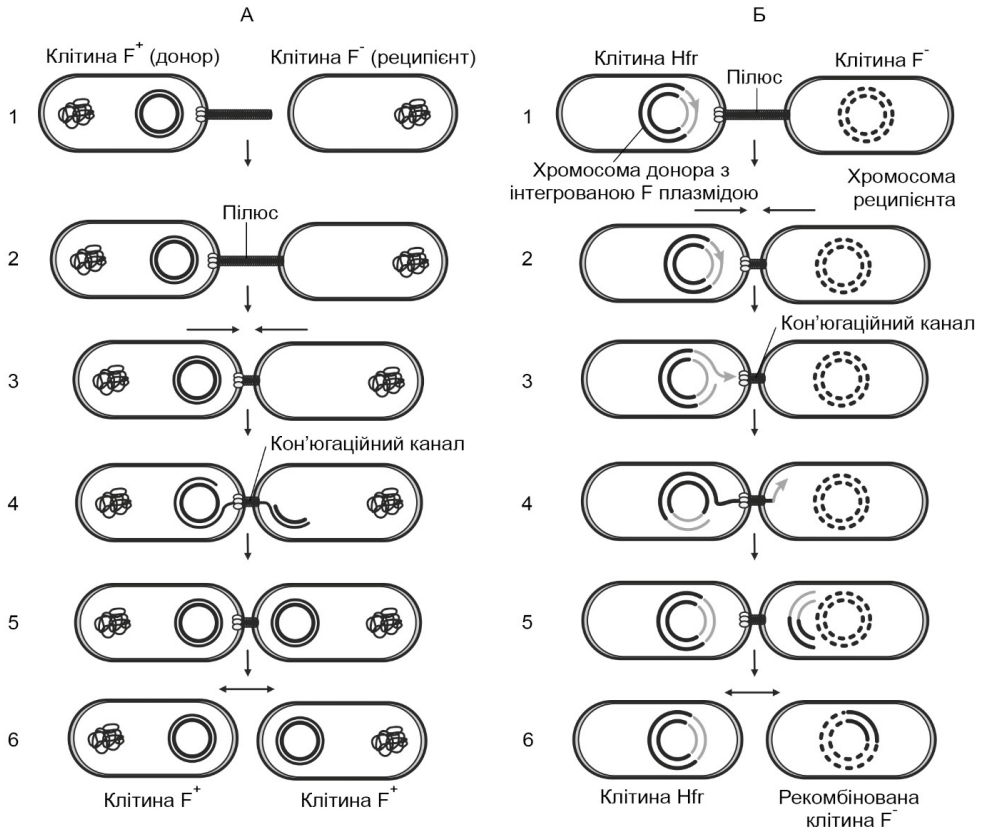


Рис. 13.11. Схема процесу кон'югації:
А. Перенесення F-плазміди з клітини F^+ в клітину F^-: 1. Клітина донор (F^+) та клітина реципієнт (F^-); 2. Контакт пілуса з рецепторами клітини реципієнта; 3. Скорочення пілуса та утворення кон'югаційного каналу; 4. Перенесення одного ланцюга F-плазміди з клітини донора в клітину реципієнта та синтез комплементарного ланцюга F-плазміди в клітині донора; 5. Завершення перенесення ДНК плазміди та синтез комплементарного ланцюга F-плазміди в клітині реципієнта; 6. Відокремлення клітин донора (залишається з F-плазмідою) та реципієнта (отримала F-плазміду та стала F^+).
Б. Перенесення хромосомної ДНК з клітини Hfr в клітину F^-: 1. Клітина донор (Hfr) та клітина реципієнт (F^-) з'єднані пілусом; 2. Скорочення пілуса та утворення кон'югаційного каналу; 3. Інтегрована в хромосому плазміда розрізається в одній нитці; 4. Інтегрована в хромосому плазміда переноситься з хромосомною ДНК в клітину реципієнт; 5. Обмін гомологічними ділянками ДНК в клітині F^-; 6. Відокремлення клітин Hfr та F^- клітини з рекомбінованою хромосомою.

послідовність перенесення генів відповідає порядку їх розташування в бактеріальній хромосомі, встановленому внаслідок генетичного аналізу. Це означає, що будь-який штам Hfr передає свою хромосому реципієнту, починаючи з певної ділянки початку (origin) *oriT* і в одному напрямку (рис. 13.13).

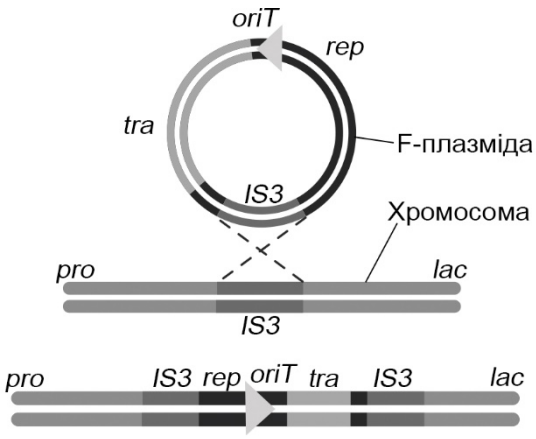


Рис. 13.12. Утворення штаму Hfr. Інтеграція F-плазміди в хромосому відбувається в місцях, де розташовані IS-елементи (на рисунку – в IS3, розташованому між генами *pro* і *lac* хромосоми). Стрілка вказує на початок передачі, oriT, тому *pro* є першим хромосомним геном, який буде перенесено, а *lac* – останнім

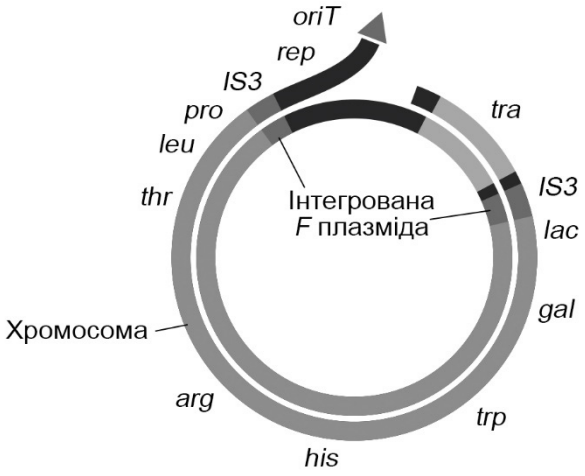


Рис. 13.13. Початок процесу перенесення хромосомної ДНК (Hfr) шляхом кон'югації

Однак реципієнт залишається F^- і отримує лінійний фрагмент донорської хромосоми, приєднаний до частини F-плазміди. Щоб ДНК клітини донора не була розщеплена нуклеазою реципієнта, вона повинна бути рекомбінована в хромосому реципієнта після перенесення. Слідом за процесом перенесення в клітину-реципієнта відбувається гомологічна рекомбінація між ДНК донора та власною ДНК реципієнта.

Процес перенесення всієї хромосоми *E. coli* при 37 °С продовжується близько 100 хв. Чим далі розташовується той чи інший ген від «початку» хромосоми, тим пізніше він передається та тим рідше потрапляє в клітину реципієнта.

Завдяки часовій послідовності перенесення генів із клітини-донора стало можливим скласти карту розташування їх у бактеріальній хромосомі *Escherichia coli* K12 (рис. 13.14), яка містить 4 639 675 п.н. і 4 288 відкритих рамок зчитування.

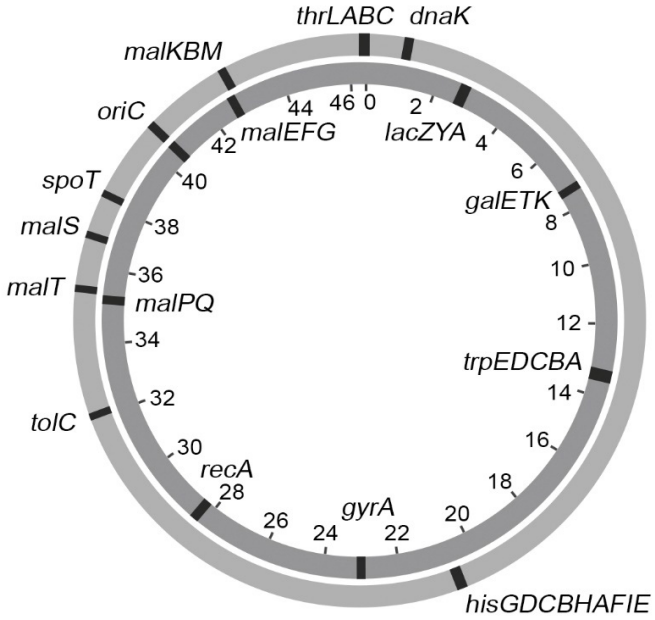


Рис. 13.14. Хромосома штаму *Escherichia coli* К-12. На карті відстань позначено в 100 т. п. н ДНК. На ланцюгу ДНК показано розташування деяких генів і оперонів

Послідовність розташування генів в бактеріальній хромосомі визначена також для *Salmonella typhimurium, Streptomyces coelicolor, Bacillus subtilis* та багатьох інших бактерій.

Перенесення генів за допомогою F'-фактора. Інтеграція F-фактора в бактеріальну хромосому оборотна. F-фактор може бути вивільнений з хромосоми, і тоді клітина Hfr стає клітиною F^+. Цей процес «вирізання» (ексцизії) відбувається приблизно з тією самою частотою як і інтеграція. При правильному вирізанні розєднання відбувається в тому ж самому місці, що і при інтеграції. У деяких випадках розєднання відбувається десь дуже близько до цього місця, і в результаті сусідня ділянка ДНК хромосоми залишається приєднаною до фактора F. Фактор F, що містить невеликий фрагмент хромосомної ДНК, називають F’ фактором.

Виникнення фактора F' аналогічно утворенню фага, що здійснює специфічну трансдукцію. Клітину, яка містить F' фактор, називають клітиною F'. Включена в F-фактор ДНК тепер може передаватися F' клітинами-донорами штамам F^- з такою ж високою частотою (100%), що і при звичайній передачі штамами F^+ реципієнтам F^-.

Передача генів шляхом кон'югації, відкрита у *Escherichia coli*, поширена у ентеробактерій. За допомогою перенесення F факторів з *E. coli* K12 в клітини *Salmonella* та *Shigella* вдалося створити нові генетичні системи. Подібні системи знайдено у групі псевдомонад. Процеси кон'югації добре вивчені на бактеріях видів *Nocardia, Rhizobium* та інших. Обмін генами шляхом кон'югації та мобілізація генів за допомогою плазмід, ймовірно, дуже поширені у світі прокаріотів.

Процес перенесення хромосомних генів при кон'югації може здійснюватися також за участю кон'югативних транспозонів, що містяться в хромосомі. Такі транспозони крім генів, що відповідають за транспозицію, та генів, які детермінують фенотипові ознаки, несуть *tra*-гени. Ці гени функціонально відповідають генам кон'югативних плазмід.

Кон'югативні транспозони можуть вищеплюватися з хромосоми, утворювати плазмідоподібні структури та, як і кон'югативні плазміди, здійснювати перенесення дрібних плазмід у клітину-партнера, а також самі переходити до неї. Процеси кон'югації, що особливо ведуть до передачі плазмід, широко поширені серед бактерій.

Кон'югація – найбільш ефективний механізм для горизонтального перенесення генів у будь-якому середовищі проживання бактерій. Кон'югувати можуть також бактерії, дуже далекі в систематичному відношенні. Плазміди, що здійснюють кон'югацію між неспорідненими бактеріями та успішно підтримуються в них, називаються плазмідами широкого кола хазяїв.

Кількість ДНК, що переноситься при кон'югації, більша, ніж при трансформації та трансдукції. У «м'яких» умовах кон'югації може переноситись вся хромосома. Отримані при цьому способі обміну генетичною інформацією рекомбінанти називаються транскон'югантами.

13.5.3. Трансдукція

Трансдукція – це перенесення генетичної інформації (хромосомних генів або генів плазмід) від клітини-донора до клітини-реципієнта, що здійснюється за участю бактеріофагів. При трансдукції фрагменти хромосоми або плазміди повинні упакуватися в головку бактеріофага, вийти в складі цієї фагової частинки (віріона) з клітини-донора внаслідок її лізису та потрапити в іншу клітину (реципієнт) при новому акті зараження.

Білковий капсид фагової головки оберігає ДНК, що знаходиться в ній, від руйнування позаклітинними нуклеазами. Оскільки адсорбція хвосто-

вого відростка фага на рецепторах видоспецифічна поверхні клітини, то й перенесення генетичного матеріалу при трансдукції може відбуватися, головним чином, між філогенетично близькими бактеріями.

При трансдукції розміри фрагмента ДНК, що переноситься, визначаються розмірами головки бактеріофага. Різні фаги можуть переносити фрагменти ДНК від 20 до 40 т.п.н. Таким чином, при трансдукції передаються як поодинокі так і зчеплені гени. Рекомбінанти, що отримують чужу ДНК при цьому способі обміну генетичною інформацією, називають трансдуктантами.

Трансдукція була відкрита М. Циндером і Дж. Ледербергом після того, як була описана трансформація та кон'югація. Встановлено, що одні фаги можуть переносити різні бактеріальні гени, а інші – лише певні. Відповідно до цього прийнято виділяти два типи трансдукції: генералізовану (неспецифічну чи загальну) та специфічну або обмежену. При генералізованій трансдукції може трансдукуватися будь-який фрагмент бактеріальної хромосоми приблизно з однаковою частотою. При специфічній трансдукції можуть переноситися лише певні гени. У процесі генералізованої трансдукції бактеріофаг є лише переносником генетичного матеріалу бактерій. При специфічній трансдукції фаг включає ДНК бактерій у свій геном та передає її бактерії-реципієнту.

Генералізована трансдукція. До фагів, що здійснюють генералізовану трансдукцію, відносяться фаги P22 *S. typhimurium*, P1 *E. coli*, PBS1 *B. subtilis* та ін.

Генералізована трансдукція здійснюється дефектними частинками фагів (віріонами), утворення яких відбувається в процесі репродукції фагів, що супроводжується розпадом бактеріальної хромосомної ДНК. Утворення їх може відбуватися як при літичному розвитку фага (фаг P22 *S. typhimurium*), так і після індукції профага (фаг P1 *E. coli*). При цьому деякі віріони упаковується не фаговою, а бактеріальною ДНК. Розміри фрагментів бактеріальної ДНК, що включається до таких часток, не перевищують об'єму головки фага, а упаковуватися можуть різноманітні фрагменти бактеріальної хромосом.

Віріони, що несуть фрагменти ДНК бактерій, називаються дефектними або трансдукуючими. Якщо клітини інфікуються такими дефектними трансдукуючими фагами, у них надходять короткі фрагменти двониткової ДНК донора, які рекомбінують із ДНК реципієнта. При цьому виникають нелізогенні рекомбінантні клітини, які не мають імунітету до фагів, так як трансдукуючі віріони, що викликали їх утворення, не містять фагової ДНК.

При генералізованій трансдукції може переноситися будь-яка бактеріальна ознака з частотою 10^{-5}–10^{-6}. Кількість бактеріальної ДНК, яка може переноситися фагом, зазвичай становить 1–2% усієї ДНК, що міститься в клітині. При цьому можуть виникати не тільки справжні реком-

бінанти-трансдуктанти, в яких привнесений ген успадковується стабільно з покоління до покоління (повна або завершена, трансдукція), а й абортивні трансдуктанти.

При абортивній або незавершеній трансдукції внесений дефектним фагом фрагмент бактеріальної хромосомної ДНК донора не рекомбінує з хромосомною ДНК реципієнтної клітини. Перебуваючи в реципієнтній клітині, привнесений ген може експресуватися, що надає клітині новий фенотип, наприклад, здатність до синтезу якоїсь амінокислоти. Однак ген екзогеноти (привнесений ген) не здатний реплікуватися.

Специфічна трансдукція. Характерною особливістю специфічної трансдукції є те, що кожен трансдукуючий фаг передає тільки певну, дуже обмежену область бактеріальної хромосоми. Якщо в генералізованій трансдукції фаг виступає в якості «пасивного» переносника генетичного матеріалу бактерій, а генетична рекомбінація у бактерій, що трансдукуються, відбувається за загальними закономірностями рекомбінаційного процесу, то при специфічній трансдукції фаг не тільки переносить генетичний матеріал, але й забезпечує його включення в бактеріальну хромосому.

Найбільш вивченим прикладом специфічної трансдукції є трансдукція, що здійснюється фагом λ (лямбда), який здатний інфікувати клітини бактерій *E. coli* з подальшою інтеграцією його ДНК з геномом бактерії. ДНК помірного фага при лізогенізації бактерій в результаті сайт специфічної рекомбінації вбудовується в їхню хромосому тільки в одному місці – на ділянці між локусами *bio* і *gal*. Ця ділянка отримала назву attλ. Вирізання (ексцизія) профага з хромосоми при індукції профага здійснюється також за механізмом сайт-специфічної рекомбінації.

Сайт-специфічна рекомбінація відбувається точно, але не безпомилково. Приблизно один раз на мільйон подій вирізання профага здійснюється не в attλ-сайті, а захоплює ділянки *gal* або *bio*. У результаті цього прилегла до профага область бактеріального геному вищеплюється зі складу хромосоми та переходить в геном нового фага, що формується. Бактеріальний генетичний матеріал, що вбудовується в геном фага, може замістити до третини генетичного матеріалу фага.

Після пакування фагової ДНК, частина якої заміщена бактеріальною, утворюються дефектні фагові частки. Фаг є дефектним внаслідок того, що об'єм голівки обмежений і при включенні до його геному фрагмента бактеріальної ДНК частина фагового геному залишається в хромосомі бактерій. Якщо дефект несуттєвий, то фаг зберігає життєздатність. Такий дефектний фаг може заражати інші клітини, але не може викликати репродукцію нових фагів, оскільки гени, відповідальні за репродукцію, відсутні. Якщо в такій дефектній фаговій ДНК збереглися липкі кінці, що забезпечують перетворення її на кільцеву форму, то фагова ДНК разом з фрагментом бактеріальної ДНК може інтегруватися з ДНК реципієнтної бактерії, переходячи в стан профагу, і викликати її лізогенізацію (рис. 13.15).

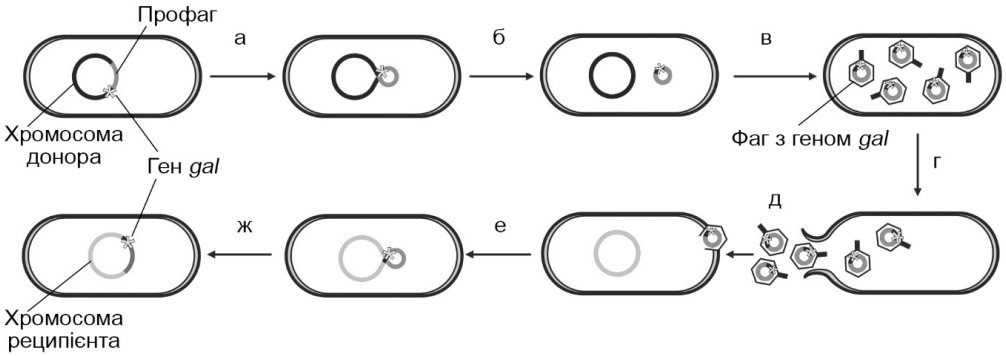


Рис. 13.15. Специфічна трансдукція у *Escherichia coli*, що містить профаг лямбда: а – індукція профага; б – ексцизія профага з хромосоми з захватом гена *gal* хромосоми клітини донора; в – репродукція дефектних фагових часток з геном *gal;* г – лізис донорної клітини; д – дефектний фаг інфікує реципієнтну клітину; е – інтеграція ДНК фага з хромосомою; ж – утворення рекомбінантної клітини

При індукції профагу λ частіше утворюються дефектні вірусні частки, що містять гени локусу *gal*. Такі дефектні частки позначають λd*gal* (λ, defective, *gal*). Якщо у геномі фага λ міститься ген, відповідальний за синтез біотину, то дефектні частки позначають λd*bio*. Отже, якщо фаголізатом, в якому містяться дефектні фаги, обробити реципієнтні клітини *bio*$^{-}$ або *gal*$^{-}$, то з частотою 10^{-5}–10^{-6} утворюються трансдуктанти *bio*$^{+}$ або *gal*$^{+}$.

Специфічна трансдукція у *E. coli* здійснюється не тільки фагом λ, а й спорідненими йому фагами, які отримали назву лямбдоїдних фагів, до яких відносяться φ80, 434, 82 та ін. Зокрема, фаг φ80 включається в хромосому поблизу генів, що кодують утворення ферментів, відповідальних за синтез триптофану. Тому фаг φ80 придатний для перенесення генів *trp*.

Фаг P22 *S. typhimurium*, крім загальної трансдукції, може здійснювати специфічну трансдукцію. ДНК фага P22 інтегрується в ділянку хромосоми поруч із генами, відповідальними за синтез проліну.

Таким чином, для здійснення специфічної трансдукції необхідна попередня лізогенізація бактерій-донорів (інфікування клітини фагом та інтеграція геному фага в геном бактерії) та подальше вищеплення профага з хромосоми клітини. Дефектні трансдукуючі частки фагів, що утворилися при цьому, заражають клітини реципієнтного штаму, відбувається їх лізогенізація та вбудовування профага з ділянкою геному бактерії-донора в хромосому реципієнта.

Використовувати трансдукцію можна для перенесення плазмід та коротких фрагментів хромосоми донора; для конструювання штамів заданого генотипу, зокрема ізогенних штамів; для точного картування бактеріальних генів, встановлення порядку та їх розташування в оперонах і тонкої структури окремих генетичних детермінант.

13.6. Обмін генетичною інформацією та інші генетичні події в архей

Археї, як і більшість бактерій, також містять одну кільцеву хромосому та володіють системами горизонтального перенесення генів. Однак вони не так добре вивчені, як у бактерій, оскільки більшість вивчених архей є екстремофілами, які здатні рости лише в умовах високого вмісту солі та/або високої температури, що значно ускладнює їх культивування та дослідження.

Жоден окремий вид не став модельним для генетики архей, хоча було проведено значні генетичні дослідження з представниками родів екстремальних галофілів *Halobacterium*, *Haloferax,* що дозволило виявити у них різні системи перенесення генів, включаючи трансформацію, трансдукцію та кон'югацію. Крім того, відомо кілька плазмід, які були використані для конструювання векторів клонування, що дозволяє проводити генетичний аналіз шляхом клонування та секвенування генів. У деяких метаногенів, включаючи види *Methanococcus* і *Methanosarcina*, добре розроблений транспозонний мутагенез, а також інші інструменти та методи генетичного аналізу.

Трансформація відбувається в метаногенів *Methanococcus voltae* і гіпертермофілів *Thermococcus kodakarensis* і *Pyrococcus furiosus*, які є природно компетентними.

Внутрішньовидовий обмін плазмідами відбувається у деяких видів *Thermococcus* і *Halorubrum* шляхом брунькування клітинної мембрани, у результаті якого утворюються мембранні везикули, що містять ДНК, як засоби генетичного обміну.

Утворення мембранних везикул відбувається у видів усіх трьох доменів життя. Ці структури можуть нести як білок, так і нуклеїнову кислоту. Перенесення ДНК мембранними везикулами також спостерігається у бактерій. Механізм, який має місце при перенесенні плазміди pR1SE екстремальним галофілом *Halorubrum lacusprofundi*, стирає межу між трансформацією та трансдукцією.

Плазміда pR1SE не кодує гени вірусного походження, але вона містить гени, що кодують мембранні білки, які вставляються в мембрану хазяїна, а потім використовуються для формування мембранних везикул, які забезпечують перенесення плазміди між клітинами. Таким чином, pR1SE імітує вірус, оскільки генетичний елемент кодує частину структурно визначеної частинки, яка переносить плазміду між клітинами штамів *H. lacusprofundi*.

Хоча вірусів, які інфікують археї, досить багато, трансдукція в них відбувається рідко. Показано, що лише один вірус архей, який інфікує термофільний метаноген *Methanothermobacter thermautotrophicus*, трансдукує гени хазяїна, але при цьому вивільнюється приблизно шість фагових віріонів на клітину, що робить не практичним використання цієї системи для експериментального перенесення генів.

У домені *Archaea* виявлено різні типи кон'югації. Деякі штами термофільних і ацидофільних *Sulfolobus solfataricus* містять плазміди, які подібно як у бактерій сприяють кон'югації між двома клітинами. Утворення кон'югаційної пари не залежить від утворення пілей. Більша частина генів, що кодують кон'югацію у *S. solfataricus,* мало подібні до таких у грамнегативних бактерій. Винятком є ген, схожий на ген *traG*, розташований на F-плазміді *Escherichia coli*. Білок архейної версії цього гена бере участь у стабілізації кон'югаційної пари. Таким чином, загальний механізм кон'югації в архей суттєво відрізняється від такого в бактерій.

Більшість видів *Sulfolobus* також можуть обмінюватися ДНК без участі плазміди фертильності. Інші археї утворюють між клітинами спеціалізовані структури, що забезпечують генетичний обмін, наприклад, нанотрубки, що переносять ДНК між клітинами виду *Thermococcus*. Утворення цих структур також не залежить від плазмід фертильності.

На відміну від інших описаних способів горизонтального перенесення генів, нанотрубки *Thermococcus* дозволяють здійснювати двонаправлений перенос ДНК. Таким чином, обидві кон'югаційні клітини здатні функціонувати як реципієнти, що, ймовірно, сприяє активному потоку генів. Подібним чином деякі галобактерії утворюють цитоплазматичні канали між спареними клітинами, якими переноситься ДНК.

13.7. Молекулярні механізми захисту від чужої ДНК

Механізми горизонтального перенесення ДНК є ключовим чинником формування різноманітності та еволюції бактерій і архей, однак клітини також мають механізми запобігання горизонтальному перенесенню генів та вірусної інфекції. Кількість фагів у природі набагато перевищує кількість клітин бактерій і архей, тому еволюція сформувала бар'єри на шляху перенесення генів, які є ключовими для збереження цілісності геному та підтримання виду.

Система захисту бактерій та архей від чужорідних генів включає різні механізми (рис. 13.16):

– модифікація рецептора для адгезії вірусу, що перешкоджає розпізнаванню та зв'язуванню з клітиною-хазяїном і вірусна ДНК не може проникнути;

– руйнування чужорідної ДНК ендонуклеазами рестрикції клітини-хазяїна (при цьому ДНК клітини не руйнується, оскільки вона хімічно модифікована в місцях розрізання);

– модифікація чужорідної ДНК ферментами реплікації клітини-хазяїна таким чином, що вона не може реплікуватися;

– запрограмована самоліквідація клітини, що перешкоджає успішній вірусній інфекції;

– кластеризована система з короткими паліндромними повторами (CRISPR), що пов'язані з CRISPR (Cas), руйнує чужорідну ДНК шляхом

виявлення її кластерної РНК та білками Cas як чужої та руйнує її нуклеазою, що забезпечує адаптивний імунітет проти вірусів і плазмід.

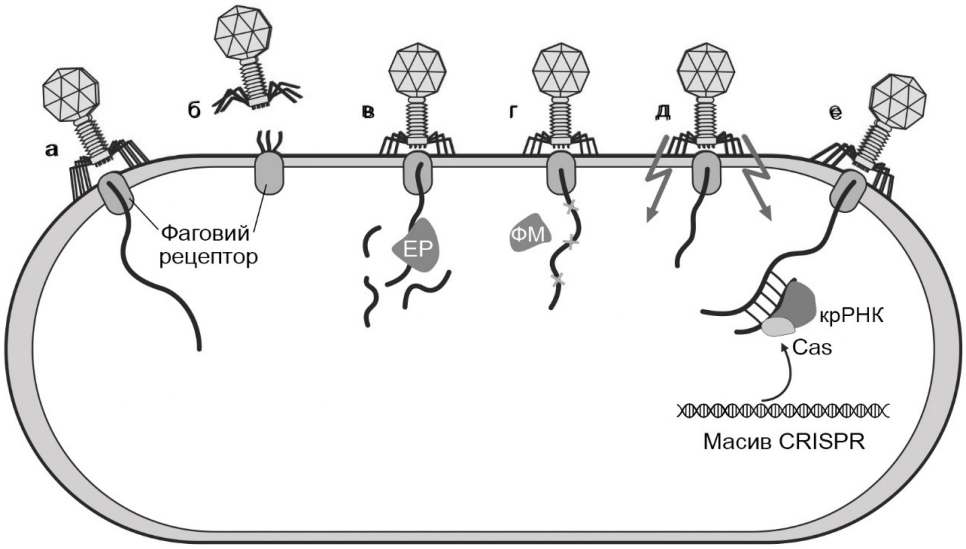


Рис. 13.16. Механізми захисту від горизонтального перенесення генів у бактерій і архей на прикладі фагової інфекції: (а) успішне зараження; (б) модифікація вірусного рецептора; (в) ендонуклеаза рестрикції руйнує чужорідну ДНК; (г) фермент модифікує вірусну ДНК, запобігаючи її реплікації; (д) клітина-хазяїн самоліквідується та таким чином запобігає реплікації вірусу; (е) система CRISPR спеціально розпізнає чужорідну ДНК і руйнує її; ЕР – ендонуклеаза рестрикції; ФМ – фермент модифікації ДНК; крРНК – кластерна РНК; CRISPR – короткі паліндромні повтори; Cas – CRISPR-асоційований білок

Особливу роль в системі захисту від чужорідних генів виконують ендонуклеази рестрикції, які здатні розрізати та руйнувати ДНК. Вони виробляються бактеріями та археями та націлені знищувати чужорідну ДНК, яка потрапляє в клітину. ДНК клітини захищена від дії власних ендонуклеаз рестрикції, оскільки її послідовності розпізнавання ферментів хімічно модифіковані.

Наведені механізми запобігання передачі чужих генів націлені як на ДНК вірусів, так і на хромосомну ДНК та плазмідну ДНК інших бактерій. Оскільки бар'єри для горизонтального перенесення генів повинні відрізняти чужу ДНК від власної ДНК і захищати останню, вони вважаються імунними системами бактерій та архей. Таким чином, процеси, які є неспецифічними, вважаються аналогічними вродженому імунітету, тоді як механізми, спрямовані на конкретну вхідну нуклеїнову кислоту, вважаються формою адаптивного імунітету.

Незважаючи на наявність бактеріальних і архейний форм імунітету, зв'язок між вірусами та клітинами є надзвичайно динамічним. Хоча мі-

кробні клітини володіють певними видами зброї для боротьби з вірусною атакою, бактеріофаги протидіють цим імунним системам шляхом створення механізмів постійної модифікації власної ДНК. Така ситуація, що схожа на постійну мікробну «гонку озброєнь» між клітинами та вірусами, добре вивчена на прикладі бактеріофага Т4 і його клітини-хазяїна *Escherichia coli*.

13.8. Молекулярні механізми набуття антибіотикорезистентності

У природі мікроорганізми-продуценти повинні захищати себе від антибіотиків, які виробляють. Для цього вони повинні володіти механізмами протистояння щоб не піддатися дії свого ж антибіотика. Гени, що кодують білки резистентності у продуцентів антибіотиків називають генами імунітету. Гени імунітету регулюються координовано з генами, що кодують ферменти біосинтезу антибіотиків.

Вважається, що багато генів стійкості до антибіотиків були отримані від бактерій-продуценів, що продукують антибіотики шляхами горизонтального перенесення генів (ГПГ) до непродуцентів. Це призвело до появи значного пулу генів резистентності поза мікроорганізмів-продуцентів в бактеріальних хромосомах, плазмідах, транспозонах та інших мобільних генетичних елементах (МГЕ) бактерій-непродуцентів.

Оскільки гени резистентності часто знаходяться в МГЕ, вони можуть легко переміщатися між клітинами. Окрім отримання генів стійкості за допомогою ГПГ, деякі непродуценти можуть стати стійкими через спонтанні хромосомні мутації. Відомо декілька механізмів формування стійкості до антибіотиків (розділ 20.5).

Часто бактеріальний патоген є стійким до антибіотиків, оскільки він має плазміду, що містить один або декілька генів стійкості; такі плазміди називаються R-плазмідами, або плазмідами резистентності (рис. 13.3).

Як тільки клітина отримує R-плазміду, плазміда (або її гени) може бути досить швидко перенесена в інші клітини механізмами ГПГ. Оскільки одна плазміда може нести гени стійкості до кількох антибіотиків, популяція патогенів може стати стійкою до них одночасно, навіть якщо пацієнт може лікуватися лише одним препаратом.

Гени стійкості до антибіотиків також розташовані в генетичних елементах, відмінних від плазмід. Багато транспозонів містять гени стійкості до антибіотиків і можуть швидко переміщатися між плазмідами в популяції (рис. 13.4). Частина транспозонів є реплікативним. Вони не лише переміщуються, але й залишають свою копію.

Гени резистентності також знаходяться та переміщуються разом з генетичними елементами, які називають інтегративними кон'югаційними елементами (ІКЕ) та мобільні геномні острови (МГО). Ці генетичні елементи мають спільні компоненти та механізми з транспозонами та кон'югативними плазмідами.

ІКЕ, також відомі як кон'югативні транспозони, що несуть гени системи секреції IV типу, системи кон'югації та рекомбінази для інтеграції та ексцизії хромосом. Ці гени забезпечують здатність переносити генетичний елемент до інших організмів шляхом кон'югації. Добре вивченим прикладом ІКЕ є Tn916 з *Enterococcus faecalis,* який може переноситися від *E. faecalis* до різних реципієнтів та інтегруватися в їхні хромосоми.

МГО споріднені з ІКЕ, але вони мобілізують значно більші сегменти ДНК завдяки своєму механізму рекомбінації. Вони включають сайт *att* для рекомбінації із відповідним сайтом у бактеріальній хромосомі (*attC*), яким часто є ген тРНК. Неточна інтеграція та вирізання призводять до горизонтального перенесення великих хромосомних ділянок, які називаються островами. Одним з таких типів островів є острови патогенності, які несуть гени, що кодують фактори вірулентності (розділ 19).

Важливо розуміти, що на експресію цих генів непродуцентами витрачається значна кількість енергії та метаболітів, тому гени резистентності можуть бути втрачені, якщо бактерії постійно не піддаються впливу антибіотика, що є селективною силою, яка підтримує ген стійкості в популяції бактерій.

Важливо, що для підтримки генів стійкості необхідна відносно низька концентрація антибіотика, в той час, як рівні вмісту антибіотиків в навколишньому середовищі часто значно перевищують цю концентрацію. Тому вкрай важливо вжити заходів для раціонального використання антибіотиків, особливо в сільському господарстві.

Питання для самостійного контролю

1. З яких генетичних елементів складається геном бактерій?
2. Які особливості мають інсерційні послідовності та транспозони?
3. Чим схожі та відмінні геноми бактеріофагів та плазміди?
4. Які властивості R-плазміда надає клітині-хазяїну?
5. Дайте визначення термінам мутації та рекомбінації.
6. Які відомі способи обміну генетичною інформацією у прокаріот і їх механізми?
7. Чим трансдукуючий бактеріофаг відрізняється від інфекційного?
8. Яка головна відмінність між генералізованою трансдукцією і трансформацією?
9. Як клітини донора та реципієнта контактують, зближаються та утворюють кон'югаційний канал?
10. Поясніть, як реплікація ДНК дає донору та реципієнту можливість отримати повну копію плазміди при кон'югації?
11. Яким чином F-плазміда *Escherichia coli* бере участь в перенесенні хромосомної ДНК?
12. Опишіть, яким чином клітини бактерій і архей можуть уникнути чужорідної ДНК та як віруси можуть подолати цей захист?

РОЗДІЛ 14
ЕВОЛЮЦІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Будь-які питання мікробіології, як і біології взагалі, потрібно розглядати в зв'язку з процесами еволюції. Хоча еволюційні події та процеси значною мірою є здогадками, геологічні та молекулярно-біологічні свідчення дають підстави для побудови вірогідного сценарію найбільш ранніх подій в еволюції життя та розуміння фундаментального впливу мікроорганізмів на історію життя на нашій планеті.

Вважається, що перші мікроорганізми з'явились приблизно біля 4,0 млрд років тому, коли Земля була безкисневою (рис. 14.1). Потім сформувались бактерії та археї, які були присутні на Землі вже приблизно 3,8 млрд. років тому та заселили всі придатні для життя середовища. Ендосимбіотичне об'єднання клітини *Bacteria* і *Archaea* дало початок еукаріотичним клітинам. Таким чином сформувалися три домени клітинних організмів: *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya*.

Впродовж перших 2 млрд років існування Землі атмосфера була безкисневою та містила переважно молекулярний азот, вуглекислий газ, метан, сірководень та інші гази. Тому лише анаеробні мікроорганізми могли з'явитися та еволюціонувати в умовах відсутності кисню.

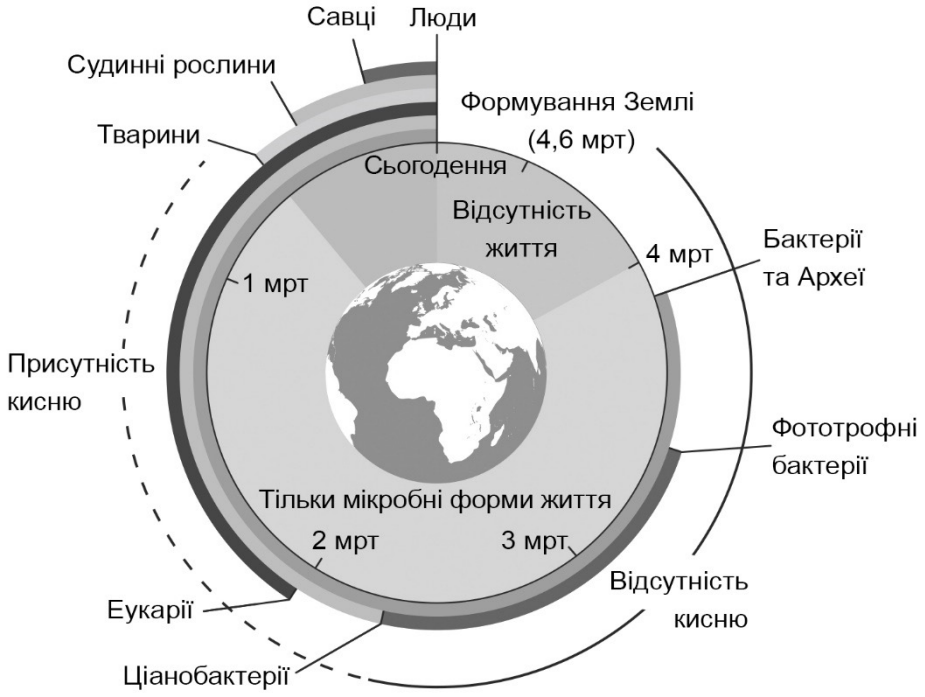


Рис. 14.1. Загальна схема історії життя на Землі (мрт – мільярди років тому)

Насичення атмосфери киснем, завдяки життєдіяльності ціанобактерій, розтягнулось на приблизно 2,0 млрд років, і сучасний рівень O_2 в атмосфері був досягнутий приблизно 500–800 млн років тому.

Поява фототрофних мікроорганізмів відбувалась через мільярд років після утворення Землі. Перші фототрофи (аноксигенні), наприклад, пурпурові сірчані бактерії та відомі нам сьогодні зелені сірчані бактерії не виробляли кисень (рис. 14.2). Першими фототрофами, що виробляють кисень були ціанобактерії, які з'явились майже мільярд років потому, і з цього часу почався повільний процес насичення земної атмосфери киснем.

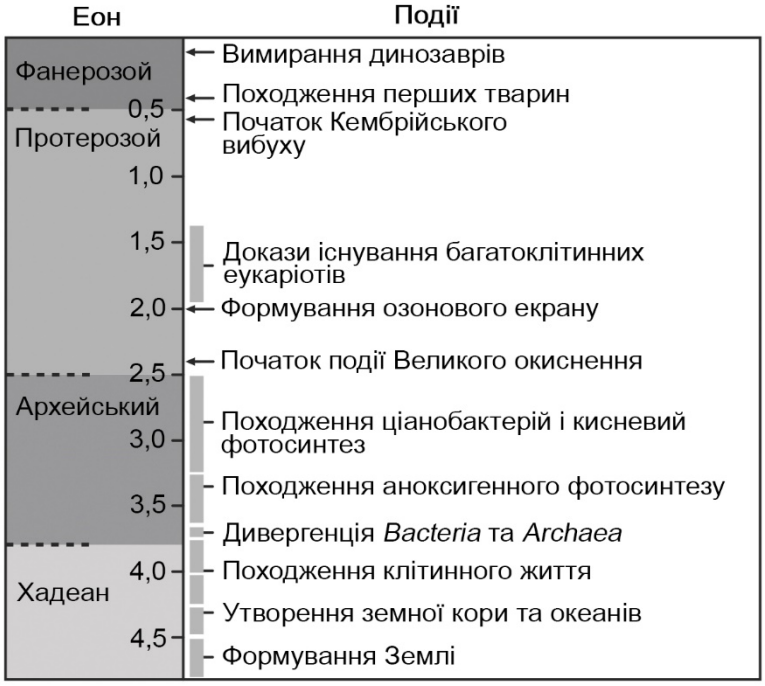


Рис. 14.2. Основні події біологічної еволюції

Близько півмільярда років після початку насичення земної атмосфери киснем виникли багатоклітинні форми життя, кульмінацією яких стали рослини та тварини, які існують лише близько півмільярда років.

Отже, 80% історії життя було одноклітинним, тому Землю можна вважати мікробною планетою. Усі організми трьох лінії мікробних клітин – *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya* мають певні характеристики і певні гени, які виявляються в усіх клітинах. Наприклад, приблизно 60 універсальних генів присутні в клітинах всіх трьох доменів. Дослідження цих генів показує, що представники всіх трьох доменів походять від останнього універсального спільного предка (LUCA). Після появи мікроорганізми еволюціонували та зайняли всі придатні для життя середовища на Землі.

Безплідне море нашої планети, що сформувалась 4,6 млрд років тому, стало інкубатором, в якому через 0,6 млрд років з'явилось життя. Через відсутність скам'янілих решток більшість висновків про те, що відомо про історію ранньої Землі, було зроблено з хімічного та ізотопного аналізів стародавніх порід і корисних копалин. Про давні еволюційні події виникнення живих організмів та їхню спільну історію походження можна робити висновки в результаті порівняння їхніх молекулярних структур та послідовностей нуклеотидів.

Історія життя починається незабаром після утворення самої Землі (рис. 14.2). Рання Земля залишалась стерильною біля 0,5 млрд років. Вода на Землі виникла з численних крижаних комет і астероїдів, що падали на Землю, та з викидів вулканічних газів з надр планети, а незабаром після цього з'явились і перші форми життя.

14.1. Походження клітинного життя

Експериментальні докази вказують на те, що органічні молекули, такі як нуклеотиди, амінокислоти та ліпіди можуть утворюватися спонтанно за умов, що були присутні на ранній Землі, створюючи необхідні передумови для появи перших живих систем.

Походження клітинного життя на Землі залишається найбільшою таємницею. Одна з гіпотез передбачає, що життя могло виникнути в гідротермальних системах на дні океану, захищених від смертельного ультрафіолетового випромінювання на поверхні Землі та наявності багатих на енергію відновлених неорганічних сполук – водню (H_2), сірководню (H_2S) і елементарної сірки (S^o). Унікальна геохімія цих місць могла підтримувати абіотичне виробництво молекул, необхідних для виникнення життя – амінокислот, ліпідів, цукрів і нуклеотидів.

Гаряча, багата мінералами гідротермальна рідина змішується з прохолодною, більш окисненою водою океану, утворюючи відкладення сполук заліза та сірки, глини, силікатів і карбонатів. Ці мінеральні відкладення утворюють пористі компартменталізовані мінеральні структури, що могли служити енергетично багатими відсіками, місцем для доклітинних біохімічних реакцій, формування градієнта протонів і генерації АТФ для реплікації доклітинних біологічних молекул та сприяти еволюції доклітинних форм життя. З часом мембрани беруть на себе роль мінеральних комірок, що призводить до утворення першої клітини.

Головним компонентом першої системи, що самовідтворюється, ймовірно, були молекули РНК (рис. 14.3), які можуть виконувати різноманітні функції. Наприклад, молекули РНК є кістяком певних молекул, необхідних для всіх клітин, таких як АТФ (носій енергії), НАДН (переносник електронів та протонів) і Коензим А (учасник багатьох реакцій біосинтезу). РНК також може зв'язувати малі молекули (такі як нуклеотиди та амінокисло-

ти), каталізувати певні прості біохімічні реакції та можуть бути матрицею для власного синтезу. Крім того, молекули РНК (рРНК, тРНК, мРНК) беруть участь у синтезі білка.

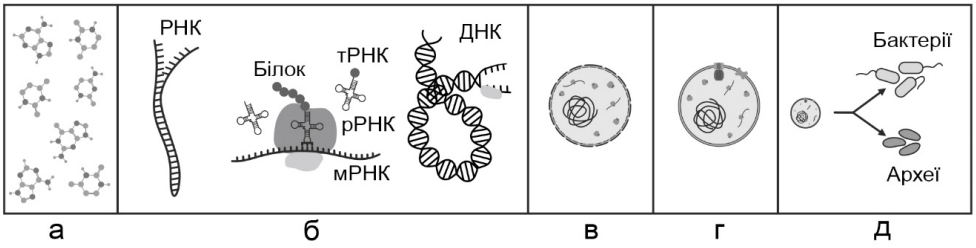


Рис. 14.3. Гіпотетичні події виникнення клітинного життя: (а) Абіогенний синтез біологічних будівельних блоків: амінокислот, нуклеотидів, цукрів. (б) Доклітинне життя: каталітична РНК; РНК, що самореплікується; синтез білка; реплікація та транскрипція ДНК. (в) Протоклітина: подвійний шар ліпідів; перші клітини. (г) Раннє клітинне життя: LUCA; механізми генерації енергії; активний обмін генами. (д) Початок еволюційної дивергенції: комплект-реплікація ДНК, транскрипція, трансляція; розходження доменів *Bacteria* та *Archaea*

Отже, вважається, що найдавніші форми життя базувалися виключно на РНК і не потребували ДНК чи білків. Зрештою, однак, білки, що синтезуються за участі молекул РНК, замінили каталітичну роль РНК у примітивних клітинах, оскільки білки можуть каталізувати багато реакцій, які не можуть здійснювати РНК. На наступному етапі молекула ДНК, яка за своєю структурою стабільніша за РНК, взяла на себе роль геному і стала матрицею для синтезу РНК (рис. 14.3). Найдавніші клітинні форми життя, ймовірно, мали елементи цієї трикомпонентної системи – ДНК, РНК, білок та мембрану, здатну формувати градієнт протонів, генерувати АТФ та утримувати вміст клітини.

Останній універсальний спільний предок усього існуючого зараз життя (LUCA), ймовірно, з'явився близько 4,0 млрд років тому. Після цього гілки доменів *Bacteria* і *Archaea* розійшлися і прокаріотне життя почало розвиватися в клітинній формі, яку ми знаємо сьогодні.

14.2. Останній універсальний спільний предок

Після появи клітинного життя мікроорганізми, ймовірно, тривалий період піддавались метаболічній диверсифікації, формуючи шляхи та механізми використання різноманітних джерел енергії, доступних на Землі. Протягом більшої частини історії Землі планета, включно з усіма її океанами, була безкисневою (рис. 14.1), тому енергетичний метаболізм примітивних клітин мав бути виключно анаеробним.

Органічна речовина була практично відсутня, тому ранні клітини, ймовірно, були хемолітотрофами, використовуючи як донори електронів

такі речовини як H_2 і H_2S, що викидаються з вулканів і гідротермальних джерел. Незалежно від джерела молекулярний водень (H_2) був основою примітивного енергетичного обміну, заснованого на рушійній силі протонів. Елементарна сірка (S^o), яка також поширена на ранній Землі, була, ймовірно, одним із перших акцепторів електронів при окисненні H_2. Оскільки на ранній Землі органічного вуглецю було мало, перші хемолітотрофи, ймовірно, використовували CO_2 і N_2 як основні джерела вуглецю та азоту для біосинтезу.

Аналізуючи вміст генів живих організмів на дереві життя можна ідентифікувати ті гени, що найбільш ймовірно були присутні у самих ранніх клітинах. Загалом виявлено 355 генів останнього універсального предка. Ці гени вказують на те, що LUCA був анаеробним організмом, який жив у високотемпературному середовищі, багатому на сірку та залізо, і використовував H_2 як джерело енергії та CO_2 як джерело вуглецю. Характерні властивості LUCA дають підстави припускати, що він міг жити в гідротермальному середовищі.

Як не дивно, ці клітини мали весь генетичний апарат, необхідний для реплікації, транскрипції та трансляції ДНК, а також АТФ-синтетазу. Ранні клітини мали хемолітотрофний тип метаболізму, здатність використовувати H_2 і CO_2, синтезувати необхідні органічні сполуки та, ймовірно, виробляти ацетат (ацетогени) або метан (метаногени) як відходи їхнього метаболізму.

З часом утворений органічний матеріал накопичувався, що створило необхідні умови для появи та еволюції хемоорганотрофних бактерій з різноманітними метаболічними стратегіями отримання енергії шляхом окиснення органічних сполук.

Поява та еволюція фотосинтезу були біологічним проривом, який радикально змінив хімічний склад Землі. Перші фототрофи на Землі були аноксигенними (не виробляли O_2). З них утворились ціанобактерії – перші фототрофи, що продукують кисень, який почав накопичуватися. Зрештою Земля стала кисневою планетою. Таким чином, мікроорганізми забезпечили ключові геохімічні зміни та кисневий етап в історії Землі. З часом накопичення кисню в біосфері стимулювало подальшу диверсифікацію мікробного життя.

У гірських породах знайшли скам'янілі мікробні утворення – строматоліти, яким 3,5 млрд років, що є одними з найдавніших свідчень існування життя на Землі. Строматоліти або «шаруваті породи» утворюються, коли мікроорганізми викликають відкладення карбонатних або силікатних мінералів, що скам'яніли. Строматоліти були різноманітні і поширені на Землі між 2,8 і 1,0 млрд. років тому.

Сучасні приклади цієї стародавньої мікробної екосистеми можна знайти в деяких мілководних морських басейнах (рис. 14.4) або в гарячих джерелах. Фототрофні бактерії, наприклад, ціанобактерії та аноксигенні

фототрофи відіграють центральну роль в утворенні сучасних строматолітів. Стародавні строматоліти містять мікрофосилії, які виглядають надзвичайно схожими на сучасні види фототрофних бактерій.

Здатність використовувати сонячне світло як джерело енергії дозволила фототрофам значно урізноманітнитися. Впродовж 2,5–3,3 млрд років тому еволюційна лінія ціанобактерій розвинула фотосистему, здатну до кисневого фотосинтезу, в якому H_2O замінив H_2S як джерело електронів для генерації відновника, що використовується при фіксації CO_2, утворюючи O_2 як відходи. Шляхом ендосимбіозу з'явилися еукаріотичні оксигенні фототрофи, які можна побачити в літописі мікрофосилій.

Походження кисневого фотосинтезу та накопичення O_2 в атмосфері Землі (рис. 14.1) викликало найбільшу зміну в історії нашої біосфери та заклало основу для еволюції нових і ще складніших форм життя, які еволюціонували, щоб використовувати енергію, доступну через дихання з O_2. Мікроорганізми, які розвинули здатність дихати, використовуючи O_2, виробляли більше енергії та могли розмножуватися набагато швидше ніж анаероби.

14.3. Історія життя, записана в ДНК

Еволюційне походження мікроорганізмів залишалося загадкою до того як відкрили, що певні молекулярні послідовності є записом еволюційної історії. Мутації виникають випадково і накопичуються з часом, викликаючи спадкові зміни в послідовності ДНК, що керують еволюційним процесом. Отже, організми, які мають спільного недавнього предка, мають схожу послідовність ДНК, а у організмів, які є більш віддаленими мають більш несхожі послідовності ДНК. Це означає, що ми можемо реконструювати еволюційну історію або філогенез за набором споріднених послідовностей ДНК шляхом аналізу подібності їх нуклеотидних послідовностей.

На універсальному дереві життя зображена еволюційна історія всіх клітин, що демонструє концепцію трьох доменів, згідно з якою всі клітини можна класифікувати як *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya*. Корінь універсального дерева – це момент часу, коли з'явився останній універсальний загальний предок усього живого сьогодні на Землі – LUCA (рис. 14.4). Універсальне дерево життя показує якими були перші мікроорганізми та які з них були домінуючою формою життя впродовж більшої частини історії життя на Землі.

Геноміка підтверджує концепцію трьох доменів шляхом філогенетичного аналізу більшості генів, які є центральними для функціонування клітини. Наприклад, принаймні 60 генів (включаючи гени рРНК) спільні для майже всіх сучасних клітин, і ці гени, ймовірно, були присутні в універсального предка. Більшість цих генів кодують основні функції транскрипції, трансляції та реплікації ДНК. Через ці консервативні гени представ-

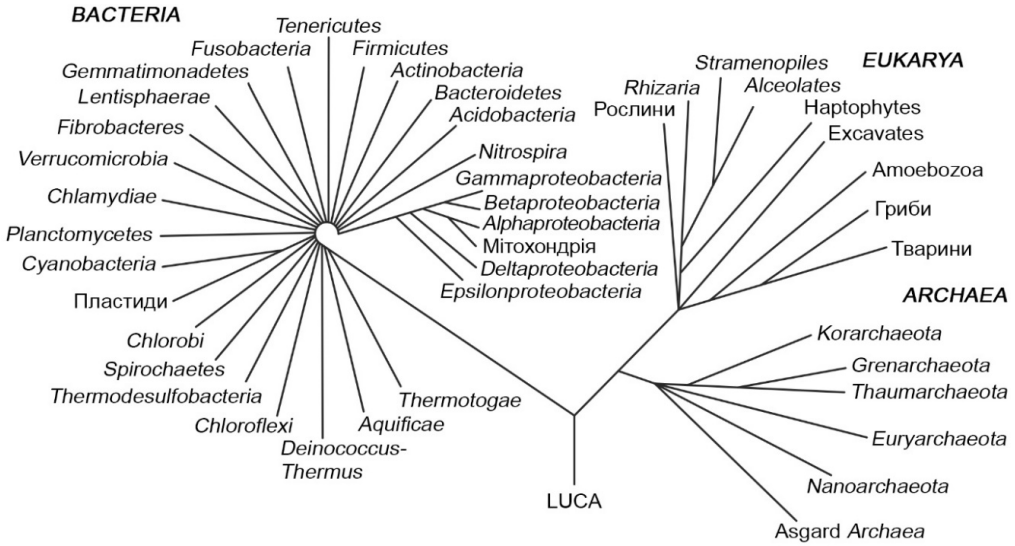


Рис. 14.4. Схема універсального філогенетичного дерева, побудованого за результатами порівняльного аналізу послідовностей генів 16S/18S рРНК

ники домену *Eukarya* демонструють більшу подібність послідовностей до *Archaea*, ніж до *Bacteria*. Ці та інші дані підтверджують висновок про те, що *Bacteria* та *Archaea* розійшлися раніше появи еукаріотичних клітин.

14.4. Горизонтальне перенесення генів і дерево життя

Спосіб, у який було створено три домени, залишається темою дискусії. Не викликає сумнівів, що три домени представляють основні еволюційні лінії клітин, які існують на Землі, а також те, що *Bacteria* та *Archaea* розійшлися до розходження *Eukarya* від *Archaea*. Однак є багато прикладів спільних генів між будь-якими двома з трьох доменів.

Одна з гіпотез полягає в тому, що на початку історії життя, до того як первинні домени розійшлися, активно відбувався горизонтальний перенос генів. Протягом цього часу будь-які гени, які забезпечували значну вигоду, ймовірно, досить швидко переносились серед ранніх форм життя. У процесі розходження доменів з часом виникли перешкоди для необмеженого горизонтального переносу генів з метою підтримки геномної стабільності.

У результаті утворені раніше безладні популяції клітин почали розходитися на первинні лінії еволюційного походження, які ми розпізнаємо сьогодні. Проте здатність генів до горизонтального переміщення між різними мікробними видами ускладнює наше розуміння їх родинних звязків. Ймовірно, що домени *Bacteria* та *Archaea* вже розійшлися приблизно 3,7 млрд. років тому. Наступним було подальше розходження, десь між 2,7 і 1,5 млрд. років тому, коли *Eukarya* відокремилися від *Archaea* та утворили окремий домен.

У подальшому кожен домен продовжував еволюціонувати і певні риси закріплювалися всередині кожної групи, породжуючи безліч генетичних, фізіологічних і структурних відмінностей. Після майже 4 млрд років мікробної еволюції отримано грандіозний результат – три домени клітинного життя, кожен з яких є еволюційно відмінним, але має певні риси, що виявляють їх спільне походження від універсального клітинного предка.

14.5. Походження та еволюція еукаріотичної клітини

Походження та еволюція еукаріотичних клітин, які є генетичними химерами, що містять гени як від архей, так і від бактерій, стали важливою віхою в клітинній еволюції, яка проклала шлях до розвитку всього комплексу багатоклітинних організмів.

Приблизно половину часу існування життя Земля була безкисневою, і всі живі істоти мали структуру прокаріотичної клітини. Походження еукаріотичної клітини та еволюція багатоклітинності збігаються в часі приблизно з насиченням земної атмосфери киснем.

Однак походження еукаріотичної клітини залишається неясним. Найдавніші мікрофосилії, які мають розпізнані ядра, налічують близько 2 млрд років. За 0,6 млрд років до того, як O_2 досяг близького до сучасного рівня, у морі були присутні великі багатоклітинні організми. За відносно короткий геологічний час багатоклітинні еукаріоти урізноманітнилися в предків сучасних водоростей, рослин, грибів і тварин під час так званого «кембрійського вибуху» (рис. 14.2).

В еволюції залишається невирішеним питання, яким шляхом виникла еукаріотична клітина. Наразі зрозуміло, що сучасна еукаріотична клітина є генетичною химерою, що містить гени як від бактерій, так і від архей. Аналізуючи геноми живих організмів на дереві життя (рис. 14.4), можемо ідентифікувати ті гени, які, швидше за все, були в останнього еукаріотичного спільного предка – LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor), предка всіх еукаріотичних організмів.

Загалом близько 4000 генів відносяться до LECA і цей організм мав усі характерні ознаки еукаріотичної клітини. Він мав ядро, мітохондрії, що здійснюють процеси дихання, використовуючи O_2, органели, складний цитоскелет, механізм сплайсосоми, гени з інтронами та інші еукаріотичні характеристики. Понад 70% із цих 4000 генів існують лише в еукаріотів, що однозначно демонструє, що *Eukarya* є унікальним доменом життя, який однозначно відрізняється від доменів *Bacteria* та *Archaea*.

LECA має спільні гени як з *Bacteria*, так і з *Archaea*. З цих генів близько двох третин походять від *Bacteria*, тоді як інша третина походить від *Archaea*. Гени бактеріального походження кодують переважно метаболічні функції, тоді як гени архейного походження кодують механізми обробки інформації клітини. Наприклад, еукаріотичні клітини мають спільні з архейними молекулярні особливості транскрипції та трансляції, а риси,

спільні для еукаріот і бактерій, включають їх мембранні ліпіди і гліколітичний шлях.

Визнано, що придбання мітохондрій було основною критичною подією, яка призвела до виникнення еукаріотичної клітини та заснування домену *Eukarya*. Також вважається, що більшість із бактеріальних генів, які виявлені в еукаріотичних геномах, були перенесені з геному мітохондріального предка. Походження самої клітини-хазяїна з ядром, що придбала мітохондрію, залишається предметом дискусій.

На користь підтвердження гіпотези про те, що *Archaea* є предками *Eukarya* використовується той факт, що гени, які кодують реплікацію ДНК, транскрипцію та трансляцію в *Eukarya,* походять від *Archaea*. Встановлено, що геноми архей *Lokiarchaeota* містять ряд еукаріотних особливостей, які свідчать про наявність цитоскелета, схожого на еукаріотний, і здатність синтезувати внутрішньоклітинні мембрани. Ці ознаки *Lokiarchaeota* є доказом того, що вони можуть бути близькими предками клітинної лінії, яка дала початок *Eukarya*.

Походження органоїдів в еукаріотичній клітині добре пояснюється підтвердженою ендосимбіотичною теорією, в якій запропоновано два сценарії (рис. 14.5). Ця теорія стверджує, що мітохондрія сучасних еукаріотів виникла в результаті стабільного включення бактерії, здатної до аеробного дихання в цитоплазму ранньої еукаріотичної клітини.

Ендосимбіотичні бактерії могли бути корисними для ранніх еукаріотичних клітин, оскільки вони збільшували б енергетичний потенціал клітини, і таким чином ранні клітини, що містили мітохондрії, почали ставати предками всіх представників *Eukarya*. Практично всі еукаріотичні клітини мають мітохондрії, хоча ці структури згодом були втрачені в певних лініях анаеробних мікробних еукаріотів.

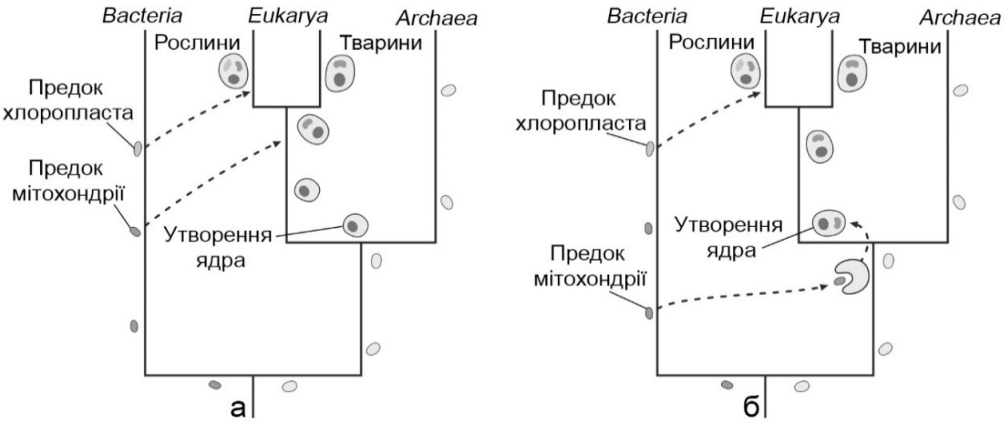


Рис. 14.5. Можливі варіанти ендосимбіотичного походження еукаріотичної клітини: а – гіпотеза серійного ендосимбіозу, б – гіпотеза симбіогенезу

Друга ендосимбіотична подія у родоводі еукаріотів також мала великий вплив на еволюцію життя. Це поява хлоропластів, які виникли після придбання мітохондрій у результаті включення ціанобактеріоподібної клітини в цитоплазму еукаріотичної лінії, що дало початок фотосинтезу в еукаріотів (рис. 14.5).

Звертає на себе увагу положення мітохондрій та пластид (хлоропластів) на універсальному філогенетичному дереві (рис. 14.4), що є підтвердженням ендосимбіотичної теорії їх походження.

Гіпотеза *серійного ендосимбіозу* припускає, що еукаріотичний предок відділився від архейної лінії, оволодів ядром і іншими особливостями еукаріотичної клітини до ендосимбіозу з бактеріальним предком мітохондрії (рис. 14.5 а). Пізніше ендосимбіоз з ціанобактеріальним предком хлоропласта дав початок еукаріотичному предку всіх рослин та інших фотосинтетичних еукаріотів.

Гіпотеза *симбіогенезу* припускає, що еукаріотична клітина розвинулась із симбіотичних відносин бактерій та архей (рис. 14.5 б). Бактеріальний партнер був зрештою поглинений своїм архейним партнером і еволюціонував з часом в мітохондрію. Ядро, хлоропласти та інші структури еукаріотичної клітини виникли після появи мітохондрії.

Одна з версій симбіогенезу передбачає, що еукаріотична клітина виникла в результаті асоціації між представником виду H_2-продукуючої *Bacteria* і H_2-споживаючим представником виду *Archaea*. «Воднева гіпотеза» передбачає, що бактеріальна клітина була факультативним аеробом і хемоорганотрофом, який міг рости за рахунок аеробного дихання та синтрофно утворював H_2.

Архейний партнер був анаеробним хемолітотрофом, якому потрібен H_2 для росту. Ці симбіотичні партнери могли еволюціонувати разом тривалий період до поглинання бактерій та формального розвитку мітохондрій. Пізніший ендосимбіоз з ціанобактерійним предком хлоропласта дав початок еукаріотичному предку всіх рослин і всіх інших фотосинтезуючих еукаріотів.

Усі фототрофні еукаріоти (рослини та водорості), походять від лінії клітин, які набули ендосимбіотичні хлоропласти (рис. 14.6). Ці ендосимбіотичні події суттєво урізноманітнили метаболізм ранніх еукаріотичних клітин, у яких мітохондрії забезпечили аеробне дихання, а хлоропласти – здатність до використання сонячного світла для отримання енергії. Ендосимбіотичне походження органел заклало основу для диверсифікації *Eukarya* на форми, які відомі сьогодні.

Найдавнішим підтвердженням ендосимбіотичної теорії є те, що хлоропласти та мітохондрії мають приблизно однаковий розмір з бактеріями, і вони незалежно розмножуються в цитоплазмі еукаріотичної клітини. Однак, ендосимбіотична теорія залишається в силі в основному на доказах, отриманих з молекулярної біології.

По-перше, мітохондрії та хлоропласти містять власні геноми, що складаються з бактеріальних генів. Їх хромосоми є кільцевими, як у бактерій, і кодують білки дихального ланцюга (мітохондрії) і фотосинтетичного апарату (хлоропласти), а також рибосомні РНК і транспортні РНК.

По-друге, і мітохондрії, і хлоропласти містять бактеріальні рибосоми. Послідовності генів 16S рРНК мітохондрій і хлоропластів також характерні для бактерій, а аналіз послідовності нуклеотидів розміщує предка мітохондрій у філумі *Proteobacteria,* а предка хлоропластів у філумі *Cyanobacteria* (рис. 14.4).

По-третє, ті самі антибіотики, які пригнічують функцію рибосом у вільноживучих бактерій, пригнічують функцію рибосом у цих органелах.

По-четверте, ядро еукаріот містить гени, що походять з домену *Bacteria*. Геномні послідовності хромосом еукаріотичних клітин містять гени, які кодують функції, специфічні для мітохондрій і хлоропластів. Більше того, оскільки ці послідовності генів більше схожі на ті, що є у домені *Bacteria*, ніж у доменах *Archaea* чи *Eukarya*, зроблено висновок, що ці гени були перенесені в ядро від предків мітохондрій і хлоропластів на початкових етапах ендосимбіозу.

Первинні ендосимбіози. Ендосимбіоз відіграв важливу роль у походженні та диверсифікації еукарій. Усі еукарії походять від клітин, які містили мітохондрії. Мітохондрії розвинулись через ендосимбіоз, під час якого предок *Eukarya* утворив симбіотичні стосунки з бактеріальною клітиною. Хлоропласти, як і мітохондрії, були також отримані через первинний ендосимбіоз (рис. 14.6).

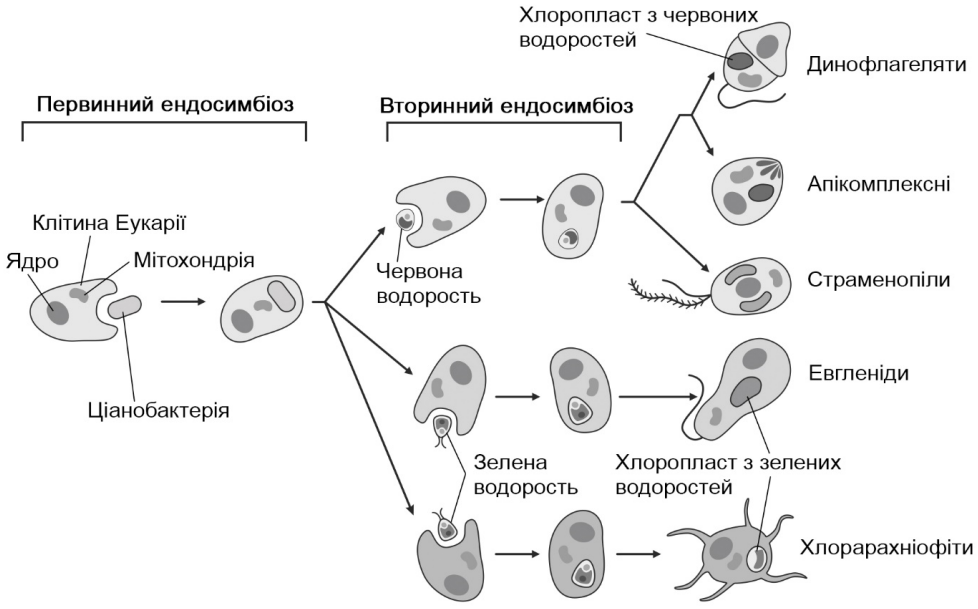


Рис. 14.6. Первинний і вторинний ендосимбіози

У цьому випадку еукаріотична клітина, яка вже містила мітохондрію, придбала фототрофну ціанобактерію як ендосимбіонт. Як і мітохондрії, ціанобактерія ендосимбіонт розвинула взаємозалежність зі своїм еукаріотичним хазяїном поки вони не стали нерозлучними. Первинний ендосимбіоз з ціанобактерією дав початок лінії *Archaeplastida*, яка включає зелені водорості, червоні водорості та рослини (рис. 14.7).

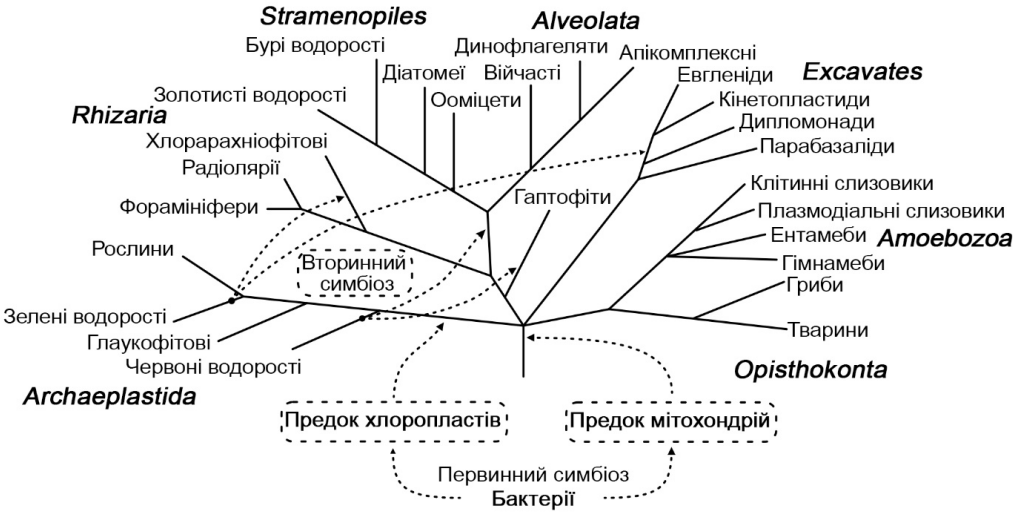


Рис. 14.7. Філогенетичне дерево домену *Eukarya*: пунктирні лінії позначають первинні ендосимбіози мітохондрій і хлоропластів та вторинний ендосимбіоз червоних і зелених водоростей

Вторинний симбіоз. Слідом за первинним ендосимбіозом кілька різних груп протистів придбали хлоропласти шляхом вторинного ендосимбіозу. Вторинний ендосимбіоз виникає, коли клітина, яка вже містить ендосимбіонт, поглинається другою клітиною-хазяїном (рис. 14.6). Наприклад, багато протистів стали фототрофними, придбавши ендосимбіонтні водорості, які вже містили хлоропласт. З часом багато рис водоростевого ендосимбіонта були втрачені, але його хлоропласти залишилися, як і здатність здійснювати фотосинтез.

Вторинний ендосимбіоз відбувався кілька разів протягом еволюції *Eukarya*, що дає початок різноманіттю фототрофних еукаріотів (рис. 14.6). Хлоропласти евгленід і хлорарахніофітів були отримані шляхом вторинного ендосимбіозу із зеленими водоростями, тоді як водорості *Alveolata* (інфузорії, апікомплексні, динофлагеляти) і *Stramenopiles* були отримані шляхом вторинного ендосимбіозу з червоними водоростями (рис. 14.6; 14.7).

Предкові хлоропласти червоних водоростей були, очевидно, втрачені в деяких лініях, таких як інфузорії, або значно зменшились в розмірах в таких як апікомплексні. У деяких інших організмів, таких як динофлагеляти,

хлоропласт червоних водоростей був повністю замінений хлоропластами інших водоростей, у тому числі зелених.

Спадщину ендосимбіозу можна виявити навіть якщо ендосимбіонт втрачається, тому що деякі ендосимбіонтні гени передаються хазяїну і стають частиною геному хазяїна. Ці гени потім виявляються під час секвенування геному.

Ці численні приклади ендосимбіотичних подій підкреслюють значення ендосимбіозу в еволюції та диверсифікації мікробних еукаріотів. Малоймовірно, що первинні ендосимбіонтні події відбулися лише двічі в еволюційній історії. Вторинні ендосимбіози, як відомо, траплялись кілька разів у кількох лініях (рис. 14.6). Є навіть приклади тварин, які поглинають фототрофних протистів для здійснення фотосинтезу протягом певного тривалого часу. Очевидно, ендосимбіози є звичайним і постійним явищем у еукаріотичному світі.

Походження ядра було вирішальним для еволюції еукаріотичної клітини, але мало що про це відомо. Навіть не зрозуміло чи з'явилось ядро до чи після ендосимбіотичного походження мітохондрій. Одна гіпотеза походження ядра полягає в тому, що його утворення пов'язане з еволюцією процесингу РНК в *Eukarya*. На противагу до генів бактерій і архей, еукаріотичні геноми містять часті інтрони.

Для належної експресії генів у *Eukarya* сплайсинг РНК повинен видаляти інтрони перед трансляцією. Еукаріотичні клітини мають молекулярний комплекс, який називається сплайсосомою, що здійснює сплайсинг РНК і функціонує в ядрі клітини. Отже, ядерна мембрана, можливо, розвинулась в *Eukarya* як механізм для відокремлення сплайсосоми.

14.6. Механізми створення генетичної мінливості та еволюції мікроорганізмів

Геноми мікроорганізмів змінюються з часом через мутації, генетичну рекомбінацію та горизонтальне перенесення генів. Хоча багато основних принципів еволюції зберігаються в усіх лініях життя, певні аспекти мікробної еволюції не притаманні для рослин і тварин.

Генетична різноманітність формується завдяки мутаціям – випадковим змінам послідовності нуклеотидів ДНК, які накопичуються з часом, і є основним джерелом природних варіацій, що рухають еволюційний процес. Більшість мутацій нейтральні або шкідливі, а деякі можуть бути корисними.

Мутації піддаються селективному тиску природного середовища, який визначає чи збережеться мутація в популяції та стане формою зміненого мутацією гена – алелем, який є альтернативною версією цього гена. Існування алелів для кожного гена в геномі означає, що кожен організм у популяції може мати унікальний набір алелів, які складають його геном, тобто його генотип.

Нові алелі та нові гени виникають також у результаті рекомбінацій (див. розділ 13), а зміни в частотах алелів можуть відбуватися через різноманітні процеси. Ці прості механізми викликають походження та розходження мікробних видів.

Механізми подвоєння гена створюють надлишкову його копію, яку може модифікувати мутація без втрати функції, закодованої вихідним геном. Отже, дублювання гена дозволяє диверсифікувати його функцію.

Статеве розмноження та генетична мінливість. Передача генів від батьків до потомства є вертикальним перенесенням генів, що спостерігається в усіх організмів. В еукаріотів, здатних до статевого розмноження, вертикальне перенесення генів супроводжується генетичною рекомбінацією, яка відбувається шляхом кросинговеру між сестринськими хромосомами під час мейозу та створює нові комбінації алелів на гомологічних хромосомах в результаті злиття гамет. У результаті цих рекомбінацій організми-нащадки не ідентичні своїм батькам або один одному.

Горизонтальне перенесення генів як механізм генетичної мінливості. Окрім мутацій мікроорганізми використовують інші механізми для створення генетичної мінливості. Механізми, за допомогою яких генеруються нові комбінації генів, пов'язані з рекомбінацією, процесом, у якому одна або декілька молекул нуклеїнової кислоти перебудовуються або комбінуються для утворення нового рекомбінантного генотипу. Процеси рекомбінації здійснюють перегрупування генетичного матеріалу, який уже присутній у геномі, та чужої ДНК, отриманої шляхом горизонтального перенесення генів (ГПГ).

Чужа ДНК може потрапити до клітин бактерій та архей безпосередньо з навколишнього середовища (трансформація), перенесена з клітини-донора (кон'югація) або транспортована бактеріофагом (трансдукція). Перенесення ДНК в обох доменах забезпечують також нанотрубки та мембранні везикули. ГПГ відрізняється від вертикального перенесення генів тим, що гени з одного організму переносяться до іншого організму та часто створюють стабільний рекомбінант.

Важливість ГПГ не можливо переоцінити. ГПГ є поширеним явищем і основним механізмом, за допомогою якого бактерії та археї еволюціонують. Відомо багато прикладів перенесення ДНК між віддалено спорідненими мікроорганізмами та навіть між доменами.

Важливим прикладом цього є перенесення груп генів, що кодують фактори вірулентності, від патогенів до інших бактерій кластерами генів, що називаються островами патогенності. Їх відкриття дало розуміння еволюції патогенних бактерій. Іншим наочним прикладом ГПГ є поширення генів стійкості до антибіотиків серед бактерій за впливу факторів навколишнього середовища.

Доля фрагмента ДНК донора, що потрапляє в клітину реципієнта може бути різна. Коли донорна ДНК має послідовність, гомологічну хро-

мосомі реципієнта, між ними може відбутися гомологічна рекомбінація (сегмент ДНК донора замінює гомологічний сегмент ДНК реципієнта). Утворений рекомбінант розмножується та формує популяцію стабільних генетичних варіантів.

При сайтспецифічній рекомбінації донорна ДНК, що не має гомологічної послідовності (плазміди, транспозони, вірусні геноми) може інтегруватися в хромосому хазяїна. Якщо донорна ДНК здатна до самореплікації (наприклад, плазміда), вона може існувати та розмножуватися окремо від хромосоми реципієнта та передаватися нащадкам. Тоді як донорна ДНК, що не здатна до самореплікації, розщеплюється нуклеазами та елімінує.

При гомологічній рекомбінації здійснюється обмін між короткими сегментами хазяйської та донорної (чужої) ДНК з дуже подібною послідовністю. Навпаки, сайтспецифічна рекомбінація забезпечує перегрупування генетичного матеріалу декількома механізмами, які не вимагають високих рівнів подібності послідовностей для забезпечення успішної інтеграції ДНК.

Селективний тиск і генетичний дрейф. Мутації піддаються селективному тиску, який визначає чи мутація збережеться в популяції та стане альтернативною формою зміненого мутацією гена, яка називається алелем. Існування алелів для кожного гена в геномі означає, що кожен організм у популяції може мати унікальний набір алелів, що складають його геном, тобто його генотип.

Нові алелі та нові гени виникають, коли мутація та рекомбінація викликають варіативні зміни в генних послідовностях. Еволюція відбувається, коли протягом багатьох поколінь в популяції змінюється частота різних алелів. Біологи-еволюціоністи описали багато різних механізмів, які можуть керувати цим еволюційним процесом, але головними з них є сили добору та генетичного дрейфу.

Селективний тиск або тиск добору визначається на основі здатності організму виробляти потомство і брати участь у генетичному складі майбутніх поколінь. Більшість мутацій є нейтральними по відношенню до пристосованості та, як наслідок, вони не впливають на виродження генетичного коду клітини. Ці мутації, зазвичай, накопичуються в ДНК з часом.

Деякі мутації шкідливі, вони знижують пристосованість організму, порушуючи функцію генів. З часом шкідливі мутації видаляються з популяції шляхом природного добору. Деякі мутації можуть бути корисними та підвищувати функціонування організму. Ці мутації сприяють природному добору, їх частота в популяції з часом зростає. Прикладом корисної мутації може бути мутація, яка викликає стійкість до антибіотиків у патогенної бактерії при антибіотикотерапії.

Важливо пам’ятати, що всі мутації виникають випадково; вибірковий характер середовища не викликає пристосувальних мутацій, а просто добирає для росту та розмноження ті організми, які зазнали мутацій, що забезпечують потрібні переваги.

Еволюційні зміни можуть відбуватися також через механізми генетичного дрейфу, які відмінні від добору. Генетичний дрейф відбувається тому, що деякі члени популяції матимуть випадково більше нащадків, ніж інші. З часом ці випадкові події можуть призвести до еволюційних змін за відсутності добору.

Генетичний дрейф найбільш ефективний у невеликих популяціях. Наприклад, генетичний дрейф може бути дуже важливим в еволюції патогенів, оскільки кожна нова інфекція викликається невеликою кількістю клітин, що колонізують нового хазяїна. Отже, малі популяції патогенів можуть швидко змінюватися в результаті випадкового генетичного дрейфу.

Змінені шляхом мутацій та рекомбінацій організми з найкраще пристосованими до середовища генотипами (та відповідними фенотипами) виживають і передають свої гени нащадкам. Отже, зміни умов навколишнього середовища, що створюють селективний тиск, призводять до змін у популяції та зрештою – до появи нових видів.

14.7. Походження видів мікроорганізмів

Види мікроорганізмів можуть бути дуже старими і включати широкий спектр отриманих штамів, що мають різноманітні ознаки. Накопичення мутацій з часом можна використовувати для дослідження еволюційного походження видів. Зміни послідовності нуклеотидів внаслідок мутацій можна використовувати як молекулярний годинник для оцінки часу, який пройшов з моменту відділення виду від його найближчих родичів.

Основні допущення для визначення молекулярного годинника полягають у тому, що зміни в послідовності нуклеотидів накопичуються пропорційно часу, що такі зміни загалом є нейтральними та не заважають функціям гена, і що вони є випадковими.

Оцінки молекулярного годинника є найбільш надійними, коли їх можна відкалібрувати за допомогою свідчень з геологічного літопису. Наразі найбільш добре задокументованими є облігатні бактеріальні симбіонти комах для яких комаха-хазяїн надає докази з літопису скам'янілостей для точного визначення дати еволюційних подій.

Молекулярний годинник дає змогу оцінити відмінність мікробних видів на основі відмінності послідовностей в їхньому геномі. Наприклад, оцінки молекулярного годинника показують, що близькоспоріднені види *Escherichia coli* і *Salmonella enterica* (*typhimurium*), які мають 2,8% відмінностей послідовності нуклеотидів у гені 16S рРНК, востаннє мали спільного предка близько 100–140 млн років тому. А два добре охарактеризовані штами – *Escherichia coli* K-12 (непатогенний штам) і *Escherichia coli* O157:H7 (харчовий патоген) утворилися приблизно 4,5 млн років тому. Оцінки молекулярного годинника показують, що утворення видів у мікроорганізмів – довготривалий процес, який займає мільйони років.

14.8. Еволюція вірусів

Віруси не мають клітинної будови, у них відсутні рибосоми та рибосомна РНК, тому неможливо розмістити віруси на універсальному дереві життя, яке побудовано на аналізі послідовностей нуклеотидів 16S рРНК. Вірогідно віруси мають кілька ліній походження та різні типи вірусів ймовірно еволюціонували незалежно протягом історії життя.

Можливою підказкою щодо походження вірусів є відкриття агентів трансферу генів. Агенти перенесення генів являють собою бактеріофагоподібні частки, що переносять гени між клітинами. Агенти перенесення генів кодуються генами хромосоми та полегшують горизонтальний трансфер генів. Ці гени відповідають за утворення капсиду, в середину якого упаковується фрагмент хромосомної ДНК, що може переноситися такою бактеріофагоподібною часткою між клітинами.

Ймовірно, різні агенти перенесення генів еволюціонували незалежно в різних лініях бактерій і що ці агенти дуже давні. Отже, віруси, можливо, неодноразово еволюціонували як злодійські мобільні генетичні елементи, які вийшли з-під контролю хазяїна, використовуючи вже існуючі генетичні механізми для реплікації та передачі ДНК.

Аналіз збережених структурних доменів, спільних для вірусних білків, свідчить про давнє походження вірусів та забезпечує докази того, що найдавніші віруси мали РНК геноми і, можливо, мали існувати до виникнення клітинного життя. Ймовірно, що якась форма РНК, що самовідтворювалася, повинна була існувати у «світі РНК» ще до появи клітин. Можливо віруси виникли з цього світу РНК і дали початок альтернативному від клітинного життя еволюційному шляху. Частина цієї доклітинної РНК могла пристосуватися до клітин, коли вони з'явилися, та стали облігатними паразитами. Згідно з цим сценарієм, віруси є пережитком періоду доклітинного життя та інфікують клітини з моменту виникнення клітинного життя.

Питання для самостійного контролю

1. Чому походження ціанобактерій вважається критичним прогресивним кроком в еволюції?
2. Які докази вказують на існування мікробного життя на Землі біля 4,0 млрд років тому?
3. Які докази підтверджують тридоменну концепцію життя?
4. Що таке LUCA та які його характеристики?
5. Які докази підтверджують ідею, що мітохондрії та хлоропласти колись були вільноживучими представниками домену *Bacteria*?
6. Яким чином сучасні еукаріоти поєднують ознаки бактерій і архей?
7. Опишіть різні гіпотези для формування еукаріотичної клітини.
8. Чому важко розмістити віруси на універсальному дереві життя?

РОЗДІЛ 15
ЕКОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

Мікробна екологія характеризується величезною різноманітністю середовищ існування та метаболізмів, які разом забезпечують основні цикли поживних речовин в природі. Мікроорганізми є основою будь-якої екосистеми та біосфери в цілому та умовою для функціонування всіх інших організмів.

Екосистема – це сукупність організмів, їх фізичного та хімічного оточення, що функціонує як екологічна одиниця. Будь-яка екосистема містить мікроорганізми, що виконують дві основні функції – синтез нової органічної речовини із CO_2 та інших неорганічних сполук у процесі первинної продукції та розкладання цього утвореного органічного матеріалу.

У залежності від способу отримання енергії для продукції органічної речовини екосистеми можна поділити на фототрофні та хемолітотрофні. В фототрофних екосистемах первинними продуцентами зазвичай є оксигенні та аноксигенні фототорофні бактерії, водорості та рослини, а в місцях проживання, куди світло не доходить (наприклад, глибини океанів), первинна продукція базується на хемолітоавтотрофії (екосистеми гідротермальних джерел). Оскільки перші мікроорганізми, ймовірно, використовували H_2 і H_2S, що викидали термальні джерела та вулкани як джерело електронів, то можна вважати, що ранні екосистеми, відповідно, були хемолітотрофними.

Екосистема – це динамічний комплекс мікробних, рослинних і тваринних угруповань та їхнього абіотичного середовища, які взаємодіють як функціональна одиниця. Мікроорганізми присутні в будь-якому середовищі існування, в той час як багато середовищ непридатні для рослин і тварин. Мікроорганізми живуть у глибинах Земної кори, всередині пористих порід, які містять лише сліди води, киплячих гарячих джерелах і твердому льоду, насичених розсолах, середовищах, забруднених радіонуклідами та важкими металами.

У сукупності мікроорганізми демонструють велику метаболічну різноманітність і є основними учасниками всіх етапів циклів поживних речовин у природі. Типи мікробної діяльності в екосистемі залежать від видів присутніх мікроорганізмів, розмірів їхніх популяцій та фізіологічного стану мікроорганізмів у кожному середовищі існування, в той час як активність мікроорганізмів в екосистемі контролюється поживними речовинами та умовами середовища.

Середовища відрізняються своєю здатністю підтримувати популяції мікроорганізмів від дуже різноманітного мікробного світу, наприклад, родючого ґрунту до досить обмеженого мікробіому деяких екстремальних середовищ.

Мікроорганізми становлять більшу частину живого матеріалу на Землі та є основною складовою кожної екосистеми. Екологічна роль мікро-

Розрахована кількість бактерій і архей в середовищах

Континентальний шельф	$1{,}00\times10^{26}$
Відкритий океан, шар вище 200 м	$3{,}60\times10^{28}$
Відкритий океан, шар нижче 200 м	$6{,}50\times10^{28}$
Відкритий океан, осад, шар 10 см	$1{,}70\times10^{28}$
Загалом морське середовище	$1{,}18\times10^{29}$
Солоні озера	$1{,}00\times10^{26}$
Прісноводні озера та річки	$1{,}00\times10^{25}$
Грунт	$2{,}56\times10^{28}$
Підповерхневі відкладення	$3{,}80\times10^{30}$
В/на тваринах і рослинах	10^{23}–10^{24}
Атмосфера (до 3 км)	10^{19}
Загальна кількість	$4{,}17\times10^{30}$

організмів полягає в тому, що вони можуть функціонувати на всіх рівнях екосистеми: фіксувати вуглець як первинні продуценти, використовуючи енергію світла та хімічних зв'язків, і бути головними редуцентами органічної речовини та первинними консументами.

15.1. Середовища існування

У будь-якій екосистемі, ресурси та умови для росту якої є придатними, мікроорганізми будуть рости, утворюючи популяції. *Популяція* мікроорганізмів – це група мікроорганізмів одного виду, які мешкають одночасно в одному місці, та можуть бути нащадками однієї клітини.

Популяції мікроорганізмів одного виду на щільному середовищі утворюють мікроколонії. У природних умовах мікроорганізми ніколи не існують у вигляді чистих культур. Ізольовані чисті культури – це вилучені з природного середовища, де вони існували *in situ*, окремі представники мікроорганізмів, які перенесені в штучні умови лабораторії *in vitro*.

У природних умовах популяції мікроорганізмів є частиною більшої спільноти, що включає організми різних таксономічних груп. Метаболічно схожі мікробні популяції, які використовують ті самі ресурси подібним чином, називаються *гільдіями*. Набори гільдій утворюють *мікробні спільноти*, які взаємодіють з макроорганізмами та абіотичним середовищем в екосистемі таким чином, що визначають функціонування цієї екосистеми. Сукупна спільнота мікроорганізмів, які зазвичай живуть разом у якомусь середовищі існування називається *мікробіом*.

Середовище існування, яке є спільним для гільдій та забезпечує ресурси та умови, необхідні клітинам для росту, називається екологічною нішею. *Екологічна ніша* – термін в екології, що описує «спосіб життя організму», або взаємовідносини виду або популяції з екосистемою, та їхнє в ній розташування.

Місця проживання мікроорганізмів мають складний і постійно мінливий характер і залежать від градієнтів поживних речовин, токсичних сполук та лімітуючих факторів (температура, pH, світло, активність води і т. ін.). Тому екологічних ніш для мікроорганізмів безліч, але саме поєднання перерахованих вище факторів визначає екологічну нішу для конкретного мікроорганізму Для точної характеристики місцеперебування мікроорганізму потрібно враховувати його мікрооточення. Багато спеціалізованих груп мікроорганізмів існують у таких умовах мікрооточення, що відчувають мінімальну конкуренцію з боку інших мікроорганізмів.

Оскільки мікроорганізми мають дуже малі розміри, вони безпосередньо сприймають лише крихітне місцеве середовище, яке називається їхнім *мікросередовищем*. Слово «ніша» не слід плутати з терміном «мікросередовище», оскільки мікросередовище характеризується умовами в певному місці та може швидко змінюватися. Наприклад, частинки ґрунту не є однорідними за вмістом O_2, та містять багато суміжних мікросередовищ.

Зовнішній шар частинки ґрунту може бути повністю кисневим (21% O_2), тоді як центр, лише на дуже короткій відстані, може бути безкисневим. Мікроорганізми біля зовнішніх країв частинки грунту споживають увесь O_2, перш ніж він зможе дифундувати в центр частинки. Таким чином, анаеробні організми можуть процвітати поблизу центру частинки, мікроаерофіли – далі, а суворі аероби – у крайній зоні частинки ґрунту.

Мікробна популяція відрізняється від мікробної спільноти, оскільки спільнота (громада) складається з популяцій, які живуть спільно з іншими популяціями. Представники мікробних видів, які проживають у певному середовищі існування, є такими, що найкраще здатні рости за наявних поживних речовин та умов, а кількість різних присутніх популяцій є мірою складності спільноти.

Різноманітність мікробних видів у спільноті можна виразити *багатством видів*, тобто загальною кількістю різних присутніх видів, що, як правило, не потребує їх ізоляції та культивування. Багатство видів може бути порівнянням послідовностей 16S рРНК, що спостерігаються в певному співтоваристві. А *чисельність виду* – це частка кожного виду в співтоваристві. Багатство мікробних видів і чисельність спільноти є функцією умов, типів поживних речовин та їх кількості.

У деяких середовищах проживання, таких як непорушені ґрунти, багатих органічними речовинами, звичайним є висока видова різноманітність, причому більшість видів присутні лише в незначній кількості представників. Поживні речовини в такому середовищі існування мають багато різних типів, що допомагає існувати великій кількості видів.

У деяких екстремальних середовищах багатство видів як правило дуже низьке, а чисельність представників невеликої кількості видів дуже висока, оскільки специфічні фізичні та хімічні умови навколишнього середовища виключають існування всіх видів, крім кількох, а достатня кількість

ключових поживних речовин забезпечує адаптованим видам розмноження до високої щільності клітин. Прикладом цього є бактерії, які утворюють кислотні стоки шахт в результаті окиснення заліза, та процвітають у дуже кислих водах, багатих на залізо, але бідних органікою, де кислі умови та брак органічного вуглецю обмежують багатство видів.

15.2. Рівень поживних речовин і швидкість росту

Поживні ресурси зазвичай надходять в екосистему епізодично з певними проміжками часу. За надходженням великої кількості поживних речовин, наприклад, листя або мертвої тварини, настає період дефіциту поживних речовин. Через це мікроорганізми в природі часто стикаються з станом «застілля» або «голоду», тому мікроорганізми, зазвичай, ростуть стрибками, тісно пов'язаними з доступністю та типами поживних ресурсів і оптимальними умовами росту.

Оскільки всі відповідні фізико-хімічні умови в природі рідко є оптимальними для росту мікроорганізмів одночасно, швидкість їх росту у природі зазвичай значно нижча від максимальної, зареєстрованої в лабораторії. Наприклад, час генерації *Escherichia coli* в кишковому тракті здорової людини за регулярного харчування становить близько 12 год (два подвоєння на добу), тоді як у чистій культурі кишкова паличка може рости набагато швидше, з часом генерації приблизно 20 хв за оптимальних умов в лабораторії. Більшість культивованих ґрунтових бактерій, зазвичай, ростуть у природі лише на 1% від максимальної швидкості росту, виміряної в лабораторії.

15.3. Конкуренція та співпраця

Конкуренція між мікроорганізмами за поживні ресурси в середовищі існування залежить від кількох факторів, зокрема швидкості поглинання поживних речовин, притаманній швидкості метаболізму та, зрештою, швидкості росту. Кожне середовище існування містить, як правило, суміш різних видів мікроорганізмів, причому щільність кожної популяції залежить від того, наскільки місцеве середовище за комплексом умов схоже на її оптимальне. Деякі мікроорганізми виробляють антагоністично активні продукти метаболізму, які негативно впливають на ріст інших мікроорганізмів та можуть надавати перевагу при конкуренції за ресурси середовища.

Деякі мікроорганізми співпрацюють, щоб використовувати поживні речовини, що жоден з них не може зробити поодинці. Цей спосіб взаємодії називається *синтрофією*. Такий тип метаболічної співпраці можна побачити в діяльності мікроорганізмів, які здійснюють комплементарний метаболізм. Наприклад, метаболічні перетворення, що притаманні двом різним групам нітрифікуючих бактерій першої та другої фази нітрифікації. Перші окиснюють аміак (NH_3) до нітриту (NO_2^-), а другі – нітрит (NO_2^-) до нітрату

(NO_3^-). Представники цих двох груп організмів часто живуть у природі в тісному зв'язку в межах свого середовища існування.

15.4. Екологічні групи мікроорганізмів

Сергій Виноградський розділив усі мікроорганізми на дві групи, що використовують різні типи екологічної стратегії. Екологічна стратегія – це сукупність реакцій організму на дію чинників довкілля. До першої групи відносяться автохтонні мікроорганізми, що постійно присутні в співтоваристві незалежно від кількості поживних речовин у ньому. Такі мікроорганізми ростуть як *К-стратеги*, тобто повільно, з низькими швидкостями росту, але завжди. До другого типу належать алохтонні (або зимогенні). Вони ростуть як *r-стратеги* «сплесками», коли є багато органічної речовини (наприклад, під час листопаду), з високими швидкостями росту, що вимагає високих концентрацій поживних речовин. При такому швидкому рості розсіюється багато енергії та органічної речовини. *L-стратеги* – стійкі до збурень у навколишньому середовищі та здатні переживати несприятливі умови.

В оліготрофних екосистемах мешкають оліготрофні мікроорганізми. *Оліготрофами* вважаються гетеротрофні мікроорганізми, що ростуть при низькій концентрації сполук вуглецю. При високих концентраціях ростуть мікроорганізми – *копіотрофи*. Зазвичай копіотрофи ростуть як *r*-стратеги, а оліготрофи – як *К*-стратеги.

Екологія мікроорганізмів вивчає також різноманітність мікроорганізмів, їх взаємодії в природі та визначення активностей у властивому їм місцеперебуванні в природі.

Основними функціями мікроорганізмів у природних місцях перебування є мінералізація, тобто, розкладання органічних субстратів до NH_3, H_2, CH_4, H_2O; продукція та постачання поживних речовин для інших хемогетеротрофних мікроорганізмів; забезпечення харчування для найпростіших, нематод, ґрунтових комах, тобто, участь у харчових ланцюгах; в модифікації складних сполук, що стають доступними для інших організмів; у перетворенні сполук у розчинну або газоподібну форму.

15.5. Планктон і біоблівка як способи життя

Мікроорганізми існують у товщі води у вільно завислому стані (*планктон*), та активно переносяться потоками води, або у стані прикріпленому до поверхні органічних часток чи неорганічних матеріалів (*біоплівка*). Більшість планктонних організмів здатні до самостійного активного пересування, однак не можуть протистояти течіям, тому планктонні організми пересуваються разом із водними масами.

Як правило, мікроорганізми надають перевагу росту в стані прикріпленому до поверхні та утворюють біоплівки. Поверхні є важливими середо-

вищами проживання, які пропонують мікроорганізмам ширший доступ до поживних речовин, захист від хижаків і фізико-хімічних пошкоджень. Прикріплення до поверхні також дає клітинам можливість не бути змитими і залишатися прикріпленими в сприятливому середовищі та змінювати це середовище своєю діяльністю. Крім того, потік через колонізовану поверхню збільшує потік поживних речовин до поверхні, забезпечуючи більше ресурсів, ніж доступно планктонним клітинам, які живуть у завислому стані у тому самому середовищі.

Практично будь-яка природна або штучна поверхня, що піддається впливу мікроорганізмів, буде колонізована. Ріст на поверхні особливо створює проблеми в умовах лікарень, де мікробна колонізація перфузійних пристроїв, таких як внутрішньовенні катетери та канюлі, може спричинити серйозну інфекцію.

Біоплівки – це сукупності клітин, прикріплених до поверхні та укладених у вязку матрицю, що є продуктом метаболізму живих та загиблих мікробних клітин. Зазвичай матриця являє собою суміш полісахаридів, білків і нуклеїнових кислот, що зв'язують клітини в біоплівці.

Біоплівки зазвичай містять кілька шарів клітин, вбудованих у матеріал пористої матриці (рис. 15.1). Вони затримують поживні речовини та допомагають запобігти відшаруванню клітин з поверхні.

Біоплівки можуть містити один, два або, частіше, багато видів мікроорганізмів. Наприклад, біоплівки, що утворюються на зубах і м'яких поверхнях порожнини рота містять від 100 до 200 різних філотипів, а ротова порожнина людини є місцем проживання загалом біля 700 філотипів мікроорганізмів.

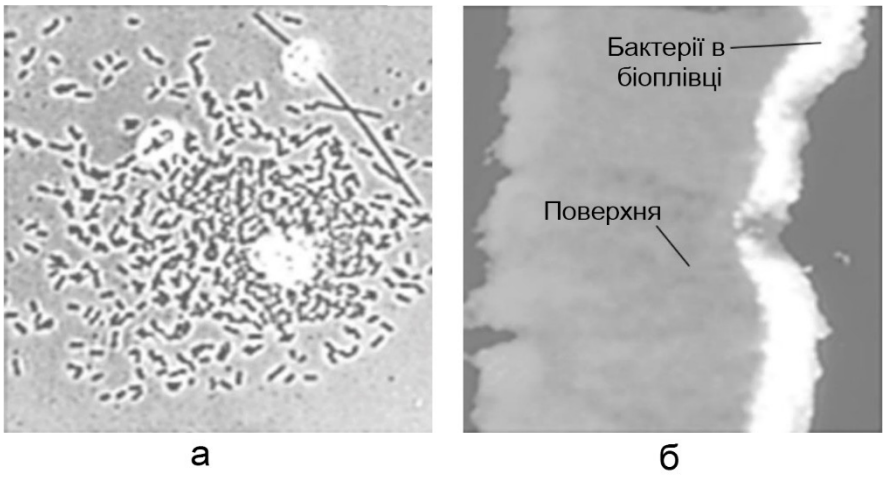


Рис. 15.1. Мікробні біоплівки на поверхнях: а – Бактеріальні мікроколонії, утворені на зануреному в річкову воду склі. б – Поперечний розріз біоплівки, що складається з клітин *Pseudomonas aeruginosa*

Скрізь, де в природному середовищі є занурені в рідину поверхні, ріст біоплівки майже завжди на них більш активний і різноманітний ніж ріст планктону в рідині над цією поверхнею. Клітини в біоплівці відрізняються від планктонних більш активними процесами перенесення сполук в клітини, які загалом контролюють ріст біоплівки.

Біоплівки, прикріплені до багатих поживними речовинами поверхонь, таких як тканини тварин, або до поверхонь у проточних системах, фіксують клітини в місцях, де поживних речовин більше або вони постійно поповнюються. Утворення біоплівки дозволяє клітинам залишатися у цій сприятливій ніші.

В біоплівці утворюються спільноти, в яких мікроорганізми функціонують в тісному спілкуванні один з одним. Це полегшує міжклітинний зв'язок, надає більше можливостей для обміну інформацією, поживними речовинами та генетичним матеріалом.

Біоплівки також протистоять поїданню протистами, фагоцитозу клітинами імунної системи та затримують проникнення в клітини токсичних молекул, таких як антибіотики та важкі метали. Ці переваги підвищують шанси мікроорганізмів на виживання в біоплівці.

Однак, біоплівки не повністю захищені від поїдання, оскільки приваблюють велику кількість мікроорганізмів, що ними харчуються, включаючи гетеротрофних джгутикових, амеб та інфузорій. Ця спеціалізована «мікрохудоба» разом з дрібними представниками мейофауни (коловертки, нематоди, мікроракоподібні, олігохети), випасаються на мікробних пасовиськах та харчуються компонентами біоплівки.

Біоплівка може розростатися до макроскопічного розміру, утворюючи *мікробний мат* (килимок), який формується на поверхні щільного субстрату в прибережній евфотичній зоні водойми. Залежно від особливостей проживання мікроорганізмів (світло, наявність поживних речовин та швидкості дифузії) структура біоплівки може ускладнюватись шляхом утворенням шарів біомаси, представлених різними групами мікроорганізмів.

В верхній зоні мікробні мати містять фототрофні мікроорганізми, що включають ціанобактерії, які є едифікаторами, тобто організмами, що формують співтовариство та визначають його структуру. Нижче фотичної зони складаються анаеробні умови. У нижній частині мату живуть сульфатредуктори, що утворюють сульфід, який дифундує в зону анаеробного фотосинтезу, де ростуть зелені та пурпурові бактерії. Ймовірно, мікробні мати брали участь у формуванні водних та наземних екосистем ще до розвитку судинних рослин, оскільки їх викопні рештки (строматоліти) датуються 3,5 млрд років.

15.6. Характеристка водного середовища

Останнім часом діяльність мікроорганізмів в океанах, морях, річках і озерах привертає увагу науковців у зв'язку з їх участю в процесах глобаль-

них змін клімату завдяки здатності впливати на світові потоки поживних речовин і парникових газів. Морське та прісноводне середовище містить величезну кількість різноманітних мікроорганізмів і вірусів, які їх уражають. Варіації інтенсивності світла, тиску та наявності поживних речовин, разом із наслідками забруднення природного середовища людиною, значно впливають на діяльність, чисельність і різноманітність водних мікроорганізмів.

Прісноводне та морське середовища відрізняються багатьма параметрами, включаючи солоність, середню температуру, глибину та вміст поживних речовин, але обидва забезпечують багато чудових за умовами місць існування для мікроорганізмів. Різні водойми, безумовно, розрізняються як за фізико-хімічними умовами, так і за рівнем первинної продукції (дистрофні, оліготрофні, мезотрофні та евтрофні). Органічна речовина може утворюватися безпосередньо у водоймі (*автохтонна*), а може потрапляти у водойму ззовні (*алохтонна*). До важливих фізико-хімічних характеристик водойми, що визначають життєдіяльність гідробіонтів, належать: освітленість, температура, pH, концентрація біогенних елементів та кисню.

Одним з самих важливих факторів є вміст розчиненого кисню. Швидкість перенесення кисню через воду значно менша, ніж через повітря. Однак у дуже глибокому океані концентрація розчиненого кисню фактично зростає з глибиною, в той час як у тропічних озерах обмеження киснем спостерігається уже на кількох метрах від поверхні.

Світло має вирішальне значення для життя в морських і прісноводних екосистемах. Сонячна радіація нагріває воду, і це призводить до теплового розшарування водної маси та формування термоклину, який можна розглядати як межу між масою теплішої води, що плаває поверх холоднішої. Термоклин є досить вузьким (кілька метрів) прошарком між теплими та холодними масами води, температура яких може відрізнятися на 10 та більше градусів. Окрім температури води, розділені термоклином, можуть відрізнятися також за солоністю, вмістом кисню та іншими фізико-хімічними властивостями.

Всі організми в цих середовищах залежать від первинних продуцентів – автотрофних організмів, які фіксують CO_2 та забезпечують екосистему органічною речовиною. В озерах та прибережних морських системах основними первинними виробниками є мікроскопічні та макроскопічні водорості та рослини. Органічний вуглець надходить у ці системи також з наземним стоком. У відкритому океані весь органічний вуглець є продуктом мікробної фіксації CO_2. Морський мікробіом бере участь у більш ніж половині первинного виробництва біомаси Землі та колообігу поживних речовин.

Концентрація CO_2 є критичним показником у багатьох хімічних і біологічних процесах, тому важливо розуміти його роль в прісноводних і морських екосистемах. Рівень pH дистильованої води визначається роз-

чиненим CO_2 у рівновазі з атмосферним повітрям і становить від 5,0 до 5,5. Морська вода значно забуферена балансом CO_2, бікарбонату (HCO_3^-) і карбонату (CO_3^{2-}) з pH 7,6 і 8,2 завдяки цій системі карбонатної рівноваги (рис. 15.2).

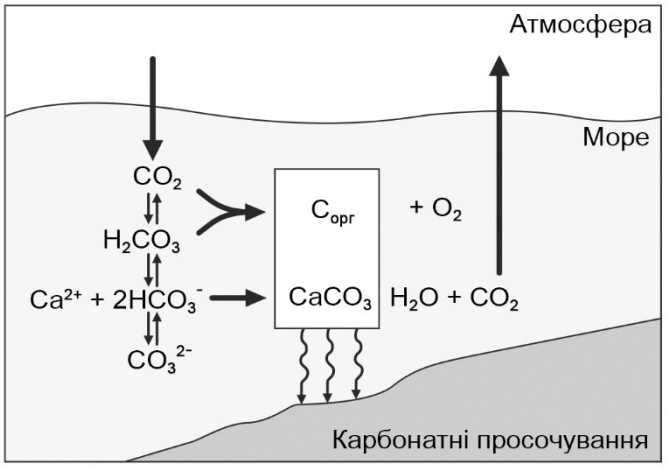


Рис. 15.2. Система вуглецевої рівноваги в морській воді підтримує рівень pH

Збільшення концентрації атмосферного CO_2 призводить до збільшення розчинення CO_2 у морській воді та до закислення океану. Прогнозується, що якщо концентрація CO_2 і ватмосфері буде продовжувати зростати, то до 2100 року очікується зниження pH морської води на 0,35–0,50. Це потенційно обмежить його доступність для формування раковин і скелетів морських організмів та негативно вплине на ріст та життя коралів.

15.7. Мікроорганізми прісних водойм

Прісноводне середовище значно відрізняється за ресурсами та умовами, доступними для росту мікроорганізмів, оскільки деякі озера ізольовані та майже незаймані, тоді як інші є сильно забруднені сільськогосподарськими, промисловими або побутовими стоками.

У водному середовищі присутні організми, що виробляють і споживають кисень, а баланс між фотосинтезом і диханням контролює природні цикли кисню, вуглецю, азоту, фосфору, сірки та металів. Серед мікроорганізмів до кисневих фототрофів належать ціанобактерії та мікроскопічні водорості, які є первинними продуцентами.

Від активності та різноманітності фототрофної та хемолітоторофної водної мікробіоти в значній мірі залежить первинне виробництво, його темпи та часовий і просторовий розподіл. Якщо первинні показники виробництва дуже високі, це може призвести до надмірного утворення органічної речовини та виснаження O_2, що у свою чергу, активує анаеробний метаболізм мікроорганізмів.

Здатність мікроорганізмів водойми споживати кисень називається його *біохімічним споживанням кисню* (БСК) і використовується як важливий показник екологічного стану природних водойм, що визначає міру кількості органічної речовини у воді, яка може бути окиснена присутніми у воді мікроорганізмами. У прісних водах цикли кисню та вуглецю пов'язані, причому рівні органічного вуглецю та кисню обернено пропорційні.

Насичення водойми біогенними елементами, що супроводжується зростанням її біологічної продуктивності називається евтрофікацією. *Евтрофікація* може бути результатом як природних змін у водоймі, так і наслідком антропогенного впливу. Основні хімічні елементи, що сприяють евтрофікації, це азот і фосфор.

За рівнем евтрофікації водойми поділяються на оліготрофні (слабко евтрофіковані), мезотрофні (середньоевтрофіковані) та евтрофні (сильно евтрофіковані). Також в окрему категорію виділяють гіперевтрофні (надсильно евтрофіковані) водойми, коли евтрофікація спричинює масове відмирання біоти та різку зміну параметрів екосистеми.

Для евтрофної водойми характерною є багата та різноманітна літоральна та субліторальна рослинність, велика кількість планктону. Розбалансована евтрофікація може призводити до вибухового розмноження одноклітинних водоростей та ціанобактерій («*цвітіння води*») та дефіциту кисню через використання його гетеротрофними мікроорганізмами, що розкладають накопичену мікробну біомасу. В евтрофованій водоймі швидкість дихання значно перевищує швидкість фотосинтезу.

Молекулярно-екологічне вивчення різноманітності бактерій і архей, що грунтуються на порівнянні послідовностей 16S рРНК сумарного геному, прісноводних систем на прикладі верхнього шару води (епілімніон) озер показали наявність представників п'яти основних філумів домену *Bacteria: Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria* і *Verrucomicrobia* та трьох філумів *Euryarchaeota, Crenarchaeota і Thaumarchaeota* домену *Archaea* (рис. 15.3). Археї сукупно складають лише невелику частку від загальної кількості прокаріотів.

При цьому необхідно знати, що «вид» в молекулярно-екологічних дослідженнях визначається як послідовності гена 16S рРНК, отримані з мікробної спільноти, які відрізняються від усіх інших послідовностей більш ніж на 3%. Така екологічна послідовність називається філотипом, або операційною таксономічною одиницею (ОТО).

Протеобактерії є найбільш поширеними бактеріями в більшості озерних екосистем, зі значним представництвом також видів філумів *Actinobacteria* і *Bacteroidetes*.

В прісній воді домінують представники філумів *Proteobacteria, Actinobacteria* та *Bacteroidetes*. Чисельність ціанобактерій також може бути досить високою в прісноводних озерах, особливо якщо в озеро надходять неорганічні поживні речовини, такі як фосфор і азот.

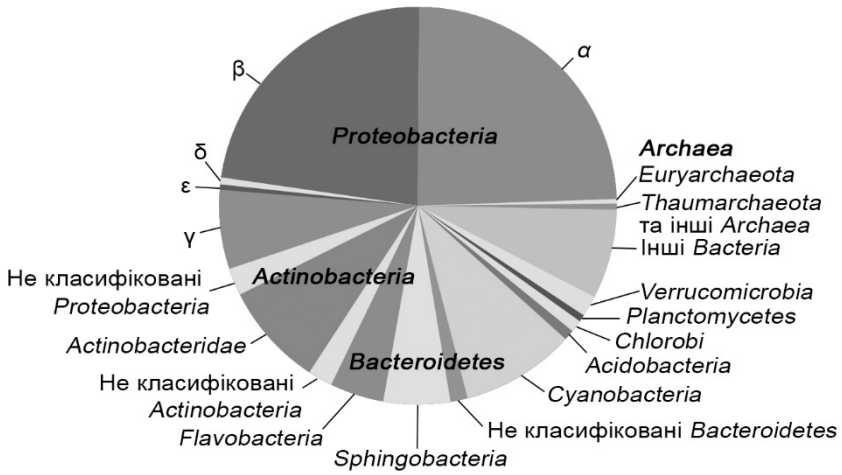


Рис. 15.3. Таксономічна різноманітність бактерій і архей у прісноводних озерах, визначена на основі об'єднаних даних послідовності 16S рРНК, зібраних із епілімніону кількох прісноводних озер

У сукупності велика різноманітність прокаріот, що спостерігається в прісній воді озер відображає динамічний характер цих середовищ існування. Озера, як правило, отримують сезонні надходження ендогенних та екзогенних поживних речовин, що підтримує такономічно та метаболічно складне співтовариство бактерій.

15.8. Мікроорганізми морських екосистем

Близько 96% води на Землі знаходиться в морському середовищі. З мікробіологічної точки зору найбільш вивченими є поверхневі води океану, в той час як глибини океану та донні відкладення почали досліджувати лише нещодавно. Мікробні екосистеми лиманів, глибоких вод відкритого океану та донних відкладень відрізняються своїми фізико-хімічними характеристиками, складом мікроорганізмів та пов'язаними з ними біогеохімічними процесами (рис. 15.4).

Мікроорганізми прибережних екосистем пристосовані до мінливого середовища. Лиман – це напівзамкнена прибережна ділянка, де прісна вода ріки змішується з солоною морською водою. Мікроорганізми, що живуть в таких умовах борються з осмотичним стресом шляхом регулювання їх внутрішньоклітинної осмолярності. Для цього більшість протистів і грибів виробляють осмотично активні вуглеводи, тоді як бактерії та археї регулюють осмотичний тиск в клітині концентрацією калію або таких сполук, як пролін і бетаїн.

Солоність є одним з факторів стресу, тому більшість мікроорганізмів, які населяють лимани, є галотолерантними, оскільки можуть витримувати

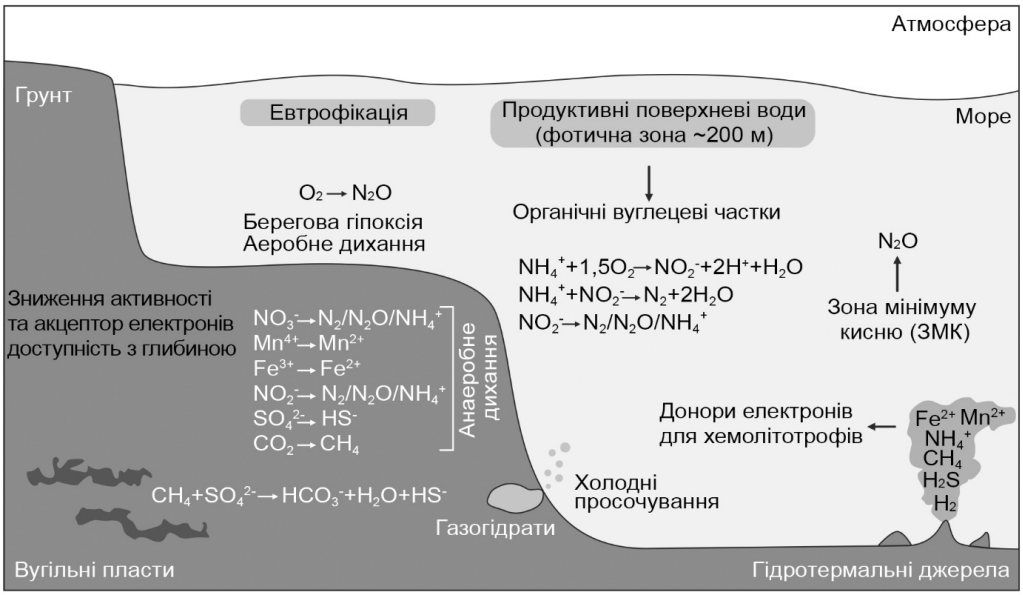


Рис. 15.4. Різноманітність морських екосистем і пов'язаних з ними мікробних метаболічних процесів

значні зміни солоності, але не мають обов'язкової потреби у високих концентраціях солі.

Лимани та ріки, які їх живлять, містять токсичні сполуки, що приносять стоки промислового та сільськогосподарського виробництва, та поживні органічні речовини, зокрема добрива. Якщо в водне середовище постійно надходить багато біогенних та органічних речовин, екосистема стає евтрофною. Якщо поживні речовини надходять за короткий проміжок часу, то відбувається *цвітінням води* – це масовий розвиток мікроскопічних водоростей та ціанобактерій, що призводить до зміни кольору води. Відмирання накопиченого фітопланктону та розкладання утвореної органічної речовини мікроорганізмами викликає гіпоксію.

Фототрофні мікроорганізми, що викликають цвітіння та виробляють токсичні речовини або самі є отруйними, можуть спричиняти токсичний або шкідливий вплив на людей, риб, молюсків, морських ссавців і птахів. Таке явище має назву *шкідливе цвітіння водоростей* (ШЦВ). Деякі ШЦВ називають червоними припливами, оскільки щільність мікроорганізмів настільки велика, що вода набуває кольору водоростей – червоного або рожевого.

Нетоксичні мікроорганізми закупорюють зябра риб і безхребетних та забарвлюють воду. Після відмирання великої кількості мікро- та макроводоростей гетеротрофні мікроорганізми, що утилізують їх, поглинають весь кисень з води, що призводить до гіпоксії. Передбачається, що глобальна

зміна клімату може викликати більше шкідливих цвітінь, частково через те, що тепліша вода формує більш стабільний термоклин, який триває до глибокої осені.

Діатомові водорості з роду *Pseudonitzschia*, що викликають цвітіння, поїдають анчоуси. Це призводить до накопичення в рибі сильного нейротоксину домоїнової кислоти, та отруєння савців, які поїдають отруєну рибу. Динофлагеляти роду *Alexandrium* продукують потужний нейротоксин, відповідальний за паралітичне отруєння молюсків та, відповідно, людей, які їх споживають.

Мікроорганізми в відкритому океані пристосовані до умов обмеження поживних речовин. Верхні 200–300 м у відкритому океані, які називають фотичною зоною, є домом для різноманітних мікроорганізмів. Фітопланктон, який включає мікроскопічні водорості та фототорофні бактерії, є джерелом усієї органічної речовини у відкритому океані, за винятком гідротермальних джерел і підповерхневих хемолітоавтотрофних угруповань.

Приблизно половина фіксації вуглецю у відкритому океані здійснюється ціанобактеріями родів *Prochlorococcus* і *Synechococcus*. Ці бактерії складають пікопланктон (0,2 до 2,0 мкм), який може становити від 20 до 80% загальної біомаси фітопланктону. Більші за розмірами ціанобактерії (*Crocosphera watsonii*) та одноклітинні еукаріотичні автотрофи, особливо діатомові водорості, складають біля 50% фіксованого вуглецю.

На відміну від прибережних регіонів, рівень поживних речовин у відкритому океані надзвичайно низький. У *мікробній петлі* (рис. 15.5) гетеротрофні мікроорганізми споживають розчинену органічну речовину (РОР), що виділяється як ексудат іншими мікроорганізмами, а також рослинами та тваринами. Морські віруси, що присутні в концентраціях до 10^8 на мілілітр, лізують клітини своїх хазяїв та значно сприяють поверненню поживних речовин у мікробну петлю. Це створює загальний пул РОР, що служить джерелом поживних речовин для всіх осмотрофних організмів. Гетеротрофні протисти (джгутикові та інфузорії) споживають менші за розміром мікроорганізми, серед яких можуть бути й інші протисти.

Мікробні клітини, нерозчинний детрит та інші тверді речовини називають твердою органічною речовиною (ТОР). Оскільки протисти споживають зоопланктон, то як РОР, так і ТОР переробляються на кількох трофічних рівнях. Чистим ефектом мікробної петлі є повторне використання основних поживних речовин, таких як органічний вуглець, нітрати та фосфати, у фотичній зоні. Фітопланктон забирає CO_2 з атмосфери та відкладає його в донних осадах, що впливає на клімат. Цей процес називають «біологічним вуглецевим насосом».

Органічні рештки, які падають крізь товщу води, у світлі ліхтаря мають вигляд снігу, через що отримали назву «морського снігу». *Морський*

Рис. 15.5. Мікробна петля

сніг складається в основному з фекальних гранул, діатомових фрустул та інших матеріалів, які важко розкладаються. Під час осідання на дно морський сніг заселяється мікроорганізмами та далі мінералізується. Щільність популяції бактерій, пов'язаних з морським снігом, може досягати 10^8–10^9 кл/мл, що на порядки вище, ніж у воді, тому до морського дна досягає менше 1% органічного вуглецю, утвореного фотосинтезом.

Фітопланктон реагує на зміну клімату шляхом відбору мікроорганізмів, здатних фіксувати N_2, оскільки при збільшенні концентрації CO_2 як джерела вуглецю, доступного для фотосинтезу, ріст мікроорганізмів обмежується дефіцитом азоту.

Відомо принаймні чотири значущі організми, що фіксують N_2 в океані, які є ціанобактеріями. Це нитчаста ціанобактерія *Richelia intracellularis*, яка фіксує значні кількості N_2 та живе разом з діатомовими водоростями; нитчасті ціанобактерії роду *Trichodesmium*, набагато важливіші з точки зору кількості фіксованого N_2 (рис. 15.6 а), що дрейфують по поверхні океану як плоти розміром багато квадратних метрів у тропічних і субтропічних океанах; одноклітинна ціанобактерія *Crocosphera watsonii,* яка мешкає в тропічних поверхневих водах, має діаметр від 3 до 8 мкм, що робить її набагато більшою за інших одноклітинних ціанобактерій з родів *Synechococcus* або *Prochlorococcus*; та незвичайна не культивована ціанобактерія (UCYN-A),

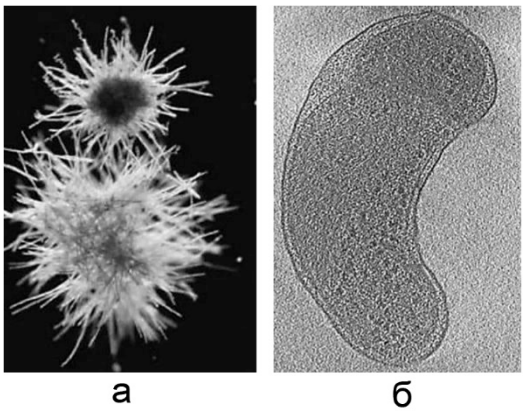


Рис. 15.6. Ціанобактерія *Trichodesmium* sp. (а), що фіксує N_2 у відкритому океані та *Pelagibacter* (б) найпоширеніша бактерія в океані

яка фіксує N_2, але не має фотосистеми II, окиснює органічні сполуки, тому є фотогетеротрофом. Таким чином, ця бактерія UCYN-A може фіксувати N_2 впродовж доби, мешкає в помірних широтах і зустрічається в прибережних водах, а також у відкритому океані.

Крім азотфіксації, мікробіота відкритого океану здійснює всі інші етапи колообігу азоту. Денітрифікуючі та анаммокс бактерії філуму *Planctomycetes* переводять легко засвоювані форми азоту в N_2.

Азот, що уникає денітрифікації або анаммоксу в зоні мінімального вмісту кисню та опускається нижче, складається переважно з NH_3/NH_4^+. Більшість азоту, який накопичується на глибині, є нітратним (NO_3^-), оскільки NH_3/NH_4^+ окиснюють мікроорганізми, переважно археї з філуму *Thaumarchaeota*.

Дрібні планктонні хемоорганотрофні бактерії населяють пелагічні морські води в кількості 10^5–10^6 кл/мл. Враховуючи величезний об'єм океану, ймовірно, що найбільш поширеною кладою на Землі є морські α-протеобактерії, а з них домінуючими є члени «групи SAR11», яка включає рід *Pelagibacter*. Члени клади під назвою SAR11 (названої на честь Саргасового моря, де вони були відкриті) були виявлені майже в усіх пробах відкритого океану, взятих по всьому світу.

Бактерії SAR11 становлять від 25 до 50% мікробних клітин у поверхневих водах як прибережних, так і відкритих пробах океану. Вважається, що бактерії SAR11 становлять близько 25% усього мікробного життя на планеті. Загальна океанічна популяція цієї групи оцінюється приблизно в 2,4 х 10^{28} клітин, це приблизно три чверті всіх бактерій, що робить її самою успішною групою мікроорганізмів на планеті.

Представники роду *Pelagibacter* є оліготрофами, які найкраще ростуть при дуже низьких концентраціях поживних речовин. Їх успіх пов'я-

заний частково з невеликим розміром. Клітини *Pelagibacter* є бактеріями діаметром лише 0,12–0,20 мкм (рис. 15.6б). Високе співвідношення поверхні до об'єму сприяє активному транспортуванню поживних речовин, збільшуючи концентрацію субстрату та швидкість його перетворення всередині клітини.

Протеомний аналіз *Pelagibacter* виявив високу кількість периплазматичних білків, що зв'язують і транспортують розчинні поживні речовини, такі як фосфат, амінокислоти та цукри. Іншою адаптивною особливістю *Pelagibacter* є його досить малий геном (1,3 млн п.н.), який кодує дуже велику кількість транспортних систем, що мають надзвичайно високу спорідненість до своїх субстратів та інші ферменти, корисні для оліготрофного способу життя.

Вивчення метаболізму SAR11 виявило, як різноманітні морські мікроорганізми розробили додаткові механізми для поповнення запасів енергії, які, ймовірно, надали їм переваги для існування в умовах дифіциту поживних речовин. Це метаболічне різноманіття розмиває трофічний розподіл між таксономічними групами морських мікроорганізмів. Наприклад, гени родопсину, що вперше були відкриті в галофільних архей, виявили в альфапротеобактерій (тобто SAR11), а також у бетапротеобактерій, бактероїдів і морських динофлагелят.

Родопсин протеобактерій називають протеородопсином (ПР). Важливо відмітити, що ці мікроорганізми є хемоорганогетеротрофами, а не автотрофами. Однак, виявляється, що вони використовують родопсин як фотосинтетичний насос для прокачування протонів, формування трансмембранного потенціалу та додаткового поповнення енергії АТФ у водах, бідних на органічні речовини.

Враховуючи, що 50% гетеротрофних морських бактерій і архей у фотичній зоні мають гени, необхідні для біосинтезу родопсину, можна зробити висновок, що цей спосіб фотосинтезу важливий для їх виживання. Ці мікроорганізми мають в мембрані протеородопсин, що поглинає більшу кількість зеленого світла (525 нм). Бактерії, які живуть у глибших водах, мають протеородопсин, що сприймає фотони синього світла (490 нм, що проникає глибше).

Ще одна група морських мікроорганізмів, які використовують резервний механізм генерації енергії, це аеробні аноксигенні фототрофи (ААФ). Відомо, що бактерії, здатні до аеробної аноксигенної фототрофії, мають бактеріохлорофіл *a* (Bchl *a*). Цей фотосинтетичний пігмент дуже поширений у поверхневих водах океану. Деякі альфапротеобактерії (клада *Roseobacter*), а також бета- і гамапротеобактерії, здатні до цього способу фототрофії. Як і мікроорганізми, що містять родопсин, ААФ є фотогетеротрофами. Тобто вони використовують світло для додаткового отримання АТФ, але задовольняють свої потреби в вуглеці за рахунок асиміляції органічного вуглецю. При дефіциті органічних сполук в середовищі вони

частину своїх потреб в АТФ задовольняють фототрофно, щоб більше органічного вуглецю використати для біосинтезу та менше на катаболічні процеси.

Однак кількість бактерій відкритого океану, які володіють бактеріохлорофілом *a* (Бхл *a*), набагато менша, ніж тих, що виробляють протеородопсин. Це може свідчити про те, що гени для протеородопсину були більше поширені шляхом горизонтального переносу генів, оскільки для цього потрібно було перенести лише шість генів, що відповідають за функціонування цього протонного насосу, на відміну від приблизно 50 генів, необхідних для формування аноксигенного світлозбирального комплексу, реакційного центру, Бхл *a* та каротиноїдів, знайдених у ААФ.

Альфапротеобактерія *Silicobacter pomeroyi* має ще один спосіб додаткового отримання АТФ, це – хемолітогетеротрофія. Як і фотогетеротрофія, при якій світло використовується для отримання енергії та електронів при споживанні органічного вуглецю, хемолітогетеротрофія використовує неорганічні хімічні речовини як джерело енергії та електронів, але для біосинтетичних процесів використовують органічний вуглець.

Silicobacter pomeroyi використовують CO як додатковий донор електронів, окиснюють CO до CO_2, але не мають ферментів, необхідних для фіксації CO_2, а для біосинтезу використовують органічний вуглець. Хемолітогетеротрофні бактерії складають близько 7% бактеріопланктону океану. Ймовірно ці додаткові стратегії для поповнення запасів енергії є корисними для мікроорганізмів у середовищі, де мало поживних речовин.

Довгострокові дослідження динаміки популяції океанічних бактерій і архей за допомогою молекулярно-екологічних методів дали уявлення про мікробну різноманітність у морському середовищі (рис. 15.7). Примітно, що ціанобактерії складають лише близько 1% різноманіття в цих прибережних водах через конкуренцію з боку еукаріотичного фітопланктону. Навпаки, ціанобактерії домінують у відкритому океані, де обмежений вміст поживних речовин.

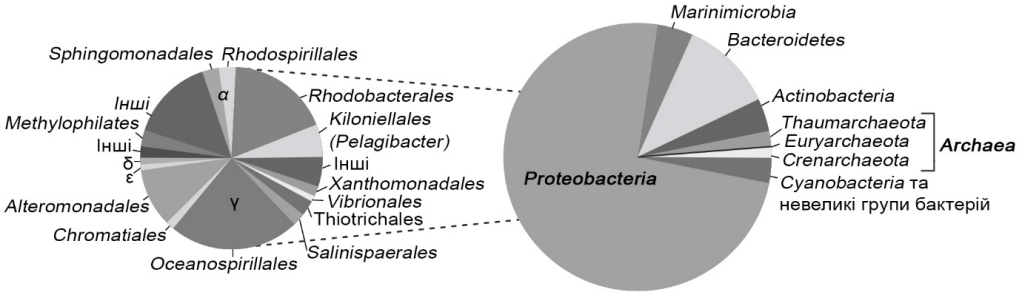


Рис. 15.7. Таксономічна різноманітність бактерій і архей у прибережних водах океану

Типовий таксономічний склад бактерій в океані має спільні особливості з озерами (рис. 15.3), де філуми *Proteobacteria* і *Bacteroidetes* також складають більшу частину біологічної різноманітності, однак в озерах альфа- та бета-протеобактерії представлені приблизно однаково, в той час як в океані переважають альфа- та гама-протеобактерії, а бетапротеобактерії є лише другорядними компонентами.

Альфа- і гама-протеобактерії, явно домінують у мікробному різноманітті океанів. Основною групою морських гамапротеобактерій є некультивована «група SAR86». Ці бактерії складають приблизно 10% загального співтовариства прокаріотів у поверхневому шарі відкритого океану. Представники кандидата філуму *Marinimicrobia* використовують кисень, а для підтримки анаеробного дихання – сульфоксиди, закис азоту, полісульфіди, нітрати та тіосульфат. За винятком ціанобактерій, більшість морських бактерій, ймовірно, є хемоорганотрофами, пристосованими до надзвичайно низької концентрації поживних речовин у відкритому океані, а за допомогою протеородопсину володіють додатковими шляхами генерації енергії.

Археї в пелагічних водах містять досить обмежене різноманіття *Euryarchaeota, Crenarchaeota* та *Thaumarchaeota*, більшість з яких ще не виведено в лабораторну культуру. Хемолітотрофні археї *Thaumarchaeota*, що окиснюють аміак, також є одними з самих поширених морських мікроорганізмів, що становлять 20–40% усіх морських прокаріотичних клітин нижче фотичної зони. Види *Euryarchaeota* також можуть бути присутні у кількості до 20% спільноти прокаріотів у поверхневих водах.

Більшість мікроорганізмів океану еволюціонували та сформувались в умовах дуже низьких концентрацій поживних речовин і дуже низької щільності клітин (10^5–10^6 кл/мл), тому виростити їх в лабораторії або важко, або часто неможливо.

15.9. Віруси морських бактерій і архей

Віруси зустрічаються на Землі скрізь, де присутнє клітинне життя, та у величезній кількості. Кількість клітин бактерій і архей на Землі значно перевищує загальну кількість еукаріотичних клітин і становить 10^{29}, а кількість вірусів прокаріотів – приблизно 10^{30}. Таким чином, незважаючи на невеликий розмір, віруси, ймовірно, можуть відігравати важливу екологічну роль у природі.

Ґрунт, прісна вода, глибокі надра Землі, мікробні мати та інші середовища існування кишать мікроорганізмами та вірусами. В одному мілілітрі морської води можна нарахувати приблизно 10^6 прокаріотичних клітин, а вірусів приблизно в десять разів більше. Хоча віруси становлять більшу частину загальної кількості мікроорганізмів, присутніх у морській воді, через їхні дуже малі розміри вони складають лише близько 5% загальної мікробної біомаси.

Вважається, що від 5 до 50% бактерій у морській воді щодня гинуть від бактеріофагів, а більшість інших бактерій поїдають найпростіші. Наприклад, бактеріофаг Syn5 атакує та лізує види *Synechococcus*, які разом із їхнім родичем *Prochlorococcus* є основними первинними продуцентами океану та засвоюють понад 30% CO_2, що фіксується в усьому світі.

Існує два основні механізми смертності бактерій – виїдання протистами та лізис фагами, що приблизно однаково спричиняють загибель клітин, але по-різному впливають на морські харчові мережі. Виїдання протистами переміщує вуглець вгору по харчовому ланцюгу, коли бактерії поглинаються найпростішими, які потім споживаються зоопланктоном, а той, у свою чергу, підтримує вищі трофічні рівні до риб і більших організмів.

Навпаки, цитоплазма лізованих фагами клітин виділяється у вигляді розчиненої органічної матерії. Лізис фагами морських прокаріотичних мікроорганізмів зменшує перенесення вуглецю на вищі трофічні рівні.

За морфологією більшість описаних морських вірусів прокаріотів є голово-хвостими та містять дволанцюгові ДНК. Однак, віруси без хвостового відростка, які виявляються методом електронної мікроскопії, ймовірно, домінують у світовому океані.

Відкрито нову групу безхвостих дволанцюгових ДНК-бактеріофагів під назвою *Autolykiviridae*. Віріон вірусу має морфологію, близьку до ікосаедричної (рис. 15.8). Ці віруси були виділені з використанням морських вібріонів як хазяїна. Геномні послідовності ізольованих *Autolykiviridae* були ідентифіковані в 13 філумах бактерій і архей, включаючи дві найпоширеніші морські групи – *Alphaproteobacteria* та *Thaumarchaeota*.

Відкриття цієї родини вірусів з таким широким діапазоном хазяїв, як бактерій, так і архей, заповнило велику прогалину в нашому розумінні екологічної вірусології.

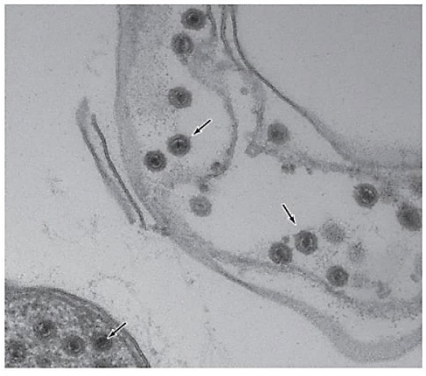


Рис. 15.8. Електронна мікрофотографія лізованих клітин морських вібріонів, що містять віріони *Autolykiviridae*, родини безхвостих ДНК-бактеріофагів

Вірусний метагеном – це сукупність усіх генів вірусів в певному середовищі. Цей підхід показав, що значна частина генетичного різноманіття на Землі міститься у вірусах бактерій і архей. Проведені перші дослідження вірусних метагеномів показали, що на Землі існує величезна різноманітність вірусів. Приблизно 75% генних послідовностей, знайдених у вірусних метагеномних дослідженнях, не виявляють подібності до будь-яких інших відомих вірусних та клітинних генів, у той час, як для бактеріальних метагеномів, зазвичай, виявляють приблизно 10% невідомих генів.

Таким чином, більшість вірусів все ще чекають на відкриття, що робить дослідження вірому та вірусного різноманіття однією з найцікавіших областей мікробіології сьогодні. Приблизні оцінки різноманіття морських вірусів вказують на те, що у світовому океані існує щонайменше 200 000 різних видів вірусів, які містять величезну кількість нових генів.

15.10. Мікробіота глибоководних морських відкладів

Дослідження глибин океанського дна, виявили популяції як архей, так і бактерій у кернах осадових відкладень навіть на глибині понад 2000 м. Кількість клітин у відносно багатих органікою відкладах уздовж континентального шельфу зазвичай зменшується від приблизно 10^9 кл/г у поверхневих відкладах до приблизно 10^6 кл/г на глибині до 1000 м нижче поверхні морського дна.

У цих прибережних відкладах сульфатвідновлювальні бактерії та інші анаероби виснажують сульфат та інші акцептори електронів уже в межах кількох метрів від поверхні. Виснаження акцепторів електронів і органічної речовини зі збільшенням глибини відкладів обмежує отримання енергії мікробними спільнотами, що пояснює значне зменшення кількості клітин із глибиною.

Різноманітність мікробної спільноти морських відкладів досліджена мало через технічні труднощі та витрати на отримання незабруднених бурових кернів із великих глибин. Аналіз послідовностей генів 16S рРНК мікробіоти чітко показав, що в бактеріальному різноманітті глибоководних та мілководних морських відкладів, як і в усіх інших морських середовищах, переважають протеобактерії, серед яких домінують сульфатвідновлювальні бактерії порядку *Desulfobacterales*, що узгоджується з тим, що сульфатредукція є основним способом анаеробного дихання в морських осадах (рис. 15.9).

На додаток до різноманітних бактерій на великих глибинах виявлено багато нових видів некультивованих архей. Геномні послідовності некультивованих *Bathyarchaeota*, отриманих як з наземних, так і з морських відкладів, показали їх фізіологічну здатність розщеплювати й асимілювати білки та вуглеводи. Інші *Bathyarchaeota*, ймовірно, здійснюють метаногенез і є автотрофами.

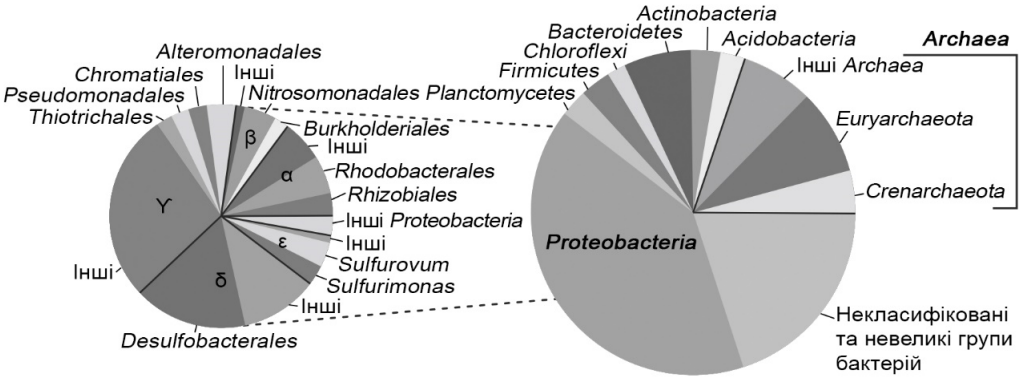


Рис. 15.9. Таксономічна різноманітність бактерій і архей у морських відкладеннях

15.11. Хемолітотрофні екосистеми

На відміну від наземних та більшості морських фототрофних екосистем хемотрофні екосистеми функціонують завдяки діяльності хемолітоавтотрофних мікроорганізмів, які окиснюють відновлені неорганічні сполуки, та є первинними продуцентами органічної речовини.

На великих глибинах в різних місцях Світового океану з низькою температурою та високим тиском, куди не попадає світло, виявлено глибоководні гарячі та теплі джерела та відкрито хемолітотрофний тип екосистем з процвітаючим суспільством мікроорганізмів та тварин.

З моменту першого відкриття у 1977 році біля Галапагоських островів першої хемолітотрофної екосистеми, що є одним з відкриттів минулого століття, описано близько 700 гідротермальних вентів та 600 холодних сипів. В мікробних екосистемах гідротермальних джерел домінує хемолітотрофний метаболізм, який здійснюють бактерії та археї. Вони окиснюють відновлені сполуки сірки, азоту, заліза, марганцю, а також водень, метан, монооксид вуглецю, що викидаються з цих гідротермальних джерел, фіксують CO_2 та забезпечують членів екосистеми первинно синтезованою органічною речовиною.

Гідротермальні системи – це теплі (від 5 до 50 °С) дифузні джерела (названі сипами), або дуже гарячі джерела, які викидають гідротермальні рідини (від 270 до > 400 °С), названі вентами, що містять відновлені неорганічні сполуки, з яких найбільш важливими є CH_4 і H_2S. Гарячі венти, названі чорними курцями, утворюють вертикальні сульфідні споруди (димарі). Гідротермальні рідини викидаються з тріщин у морському дні та зовнішніх стінок гідротермальних труб та змішуються з холодною морською водою.

Чорні курці розташовані на глибинах від 1000 до понад 4000 м в регіонах океанічних розломів земної кори, де в морське середовище виходить

вулканічна магма (рис. 15.10 а), а залізо та магнієві мінерали реагують з морською водою. Морська вода, що просочується в розтріснуті ділянки земної кори, реагує з гарячою породою, в результаті чого утворюються підводні гарячі джерела, насичені неорганічними хімікатами та розчиненими газами, які називають гідротермальними джерелами.

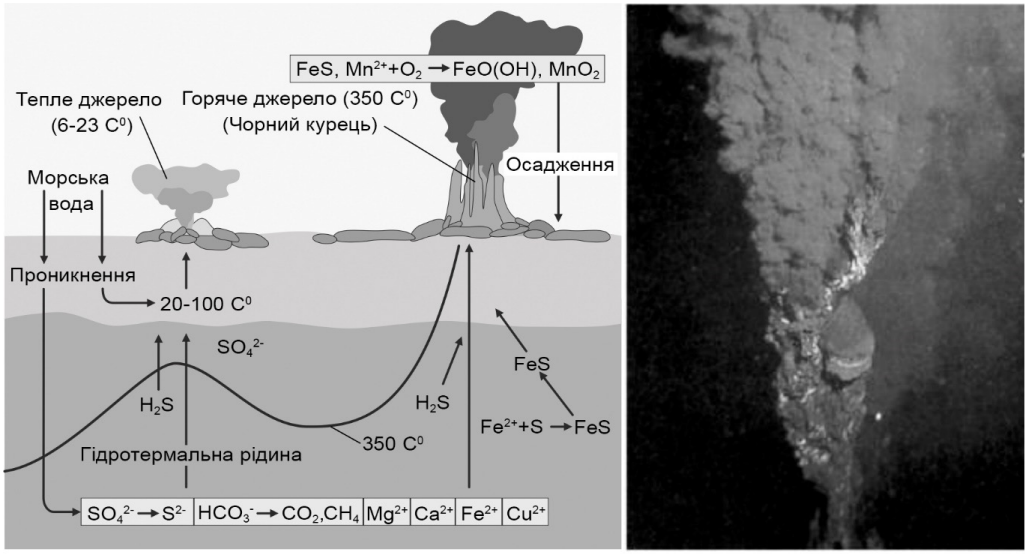


Рис. 15.10. Схема утворення гідротермальних джерел (а). Чорний курець (б)

Гарячі виходи рідини з тріщин у морському дні та зовнішніх стінок гідротермальнх труб формують вертикальні сульфідні споруди – димарі висотою до 30 м з осадів, що утворюються при зіткненні кислих гідротермальних рідин, багатих на розчинені метали, з холодною, насиченою киснем морською водою. Швидке змішування призводить до утворення дрібнозернистих мінералів сульфідів металів, таких як пірит і сфалерит, що мають вигляд шлейфу чорного «диму», який піднімаються над морським дном (рис. 15.10 б).

Екосистеми чорних курців виявлені по всьому Світовому океану – від Арктики до Антарктики. Всюди, де проходять океанічні глибинні розломи Земної кори та підіймаються гори, де б'ють термальні джерела, хемолітоавтотрофні бактерії та археї створюють оази морських організмів в океанічній пустелі.

Нижні частини димаря, де температура 20–40 °С, заселені велетенськими трубчастими червами – рифтіями (*Riftia pachyptila*), які досягають до 2,5 м у довжину і 10 см у товщину (рис. 17.21). У рифтій відсутня травна система та рот – вони не споживають їжі, натомість в їх тілі є особливий

орган трофосома. Він наповнений мільярдами бактерій, які фіксують CO_2, виробляють органічні сполуки та живлять рифтію, а та, у свою чергу, постачає їм кисень, вуглекислий газ та сірководень і надає захист від поїдання іншими тваринами.

Поруч із рифтіями поселяються інші трубчасті черви, позбавлені пігментації двостулкові молюски, велетенські молюски, білі краби і креветки та ще багато інших дрібних безхребетних істот, яких нараховано понад 350 видів.

Усі поверхневі екосистеми черпають енергію від сонця, а чорні курці знаходяться глибше 1000 м, куди сонячне світло не проникає. Головну роль тут грають не фототрофні мікроорганізми і рослини та фотосинтез, а архебактерії та бактерії з хемолітотрофним метаболізмом.

Археї та бактерії в умовах чорних курців поглинають сірководень та двоокис вуглецю, перетворюючи їх на органічні сполуки. Уся екосистема у прямому розумінні слова заповнена ними. Більшість тварин вступили у симбіоз із цими мікроорганізмами, постачають їм сірководень та вуглекислий газ, а мікроорганізми, у свою чергу, забезпечують хазяїна синтезованими органічними сполуками.

Термофільні та гіпертермофільні мікроорганізми процвітають у градієнтах температур, що утворюються, коли перегріта вода змішується з холодною морською водою. Найбільш термофільні з усіх відомих мікроорганізмів, що відновлюють сірку, представники видів *Pyrolobus* і *Pyrodictium* були виділені зі стінок димоходу чорного курця.

Дивно, але хоча гіпертермофілам потрібні дуже високі температури для росту, вони досить терпимі до низьких температур і кисню, що дозволяє їм мігрувати та заселяти інші придатні місця.

У мікробних спільнотах гідротермальних джерел домінують протеобактерії, зокрема епсилон-, альфа-, дельта- і гамапротеобактерії (рис. 15.11). Філотипи епсилонпротеобактерій найбільше відповідають

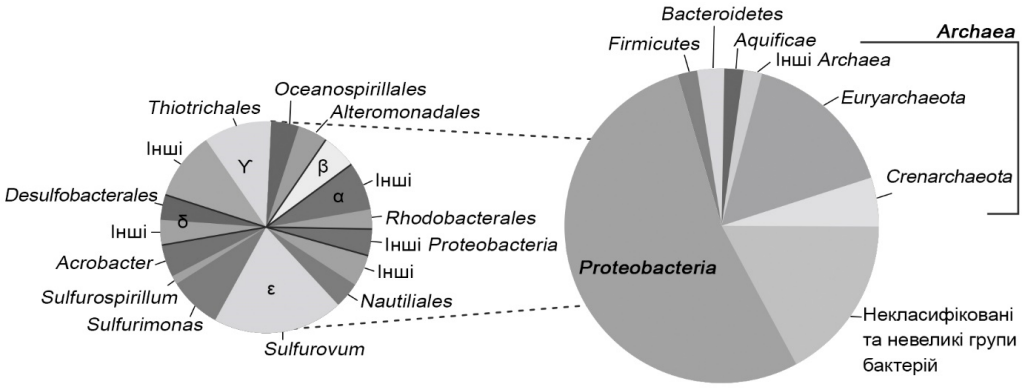


Рис. 15.11. Таксономічна різноманітність бактерій і архей у воді гідротермальних джерел

філотипам хемолітотрофних сірчаних бактерій, таких як *Sulfurimonas, Arcobacter, Sulfurovum* і *Sulfurospirillum*, що використовують відновлені сполуки сірки як донори електронів.

Оцінка кількості унікальних філотипів показує, що різноманітність бактерій поблизу гідротермальних джерел приблизно в 10 разів перевищує різноманітність архей, однак археї переважають у зразках, вилучених зі стінок димарів гідротермальних вентів. Більшість архей, виявлених поблизу гідротермальних джерел, є або метаногенами, або видами морських *Crenarchaeota* та *Euryarchaeota*, що окиснюють аміак.

Специфічна гідротермальна екологічна система «Загублене місто», розташована посеред Атлантичного океану, утворилась в результаті оголення мінералів, пов'язаних з океанічною корою, що колись була глибоко під морським дном. Хімічні реакції морської води та щойно відкритого перидотиту підвищують pH до 11 та утворюють лужне середовище, з надзвичайно високим вмістом H_2, CH_4 та інших низькомолекулярних речовин, присутніх в гарячих (біля 200 °C) гідротермальних рідинах. Змішування цих лужних рідин з морською водою призводить до утворення карбонатних (вапнякових) труб, які можуть досягати до 60 м у висоту.

Інший тип хемосинтетичних екосистем характерний для холодних метанових сипів, які виділяють рідини з різноманітними характеристиками та складом хімічних елементів, багатих на метан та вуглеводні. Метанові сипи досить поширені в морському середовищі та вважаються одними з найбагатших бентосних екосистем на морському дні.

Холодні сипи, що виділяють метан, на околиці Хікурангі (Нова Зеландія) населені гетеротрофними поліхетами-амфаретидами, на відміну від окиснених середовищ гідротермальних вентів, де переважають хемолітотрофні трубочники. Середовища існування амфаретид характеризуються товстим шаром кисневих осадів, який містить різноманітну та багату біомасою спільноту аеробних метанотрофних гамапротеобактерій.

Вироблений метаногенами метан безперервно просочується або виривається з осадових надр на морське дно у формі багатих метаном рідин, і більше 90% його споживається анаеробними археями, що окиснюють метан, утворюючи ефективний метановий біофільтр, який запобігає його дифузії в морську воду. Більшість метану окиснюється анаеробними археями з використанням сульфату, нітрату, нітриту, тривалентного заліза чи марганцю як акцепторів електронів.

Численні дослідження показали, що метанові просочування містять унікальні мікробні спільноти, які складаються з різних не лише метанотрофних функціональних гільдій. Ці мікроорганізми споживають до 25% метану, що виділяється, і об'єднуються в три глибоко розгалужені групи, названі морськими метилотрофними групами (ММГ). Метилотрофи ММГ1 і ММГ2 належать порядку *Methylococcales*, тоді як метилотро-

фи ММГ3 пов'язані з *Methylophaga*. Організми груп ММГ1 і ММГ3 є близькими родичами хемосинтетичних ендосимбіонтів морських безхребетних. У безкисневих шарах осадів усіх досліджених просочувань домінують анаеробні метанотрофні археї та сульфатвідновлюючі дельтапротеобактерії.

Незважаючи на специфічні особливості угруповань окремих холодних просочувань, мікроорганізми, відповідальні за ключові функції, подібні в усіх хемосинтетичних екосистемах сипів всього світу.

15.12. Мікробіологія наземного середовища

Фізичні та хімічні умови в наземних середовищах коливаються від вологих до сухих, від теплих до холодних, від лужних до кислотих, від кисневих до безкисневих та від багатих до бідних на поживні речовини та контролюють різноманітність і життєдіяльність мікроорганізмів, що населяють сушу. Мікробіота суші існує в двох наземних середовищах на Землі – це поверхневі ґрунти та глибокі надра.

Особливості ґрунтових мікроорганізмів. Найважливішою наземною екосистемою є ґрунт. Ґрунт формується протягом тривалого часового періоду шляхом складних взаємодій материнських геологічних матеріалів (піску, матеріалів льодовикового наносу та ін.), рельєфу, клімату, наявності та діяльності живих організмів. Ґрунти з рослинним покривом мають принаймні чотири компоненти. До них відносяться неорганічна мінеральна речовина, близько 40% об'єму ґрунту; органічні речовини близько 5%; повітря і вода, приблизно 50%, мікроорганізми та макроорганізми близько 5%.

Ґрунти можна розділити на дві великі групи: мінеральні ґрунти, які сформувались через вивітрювання гірських порід та інших неорганічних матеріалів, і органічні ґрунти, які утворились з осаджень в болотах. Більшість ґрунтів є сумішшю цих двох основних типів.

У ґрунтах переважає тверда фаза. Більшість ґрунтів є в основному аеробними. Основні продуценти в ґрунтових екосистемах – рослини. Ґрунти утворюються у широкому спектрі кліматичних умов, що залежать від змін температури та вологості. У ґрунтах формуються унікальні місця перебування для багатьох організмів (бактерій, архей, грибів, найпростіших, водоростей, комах, нематод, дрібних тварин та рослин). Всі ці організми беруть участь у формуванні ґрунту.

Ґрунти містять безліч поверхонь, які впливають на доступність поживних речовин та на взаємодію мікроорганізмів. Розмір пор робить ґрунти різною мірою доступними для колонізації субстрату мікроорганізмами. Бактерії в грунті присутні у вигляді мікроколоній та біоплівок на поверхні ґрунтових частинок або у вигляді суспензії в ґрунтовому розчині в порах. Нитчасті гриби та міцеліальні форми прокаріотів здатні рости як на ґрунтових агрегатах, так і між ними, обплітаючи їх і зв'язуючи між собою.

Найпростіші мешкають у водній плівці та поїдають бактерій. Основа ґрунту складається з піску, глини, мулу та інших частинок. Органічна речовина, що постійно додається у вигляді рослинних і тваринних решток, поступово трансформується в гумус – на стабільний, багатий поживний матеріал. Всі ці компоненти формують гетерогенні агрегати різного розміру або ґрунтові частинки, що пронизані складною мережею пор.

Прокаріотні мікроорганізми та гриби використовують різні функціональні стратегії для отримання переваг у цьому фізично складному матриксі. Часто бактерії зустрічаються всередині невеликих пор (діаметром 2–6 мкм), де вони більш ймовірно не будуть з'їдені найпростішими. Міцеліальні форми мікроорганізмів, навпаки, прагнуть розташуватися на зовнішній поверхні агрегатів. Ці організми можуть формувати містки між окремими ділянками, дістаючись місця, де волога більш доступна.

Ґрунти є найважливішим середовищем і природним резервуаром проживання мікроорганізмів. Разом з рослинами та тваринами вони утворюють складні та різноманітні біогеоценози, склад, щільність, функціональна активність та інші характеристики яких залежать від типу та структури грунту, складу мінеральних і органічних речовин, фізико-хімічного стану, температури, pH, вологості, концентрації вуглекислого газу та інших факторів. У шарі орного ґрунту завтовшки 15 см на площі в 1 га може міститися від 1 до 6 тонн мікробної маси.

Ґрунти формуються в різних умовах довкілля. Там, де відбувається поява та вивітрювання нового геологічного матеріалу після виверження вулкану, починається колонізація його мікроорганізмами. Першими основними поселенцями тут є ціанобактерії, що здійснюють фотосинтез та азотфіксацію.

Велика роль у формуванні та функціонуванні грунтів належить грампозитивним бактеріям, що демонструють різний ступінь розгалуження та розвитку міцелію, а саме коринеформні та нокардіоформні бактерії, а також актиноміцети. Ці групи відіграють важливу роль у розщепленні вуглеводнів, рослинних матеріалів та ґрунтового гумусу. Деякі представники здатні руйнувати пестициди та інші ксенобіотики. Характерний запах грунту залежить від речовини геосміну, яка виділяється стрептоміцетами.

При аналізі мікробного «населення» ґрунту необхідно враховувати, що в даний час вдається культивувати лише менше 10% ґрунтових мікроорганізмів. У ґрунтах важливі також взаємодії мікроорганізмів з рослинами (ризосфера, мікориза, бульбочкові бактерії тощо).

Важливою є здатність ґрунтової бактерії *Pseudomonas syringie* синтезувати білок, що служить ядром формування льоду на поверхні листя та снігу у грозових хмарах та може впливати таким чином на погоду у глобальному масштабі.

Ґрунтові мікроорганізми мають позитивний вплив на атмосферу, використовуючи метан, водень, CO та повітряні «забруднювачі» як бензол, трихлоретилен, формальдегід. Вони впливають на глобальний вміст парникових газів CO_2, NO, N_2O, метану в атмосфері та озоновому шарі.

Метан може споживатися метанотрофами, що мешкають у ґрунті та воді. Критичним фактором, що впливає на споживання метану ґрунтом, є концентрація йону амонію. При збільшенні вмісту амонію в ґрунті через сільськогосподарську діяльність або внаслідок забруднення споживання метану знижується. Таким чином, ґрунтові та водні метанотрофи можуть розглядатися як своєрідний бактеріальний газовий фільтр.

Мікробна різноманітність грунту. Методом метагеномного аналізу у мікробному співтоваристві в одному грамі типового поверхневого ґрунту з рослинністю виявлено тисячі різних видів бактерій і архей.

На рис. 15.12 наведено різноманітність прокаріотичних ґрунтових спільнот на основі об'єднаних даних порівняння послідовності 16S рРНК, взятих із кількох ґрунтів, з якого видно, що *Proteobacteria* складають майже половину всіх виявлених філотипів.

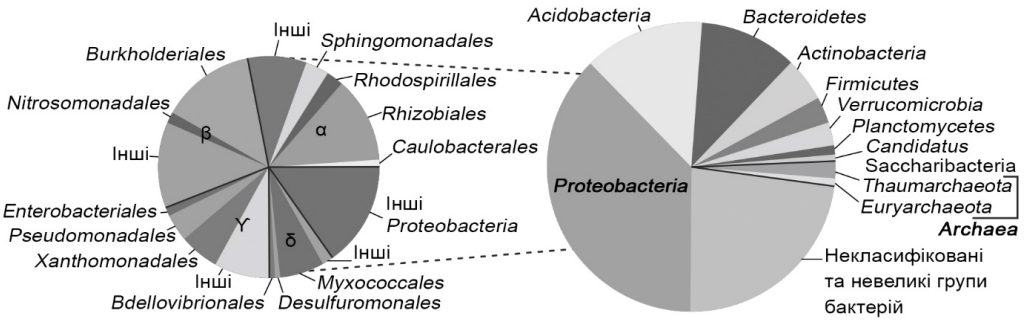


Рис. 15.12. Таксономічна різноманітність бактерій і архей ґрунтових спільнот (на основі об'єднаних даних послідовності 16S рРНК, взятих із кількох ґрунтів)

Домінування протеобактерій у ґрунтах не є дивним, тому що багате філогенетичне різноманіття, яке демонструє ця група, є результатом їх метаболічної різноманітності. Фототрофія, хемолітотрофія та широкий спектр шляхів хемоорганотрофного метаболізму як аеробних, так і анаеробних є характерними ознаками протеобактерій.

Багато псевдомонад, наприклад, генетично пристосовані для використання будь-якої з понад 200 різних органічних сполук як джерела вуглецю та енергії, що є логічною метаболічною стратегією для їх процвітання в ґрунтах, де час і природа органічних надходжень може бути дуже різною. Багато видів *Rhizobiales* можуть фіксувати N_2, інші спеціалізуються на використанні одновуглецевих сполук, а деякі навіть є хемолітотрофними або фототрофними, весь метаболізм яких може підтримуватися на поверхні ґрунту.

На відміну від бактерій різноманітність архей у ґрунті вкладається лише в два основні філуми – *Euryarchaeota* та *Thaumarchaeota*. Але низька різноманітність не обов'язково означає малу кількість клітин. Сукупність архей, що складає невелику частину загального різноманіття, може мати велике біогеохімічне значення. Наприклад, філотипи *Thaumarcheota*, що складаються виключно з архей, які окиснюють аміак, становлять невелику частину загального різноманіття ґрунту, але присутні у відносно великій кількості – вони значно перевищують чисельність бактерій порядку *Nitrosomonadales* (*Beta-proteobacteria*), що окиснюють аміак.

Молекулярно-екологічні дослідження мікробної різноманітності ґрунту показали, що вона змінюється залежно від типу ґрунту та його географічного розташування. Ґрунти з різних географічних зон демонструють подібний таксономічний розподіл на рівні філумів (наприклад, *Proteobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia* та *Planctomycetes*) та мають лише близько 20% спільних видів (філотипів).

У ґрунті ферми, який інтенсивно обробляється, спостерігається менша бактеріальна розманітність, ніж у необробленому ґрунті, що свідчить про те, що інтенсивні методи сільського господарства, які значною мірою залежать від внесення добрив та пестицидів, одноманітних рослин, що вирощуються, зменшують різноманітність мікробіоти.

Метагеномні дослідження показали, що загальний таксономічний склад забруднених і незабруднених вуглеводнями ґрунтів подібний. У ґрунтах обох типів представники філуму *Proteobacteria* складають найбільшу фракцію. Значне представництво також мають філуми *Acidobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria* і *Firmicutes*. Але землекористування та забруднення ґрунту супроводжуються загальним зменшенням різноманітності мікробної спільноти та збільшенням конкурентоспроможних видів.

Поверхневі ґрунти та підповерхневі наземні середовища забезпечують досить різні умови існування для мікроорганізмів. Через обмеження поживних речовин мікробна різноманітність та чисельність у найглибших земних середовищах, зазвичай, надзвичайно низькі.

Завдяки вдосконаленій технології буріння та асептичному відбору проб стало відомо, що мікробне життя поширюється щонайменше до 3000 метрів від поверхні Землі. Мікробне різноманіття відносно неглибоких ділянок під поверхнею подібне до різноманітності поверхневих ґрунтів.

Отже, має бути зрозуміло, що будь-яке середовище, здатне підтримувати життя, буде колонізовано мікроорганізмами. Склад мікробіоти кожного середовища, зазвичай, є наслідком того, що їх метаболізм відповідає умовам і наявним поживним ресурсам.

15.13. Роль мікроорганізмів в самоочищенні природних екосистем

Для забезпечення збалансованого колообігу речовин необхідно, щоб органічні сполуки утворювалися та розкладалися. Людина у своїй діяльності не лише змусила живі організми утворювати потрібні їй речовини в потрібних кількостях, але й синтезувала хімічним шляхом величезну кількість чужих природі сполук, які, володіють значною стабільністю та накопичуються в навколишньому середовищі.

Штучно синтезовані хімічні сполуки володіють негативною біологічною активністю (канцерогенною, мутагенною, тератогенною, алергенною) та шкідливо впливають на живі організми.

Мікроорганізми мають величезну різноманітність ферментних систем і велику лабільність метаболізму. Вони є тією ланкою, яка відповідальна за самоочищення природних екосистем і може здійснювати біодеградацію природних і синтетичних ксенобіотиків, тим самим повертаючи основні поживні елементи в глобальний цикл. У цьому розумінні мікробіота виступає в ролі «імунної системи» природного середовища, яка «знезаражує» токсичні речовини та «оздоровлює» середовище, в якому вона мешкає.

Особливу актуальність деструктивна здатність мікроорганізмів набула в останні десятиліття у зв'язку зі збільшенням в природному середовищі стійких забруднювачів антропогенного походження. Застосування живих організмів для очищення води, ґрунту та повітря від різних забруднень засноване на їх здатності до біодеградації (біоруйнування) ксенобіотиків, яка може здійснюватися різними шляхами залежно від хімічної структури речовини, що руйнується, метаболічного потенціалу наявної природної мікробіоти та умов довкілля.

Питання для самостійного контролю

1. Перелічіть основні функції мікроорганізмів у природі.
2. Що таке екологічна стратегія і як підрозділяються мікроорганізми стосовно цього показника?
3. Як утворюється та функціонує біоплівка?
4. Назвіть основні гази, що викликають парниковий ефект, та опишіть, як мікроорганізми беруть участь у їх утворенні та споживанні.
5. Що станеться, якщо раптово припиниться азотфіксація?
6. Чим відрізняється видове багатство від чисельності видів?
7. Чим екосистема відрізняється від середовища проживання?
8. Які характеристики мікробної популяції?
9. Чим мікробна популяція відрізняється від мікробної спільноти?
10. Чому багато різних фізіологічних груп організмів можуть жити в одному середовищі існування?
11. Чому клітини морських прокаріотів зазвичай досить малі?
12. Який тип бактерій і які підгрупи цього типу домінують в екосистемах гідротермальних джерел і чому?

РОЗДІЛ 16
МІКРООРГАНІЗМИ ТА БІОГЕОХІМІЧНІ ЦИКЛИ

Мікроорганізми є основними дійовими особами всіх ланок біогеохімічних циклів, чим забезпечують існування життя на Землі. Вироблені фототрофними та хемолітотрофними мікроорганізмами органічні речовини споживаються гетеротрофними мікроорганізмами та окиснюються до CO_2. Надлишок CO_2 може накопичуватись в атмосфері та сприяти глобальному потеплінню. Ключові поживні сполуки для життя перетворюються як мікроорганізмами, так і макроорганізмами, при цьому домінуча роль в перетвореннях кожної речовини належить діяльності мікроорганізмів.

Багато різних мікроорганізмів беруть участь у реакціях біогеохімічних циклів, і в багатьох випадках вони є єдиними біологічними агентами, здатними регенерувати форми елементів, необхідні іншим організмам, зокрема рослинам. Таким чином, біогеохімічні цикли елементів часто також є циклами, які генерують важливі поживні речовини для інших організмів.

Велика різноманітність мікроорганізмів відображає різноманітність середовищ існування на Землі. На додаток до відмінностей у температурі, тиску, солоності, pH і доступності поживних речовин, варіація окисно-відновного потенціалу також є надзвичайно важливою для визначення активності мікроорганізмів.

Окисно-відновний потенціал є мірою схильності молекул у системі приймати або віддавати електрони. При розгляді циклів колообігу речовин та біогеохімічній діяльності мікроорганізмів необхідно зосереджувати увагу саме на окисно-відновному потенціалі середовищ, в яких вони мещкають. Окисно-відновний потенціал середовища визначається в вольтах як різниця електричних потенціалів між середовищем і стандартним водневим електродом та позначається як Eh.

Середовища, що складаються в основному з сполук із високим окисно-відновним потенціалом (більш позитивним), з більшою ймовірністю приймають електрони (тобто відновлюються), а сполука, яка віддає електрони – окиснюється (табл. 16.1). Окисно-відновний стан середовища відіграє вирішальну роль у визначенні типу метаболізму та різноманітності присутніх мікроорганізмів, оскільки він визначає, які окиснені сполуки доступні як кінцеві акцептори електронів для анаеробного дихання та які відновлені молекули присутні для використання як донори електронів при хемолітотрофії.

Прикладом здатності мікроорганізмів пристосуватися до окисно-відновних умов середовища є відкриті нещодавно ниткоподібні бактерії, названі кабельними бактеріями, які проводять електричний струм на відстань понад 1 см у осадових відкладеннях і підземних водах. Це філаментозні дельтапротеобактерії із родини *Desulfobulbaceae*, що окиснюють сульфіди. Оскільки сульфід і кисень просторово розділені в стовпчику осаду, кабельні бактерії використовуючи ковзну рухливість, розташовуються в морських

відкладах вертикально, що дозволяє їх клітинам на безкисневому кінці нитки використовувати сульфід як донор електронів, а на протилежному кінці – кисень як акцептор електронів. При цьому електрони передаються від клітини до клітини, поки не досягнуть клітин, розташованих у кисневих відкладах, де передаються на O_2, який слугує кінцевим акцептором електронів.

Таблиця 16.1

Елементи біогеохімічного циклу та їх окисно-відновнийі стан

Елемент	Наявність газоподібного компоненту	Відновлена форма	Основні форми та валентності			Окиснена форма
			Форма проміжного ступеня окиснення			
C	Так	Метан CH_4 (-4)	Монооксид вуглецю CO (+2)	-	-	CO_2 (+4)
N	Так	Амоній NH_4^+, органічний N (-3)	Молекулярний азот, N_2 (0)	Закис азоту N_2O (+1)	Нітрит, NO_2^- (+3)	Нітрат, NO_3^- (+5)
S	Так	Сірководень H_2S, SH групи в органічних сполуках (-2)	Елементарна сірка, S^0 (0)	Тіосульфат, $S_2O_3^{2-}$ (+2)	Сульфіт, SO_3^{2-} (+4)	Сульфат SO_4^{2-} (+6)
Fe	Ні	Йон заліза, Fe^{2+} (+2)	-	-	-	Йон заліза, Fe^{3+} (+3)
P	Ні	Фосфати, (+3)	Фосфат, PO^{3-} (+3)	-	-	Поліфосфат, фосфати PO^{4-} (+5)
Mn	Ні	Йон марганцю, Mn^{2+} (+2)	Оксид марганцю MnO (+2)	-	-	Диоксид марганцю, MnO_2 (+4)

Кабельні бактерії забезпечують транспорт електронів на відносно великі відстані, з'єднуючи донори електронів з акцепторами електронів, та здійснюють розділені реакції відновлення кисню або нітратів на поверхні осаду з окисненням сульфіду у глибших безкисневих шарах осаду.

16.1. Цикл вуглецю

Вуглець – це елемент, який визначає життя, і є всюди на Землі. Основними компонентами циклу вуглецю є вуглекислий газ (CO_2) і метан (CH_4), оскільки ці гази мають великий вплив на глобальну екосистему. Колообіг вуглецю як правило розглядається з точки зору джерел походження, поглинання та резервуарів CO_2. У глобальному масштабі вуглець (C) подорожує у вигляді CO_2 через усі основні резервуари вуглецю на Землі: атмос-

феру, сушу, океани, прісну воду, осади, гірські породи та біомасу. Основну увагу при розгляді цього циклу потрібно звертати на такі питання як обсяги резервуарів вуглецю на Землі, швидкість колообігу вуглецю в резервуарах і між ними, а також зв'язок циклу вуглецю з циклами інших поживних речовин, особливо циклом азоту (N), оскільки C і N складають основну масу живих організмів.

В резервуарах вуглець зберігається впродовж геологічних періодів. Найбільшим резервуаром C на Землі є осади та гірські породи Земної кори, але швидкість, з якою вони розкладаються та видаляється вуглець у вигляді CO_2, є настільки повільною, що потік із цього резервуару є незначним у геологічному масштабі часу. Велика кількість C міститься в наземних рослинах.

У мертвому органічному матеріалі, який називається гумусом, міститься більше C, ніж у живих організмах. Гумус – це складна суміш органічних матеріалів, які не швидко розкладаються та походять переважно з мертвих рослин і мікроорганізмів. Деякі гумінові речовини досить стійкі та мають час розкладання в кілька десятиліть.

Обмін елементами між джерелами та поглиначами вуглецю називають потоками. Вуглець присутній у відновлених формах, таких як метан (CH_4) та інші більш складні органічні речовини, а в окиснених – неорганічний оксид вуглецю та вуглекислий газ (CO_2). Хоча вуглець безперервно перетворюється з однієї форми в іншу, розгляд циклу розпочнемо з відновлення CO_2 та перетворення його в органічні речовини (рис. 16.1), коли вуглець, присутній у трьох розчинених формах – вуглекислого газу, гідрокарбонату та карбонату – починає свою подорож через морський вуглецевий цикл.

Ця подорож може відбуватися трьома різними шляхами – *фізичний* океанський вуглецевий насос і два біологічні океанські вуглецеві насоси – *органічний* і *неорганічний*, що істотно відрізняються за своїми основними механізмами.

Фізичний вуглецевий насос приводиться в рух океанськими течіями та різницею їх температури та солоності. Він розподіляє розчинений вуглець (вуглекислий газ, гідрокарбонат, карбонат) шляхом занурення або підняття водних мас в океані. Цей процес є основним механізмом транспортування антропогенних викидів вуглекислого газу в глибини океану.

Органічний біологічний вуглецевий насос приводиться в дію біологічними спільнотами в поверхневих водах океану. Саме тут здійснюють фотосинтез ціанобактерії, мікроскопічні та макроводорості та морські трави, які використовують енергію сонця для виробництва біомаси. Для цього вони як будівельний матеріал використовують вуглекислий газ, розчинений у воді, та включають CO_2 у свою біомасу.

Відповідно до природних процесів океану вуглець може мігрувати через всю морську харчову мережу від гетеротрофних протист до дрібних ракоподібних, риб, морських ссавців, таких як кити, і на кожному кроці

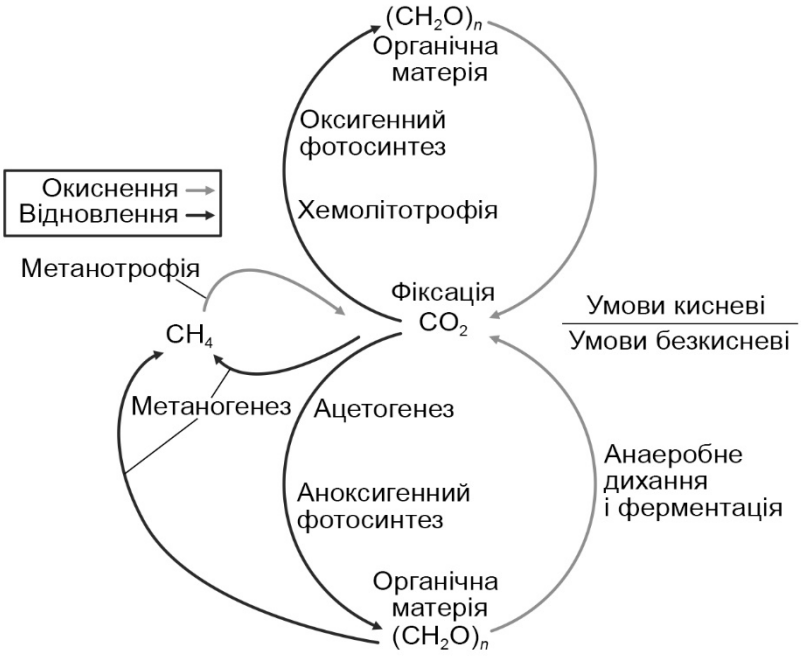


Рис. 16.1. Цикл вуглецю

вуглець перетворюється на біомасу або виділяється у вигляді фекалій. На шляху до морського дна мертвою біомасою живляться мікроорганізми, які розкладають більшу частину органічного матеріалу, тому накопичений вуглець знову виділяється в морську воду у формі вуглекислого газу.

На додаток до фотосинтезу існує *неорганічний біологічний вуглецевий насос*, за допомогою якого морські організми (протисти, молюски, корали), утворюють карбонат. Вони фіксують розчинений у воді вуглець шляхом побудови вапняних оболонок або скелетів. Після загибелі їх вапняні мушлі опускаються на морське дно, де вони формують осадові відкладення. Таким чином вуглець, що міститься в них, вилучається з природного циклу на мільйони років.

Рослини вважаються основними організмами, що фіксують CO_2, але принаймні половина вуглецю на Землі фіксується морськими мікроорганізмами – ціанобактеріями з родів *Prochlorococcus* і *Synechococcus* та діатомовими водоростями. Важливо знати, що мікроорганізми також фіксують вуглець у безкисневих середовищах за допомогою аноксигенного фотосинтезу, а також шляхом хемолітоавтотрофії без участі світла. Хемолітоавтотрофна фіксація бактеріями та археями у глибоких темних підповерхневих відкладах може становити значну частку глобальної фіксації CO_2.

Крім того, неорганічний вуглець (CO_2) може бути відновлений анаеробно до метану. Нагадаємо, що тільки археї утворюють метан у реакціях $H_2 + CO_2$ та H_2 + ацетат. Метан, що утворюється в осадах, потім окисню-

ється аеробно протеобактеріями, або анаеробно археями та денітрифікуючими бактеріями (рис. 16.1).

Велика кількість метану також утворюється у відкладах рисових полів, вугільних шахт, очисних спорудах, побутових звалищах, болотах, а також в кишківниках жуйних тварин і термітів.

Весь зафіксований вуглець потрапляє в загальний пул органічної речовини, який потім може бути окиснений гетеротрофно знову до CO_2 шляхом аеробного або анаеробного дихання та бродіння. Біодоступність і деградація органічної речовини залежить від різноманітності елементного складу, структури основних мономерів та зв'язків між ними, а також інших факторів, таких як окисно-відновний потенціал, наявність конкуренції за поживні речовини, pH, температура, O_2, осмотичні умови і склад наявного мікробного співтовариства.

Форма органічної речовини та її біохімічні перетворення визначають процеси мінералізації та іммобілізації. Мінералізація описує розкладання органічної речовини на прості неорганічні сполуки (CO_2, NH_3, CH_4, H_2). Навпаки, коли біогенні хімічні елементи (включаючи вуглець) перетворюються в біомасу та стають тимчасово недоступними для колообігу, то такі процеси називають іммобілізацією біогенних елементів.

Найшвидший спосіб передачі вуглецю здійснюється через атмосферу. Вуглекислий газ видаляється з атмосфери переважно шляхом фотосинтезу наземними рослинами і морськими мікроорганізмами та повертається в атмосферу шляхом дихання тварин і хемоорганотрофних мікроорганізмів. Найважливіший внесок CO_2 в атмосферу відбувається за рахунок мікробного розкладання мертвого органічного матеріалу.

Після промислової революції людська діяльність призвела до збільшення рівня CO_2 в атмосфері майже на 40%, головним чином через спалювання викопного палива. Зростання вмісту CO_2, основного парникового газу в атмосфері, спричинило глобальні зміни клімату, головною з яких є підвищення глобальної температури.

Не має сумніву, що глобальне потепління впливає на мікробіологічні процеси колообігу поживних речовин, оскільки біохімічна активність мікроорганізмів напряму залежить від температури. Якими будуть ці зміни та будуть вони сприятливими чи несприятливими для природи і людини є важливим напрямом активних екологічних досліджень.

16.2. Цикл азоту

Азот існує в окисно-відновних станах від -3 до +5, що відображається в перетвореннях, які керують колообігом азоту. Як показано на рис. 16.2, залежно від рівня окиснення форми азоту можуть служити акцепторами електронів при анаеробному диханні (н. п., NO_3^- і NO_2^-) або донорами електронів (н. п., NO_2^- і NH_4^+) при хемолітотрофії.

Рис. 16.2. Цикл азоту

Потрібно мати на увазі, що повністю окиснений азот (NO_3^-) може лише приймати електрони (бути акцептором), повністю відновлений (NH_4^+) може тільки віддавати електрон (бути донором), а не повністю окиснений азот (NO_2^-) може функціонувати як донор або акцептор електронів, залежно від потреби організму.

У природі молекулярний азот (N_2) становить 80% від маси Земної атмосфери, але для більшості живих організмів азот доступний лише в зв'язаній формі. До фіксації молекулярного азоту здатні тільки мікроорганізми, без них цикл азоту не міг би замкнутися. Фіксацію азоту здійснюють лише певні представники доменів *Bacteria* та *Archaea*.

Хоча фермент нітрогеназа чутливий до кисню, фіксація азоту може здійснюватися як в безкисневих, так і в кисневих умовах. Бактерії, такі як *Azotobacter spp*. і ціанобактерії роду *Trichodesmium* фіксують азот аеробно, тоді як *Clostridium spp*. – анаеробно. Найкраще вивченими азотфіксаторами є бактерії-симбіонти бобових рослин, у тому числі ризобії, їх альфапротеобактеріальні родичі та кілька бетапротеобактерій. Види актиноміцетів роду *Frankia* фіксують азот у симбіозі з багатьма видами деревних чагарників, ціанобактерії *Anabaena spp.* – з водяною папороттю *Azolla spp*.

Азотфіксуючі бактерії життєво важливі для аграрного виробництва. Продуктом фіксації N_2 є аміак (NH_3), який відразу вводиться в структуру

органічних сполук у вигляді аміногруп, а коли органічна речовина розкладається та мінералізується, азот виділяється у вигляді амонію (NH_4^+).

Повністю відновлений до амонію азот у процесі нітрифікації слугує донором електронів (рис. 16.2). На першому етапі амоній окиснюється до нітриту (NO_2^-), а на другому – до нітрату (NO_3^-). Нітрифікація, як правило, здійснюється бактеріями двох різних груп. Наприклад, деякі археї та бактерії з родів *Nitrosomonas* і *Nitrosococcus* відіграють важливу роль в окисненні аміаку, тоді як *Nitrobacter spp*. і споріднені бактерії здійснюють окиснення нітритів. Бетапротеобактерія *Nitrosomonas eutropha* окиснює амоній анаеробно до нітриту та оксиду азоту (NO), а диоксид азоту (NO_2) використовує як акцептор електронів у реакції денітрифікації. Здатність виконувати обидва етапи нітрифікації притаманна лише кільком унікальним видам *Nitrospira*, які одержали назву комаммокс.

Вироблений мікроорганізмами в процесах нітрифікації нітрат асиміляційно відновлюється та включається до мікробної та рослинної біомаси. В той час як різноманітні бактерії, включаючи *Pseudomonas denitrificans, Geobacter metallireducens* і *Desulfovibrio spp*., використовують нітрат як кінцевий акцептор електронів при анаеробному диханні та реакціях денітрифікації дисиміляційно відновлюють його до N_2, який видаляється з екосистеми, та закису азоту N_2O, що є важливим парниковим газом.

Хемолітотрофні бактерії філуму *Planctomycetes* в анаеробних умовах здійснюють анаммокс-реакцію окиснення амонію. При цьому йон амонію (NH_4^+) служить донором електронів, а нітрит (NO_2^-) – кінцевим акцептором електронів з утворенням газоподібного азоту (N_2). Фактично, анаммокс-реакція є коротким шляхом до утворення N_2 з амонію, оминаючи етап утворення нітрату (рис. 16.3).

Відкриття анаммокс бактерій, які окиснюють NH_4^+ до N_2 є важливим для розуміння біохімічних процесів при розробці біотехнологій очистки стічних вод, в яких не бажаним є вміст великої кількості аміаку в очищених стічних водах, що скидаються в природні водойми.

16.3. Цикл фосфору

Всі живі клітини потребують фосфору для утворення нуклеотидів, фосфопротеїдів, фосфоліпідів, коферментів, АТФ. Фосфор спочатку надходить в екосистеми переважно шляхом вивітрювання фосфатовмісних порід і засвоюється у вигляді фосфатів. Значним джерелом фосфору для морських мікроорганізмів є також фосфонати, які мають зв'язок С-Р і входять до складу пральних порошків та попадають зі стічними водами в морське середовище.

У ґрунті фосфор міститься в неорганічній та органічній формах. Органічний фосфор міститься в біомасі, але також в таких природних матеріалах, як гумус та інших органічних сполуках, в яких він легко переробляєть-

ся мікроорганізмами. Неорганічний фосфор негативно заряджений, тому він утворює комплекси з позитивно зарядженими елементами в навколишньому середовищі, такими як залізо, алюміній та кальцій. Ці сполуки відносно нерозчинні та найбільш доступі для рослин і мікроорганізмів при pH 6–7. Мікроорганізми перетворюють простий ортофосфат (PO_4^{3-}) в більш складні форми (поліфосфати, нуклеотиди, фосфоліпіди та ін.).

Фосфор потрапляє в ґрунт і воду шляхом розкладання відмерлих організмів, вивітрювання гірських порід, внесенням добрив. Фосфат в грунті та фосфат, фосфіт і фосфонати в воді споживаються мікроорганізмами та передаються по харчовому ланцюгу. Однак значна частина фосфору може вимиватися з ґрунту, переноситися на великі відстані та утворювати з катіонами нерозчинні сполуки.

16.4. Цикл сірки

Основною доступною формою сірки в природі є сульфат. Колообіг сірки подібний з циклом азоту в тому, що залежно від ступеня окиснення різних форм сірки, вони можуть служити акцептором електронів, донором електронів або донором і акцептором (рис. 16.3). Сірка необхідна для утворення сірковмісних амінокислот (метіоніну та цистеїну), білків, вітаміну B_1 та інших сполук.

Сульфат – повністю окиснена форма сірки, відновлюється мікроорганізмами та рослинами в реакції асиміляційної сульфатредукції та вико-

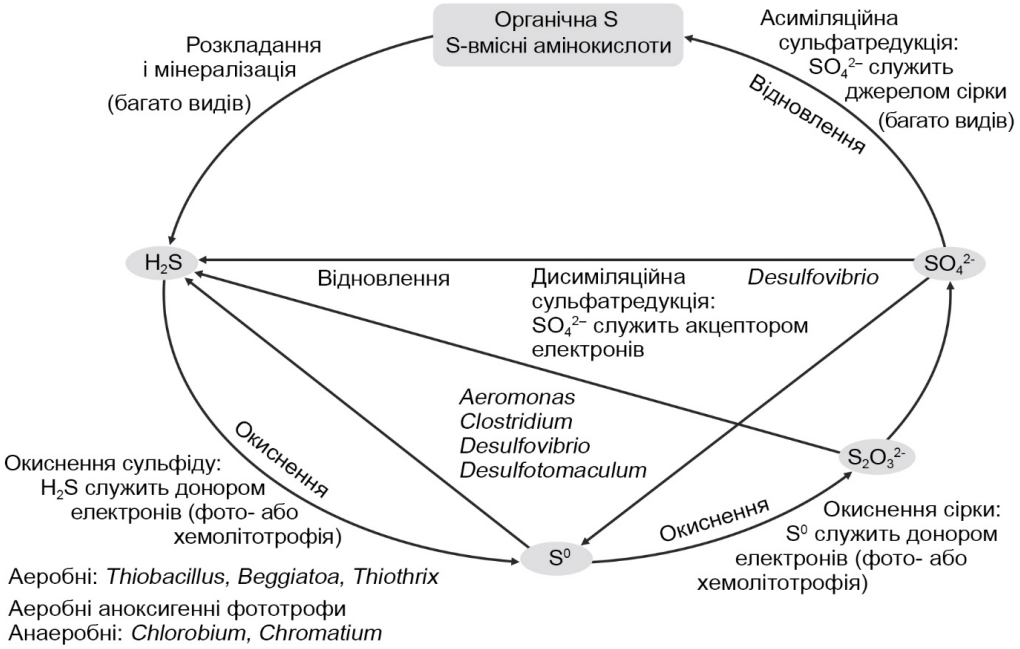


Рис. 16.3. Цикл сірки

ристовується в біосинтезі амінокислот та білків. Навпаки, в безкисневому середовищі існування мікроорганізми дисиміляційно відновлюють сульфат. Він служить акцептором електронів при анаеробному диханні різноманітними мікроорганізмами, включаючи дельтапротеобактерії, такі як *Desulfovibrio* і *Desulfonema spp.* і археї, що належать до роду *Archaeoglobus*. При цьому сірка відновлюється до елементарної сірки та сульфіду, які можуть служити джерелом електронів для аноксигенних фотосинтезуючих мікроорганізмів та хемолітоавтотрофів, таких як бактерії філуму *Chlorobi* та роду *Thiobacillus,* відповідно. Представники роду *Desulfuromonas*, термофільні археї та ціанобактерії в гіперсолоних відкладах здійснюють дисиміляційне відновлення елементарної сірки (S^0). Сульфіт (SO_3^{2-}) є ще одним критичним проміжним продуктом, який може бути відновлений до сульфіду різними способами бактеріями роду *Alteromonas, Clostridium, Desulfovibrio* і *Desulfotomaculum*.

Диметилсульфонілпропіонат (ДМСП) є важливою органічною сполукою сірки, яку виробляє морський фітопланктон. Після загибелі клітин ДМСП вивільняється, і бактеріопланктон використовує його як джерело сірки і вуглецю. Він метаболізується до диметилсульфіду (ДМС) і виноситься в атмосферу. Там ДМС швидко перетворюється на різноманітні сполуки сірки, які служать ядрами для утворення крапель води, сприяючи утворенню хмар. Відповідно можна припустити, що збільшення виробництва ДМС мікроорганізмами може сприяти пом'якшенню наслідків глобальних змін клімату.

16.5. Цикл заліза

Залізо входить в склад цитохромів, за допомогою яких здійснюються окисно-відновні реакції в організмі. Цитохроми містять залізопорфіриновий комплекс, в якому залізо знаходиться у формі Fe^{2+}. Воно легко переходить із Fe^{2+} в Fe^{3+} і навпаки, внаслідок чого цитохроми здатні слугувати в клітині транспортерами електронів.

У циклі заліза (рис. 16.4) відбувається обмін двовалентного заліза (Fe^{2+}) на тривалентне залізо (Fe^{3+}). У аеробних середовищах з нейтральним pH залізо присутнє переважно у нерозчинному стані. Розчинність обох форм збільшується з підкисленням і при pH 4 і нижче залізо знаходиться у воді в розчиненому стані. Засвоєння заліза становить проблему для більшості аеробних мікроорганізмів.

Хоча залізо є необхідним елементом, але доступне залізо в формі Fe^{2+}, зазвичай, присутнє в дуже малих кількостях на відміну від Fe^{3+}. Для вирішення проблеми поглинання заліза в аеробних умовах мікроорганізми використовують сидерофори. Сидерофори – це низькомолекулярні органічні молекули, які зв'язують Fe^{3+}, сприяючи його транспортуванню в клітину, де воно відновлюється до Fe^{2+}.

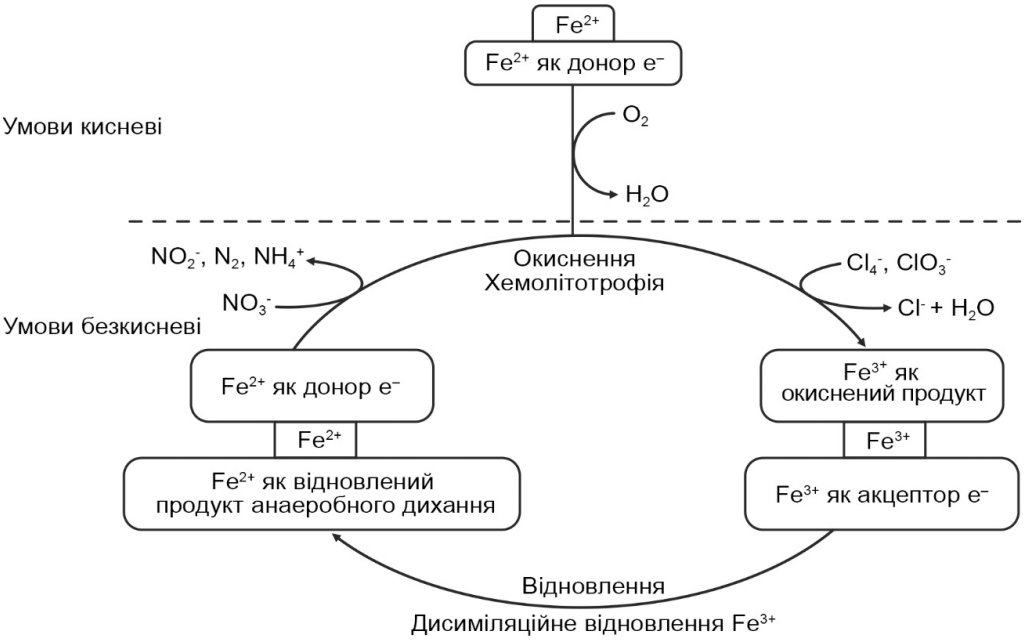


Рис. 16.4. Цикл заліза

У більшості середовищ Fe^{3+} зустрічається в основному в кристалічній формі (наприклад, гематит і магнетит) і як компонент осадових глин. В анаеробних умовах мікроорганізми вирішують проблему асиміляції заліза шляхом дисиміляційного відновлення, використовуючи тривалентне залізо (Fe^{3+}) як акцептор електронів. При цьому деякі анаеробні мікроорганізми переносять електрони з електронтранспортного ланцюга назовні клітини до нерозчинних форм Fe^{3+}, з якими клітина контактує, відновлює його та поглинає.

До дисиміляційного відновлення Fe^{3+} здатні представники родів архей *Euryarchaeota* і *Crenarchaeota*, а також усі п'ять класів протеобактерій, *Firmicutes*, *Deferribacteraceae, Acidobacteria, Thermotoga* і *Termus*. Це філогенетичне різноманіття може відображати давність механізмів відновлення Fe^{3+}. Вважається, що життя почалось в середовищі, яке було багате на Fe^{2+}. Фотоокиснення Fe^{2+} до Fe^{3+} і H_2 могли забезпечувати джерелом енергії ранні форми клітин.

Магнетотактичні бактерії, такі як *Aquaspirillum magnetotacticum*, перетворюють позаклітинне залізо на оксидний мінерал магнетит (Fe_3O_4) і будують внутрішньоклітинні магнітні компаси, з допомогою яких вони, ймовірно, використовують магнітні поля для міграції.

Крім того, деякі бактерії дисиміляційно відновлюють залізо до магнетиту (Fe_3O_4) та поза клітиною відкладають його. У відновленому стані (Fe^{2+}) може бути використане як донор електронів хемолітотрофними

мікроорганізмами (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, термофільні кренархеоти роду *Sulfolobus*) в кислому кисневому середовищі, де воно розчинне, а кисень може служити акцептором електронів. При нейтральному pH обактерії з родів *Marinobacter*, *Leptothrix* і *Gallionella* за наявності кисню окиснюють Fe^{2+}.

Двовалентне залізо може бути окиснене в безкисневих умовах з використанням нітрату як акцептора електронів. *Dechlorosoma suillum* для окиснення Fe^{2+} використовують перхлорат (ClO^{4-}) і хлорат (ClO^{3-}) як акцептори електронів. Оскільки перхлорат є основним компонентом боєприпасів, що вийшли з експлуатації, *D. suillum* може бути використаний у біоремедіації місць, забруднених перхлоратом.

Необхідно розуміти, що більшість біогеохімічних циклів відбуваються шляхом окисно-відновних реакцій, в результаті чого елемент рухається по екосистемі. Часто цикли тісно пов'язані між собою, причому перетворення в одному циклі впливають на одну або більше ланок інших циклів. Наприклад, сірководень (H_2S) фототрофними та хемолітотрофними мікроорганізмами окиснюється до молекулярної сірки (S_0) і сульфату (SO_4^{2-}), який є джерелом сірки для рослин.

Фототрофи та хемолітотрофи є автотрофами і, таким чином, впливають на кругообіг вуглецю, утворюючи новий органічний вуглець із CO_2. Однак SO_4^{2-} може бути відновлений до H_2S сульфатвідновлюючими бактеріями, які споживають органічний вуглець, і це відновлення замикає біогеохімічний цикл сірки.

Колообіг азоту також є мікробіологічним процесом і є ключовим для регенерації форм азоту, придатних для використання рослинами та іншими організмами. Цикл азоту здійснюється як хемолітотрофними, так і хемоорганотрофними бактеріями, організмами, які, відповідно, виробляють і споживають органічний вуглець.

Беззаперечним є те, що активна діяльність людини впливає на мікробіологічні цикли біогенних елементів та спричиняє глобальні зміни в біосфері Землі. Оскільки основні цикли біогенних елементів тісно пов'язані між собою, ймовірно, що значні зміни, які вже відбуваються в циклах вуглецю та азоту, матимуть вплив і на цикли інших елементів.

Ці зміни можуть порушити баланс і взаємозв'язки біогеохімічних циклів в біосфері Землі, керованих діяльністю мікробних спільнот, які чітко пристосовані до середовища, і можуть мати в недалекому майбутньому значні і поки незрозумілі наслідки.

16.6. Мікроорганізми та глобальні зміни клімату

Діяльність мікроорганізмів має вирішальне значення для підтримки динамічної рівноваги біосфери Землі. Зміни в фізичному та хімічному середовищі, до яких адаптовувалися мікроорганізми, відбувалися впродовж мікробної еволюції. У минулому столітті швидкість надходження в атмос-

феру CO_2 та інших парникових газів значно виросла. N_2O, CO_2 і CH_4 є парниковими газами, оскільки вони затримують тепло в атмосфері та не дозволяють йому випромінюватися в космос.

Швидкість, з якою ці гази потрапляють в атмосферу, перевищує швидкість, з якою природні цикли вуглецю та азоту можуть їх асимілювати. Постійне зростання концентрації цих газів в атмосфері (рис. 16.5) призводить до глобального потеплінням, що проявляється в змінах сили вітру, кількості опадів, температури океану й атмосфери.

Найбільш поширеним парниковим газом є вуглекислий газ, глобальний рівень якого за приблизно 150 років зріс з 278 проміле (частка молекул CO_2 серед мільйона часток усіх інших молекул) до понад 400 проміле (рис. 16.5). Більша частина цього зростання спричинена спалюванням викопного палива, яке щорічно виділяє близько 10 мільярдів тонн CO_2, та вирубкою лісів, що додає ще 1,2 мільярда тонн CO_2 щорічно.

Викопне паливо (н. п., нафта, вугілля) утворилося з розкладеної органічної речовини, яка виникла за мільйони років фіксації CO_2, що забирався мікроорганізмами і рослинами з атмосфери. Законсервований вуглець весь час зберігався глибоко в Землі. При спалюванні добутого палива CO_2 повертається в атмосферу за дуже короткий проміжок часу, порівняно з часом його накопичення, що призводить до втрати рівноваги потоків вуглецю, оскільки надходження CO_2 в атмосферу значно перевищує швидкість його видалення за рахунок фіксації.

Інша ситуація з вирубкою лісів, оскільки рослини вилучають з атмосфери значну кількість CO_2 та перетворюють його на біомасу. Зі збільшенням вирубки лісів зменшується поглинання вуглецю і, відповідно, зростає його концентрація в атмосфері.

В той же час при розкладанні утвореної біомаси виділяються парникові гази CO_2, CH_4 і N_2O. Глобальне підвищення температури призводить до вивільнення великої кількості органіки, захороненої в вічній мерзлоті субарктичних регіонів, що різко посилює дихання ґрунтових мікроорганізмів та додаткове виділення великої кількості CO_2.

З іншого боку, метан, що є парниковим газом, викликає все більше занепокоєння, оскільки він приблизно в 30 разів має вищий потенціал до підвищення температури, ніж CO_2. Рівень метану за останні 150 років зріс у 2,5 рази, що становить 1890 молекул на мільярд усіх інших (рис. 16.5), через що у всьому світі значно виріс інтерес до розуміння процесів, що контролюють продукцію та окиснення метану мікроорганізмами.

Парникові гази оксиди азоту NO та N_2O, які разом позначаються «Nox», мають приблизно в 280 разів більший потенціал впливу на глобальне потепління, ніж CO_2. Цей вплив можна пояснити значним збільшенням виробництва та використання азотвмісних мінеральних добрив у аграрному виробництві. Після Другої світової війни використання добрив зросло приблизно в 500 разів.

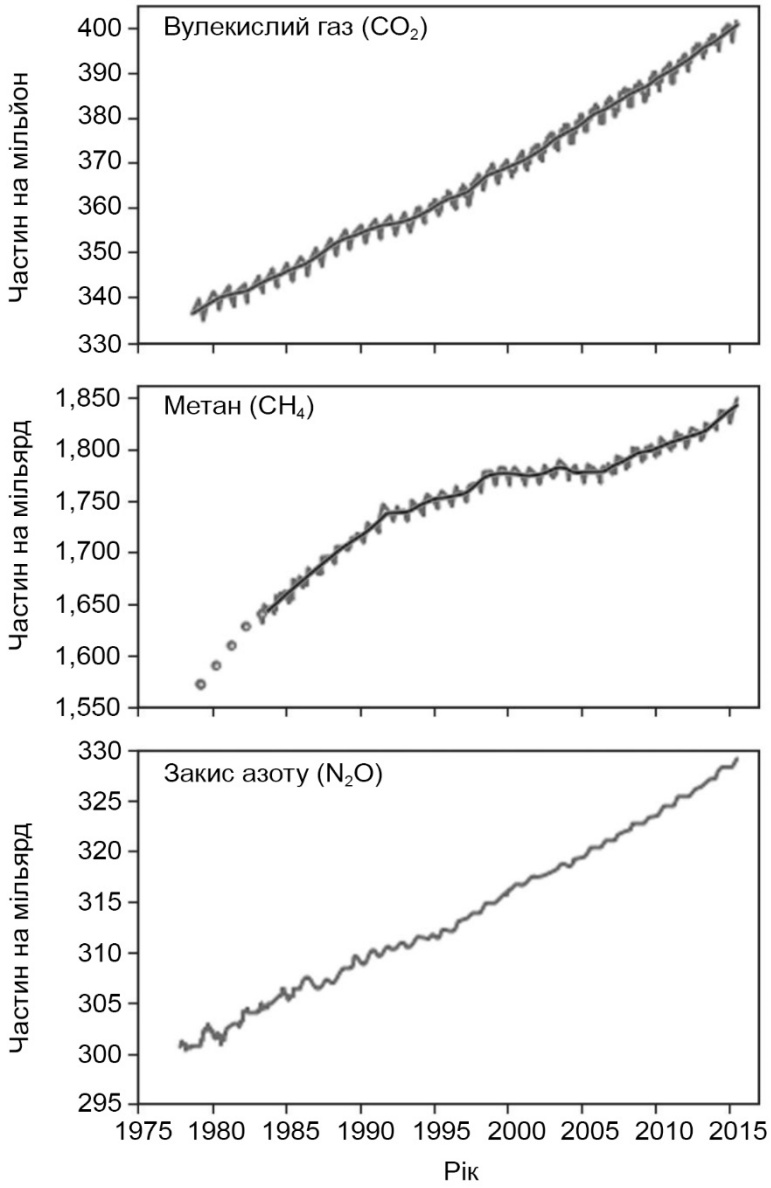


Рис. 16.5. Динаміка концентрації парникових газів в атмосфері

Додавання такої кількості мінерального азоту в ґрунт різко змінило баланс колообігу азоту, оскільки значна частина внесеного амонію перетворюється нітрифікуючими мікроорганізмами в нітрат, а нітрат – денітрифікаторами в молекулярний азот та парникові гази Nox. Вірогідно, що нітрифікуючі та денітрифікуючі мікроорганізми, підживлені азотними добривами, відповідають за найвищі рівні парникового газу N_2O за останні 650 тис. років.

Середня температура повітря з 1975 року зросла приблизно на 0,5 °С (NASA, "GISS Surface Temperature Analysis"). Прогнозується, що за збереження тенденції зростання темпів викидів парникових газів до 2100 року середня глобальна температура поверхні підвищиться на 6,4 °С (рис. 16.6). Як мікробім Землі відреагує на ці глобальні зміни?

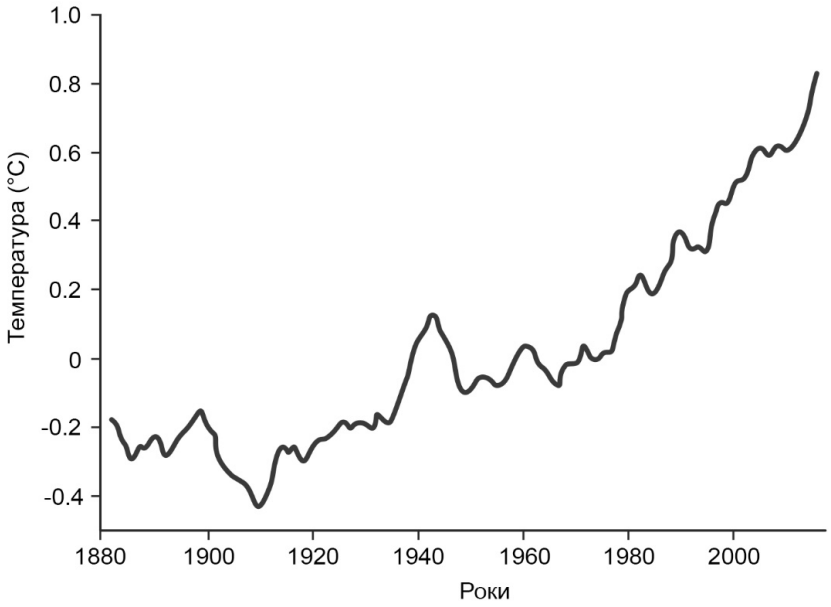


Рис. 16.6. Динаміка глобальної середньорічної температури повітря на поверхні землі

Мікроорганізми є головним чинником збалансованого колообігу елементів в біосфері, тому зміни їх активності мають великий вплив на накопичення парникових газів та глобальні зміни клімату. Розуміння біогеохімічних глобальної ролі мікроорганізмів у збалансуванні потоків вуглецю та азоту відкриває нові напрямки дослідження в мікробіології.

Питання для самостійного контролю

1. Який внесок мікроорганізмів у глобальну фіксацію вуглецю?
2. Які процеси призводять до мінералізації та іммобілізації вуглецю?
3. Яке значення залізо могло мати в еволюції раннього життя?
4. Як хемолітоавтотроф може зв'язати цикли вуглецю та сірки.
5. Назвіть парникові гази. Опишіть їх походження.
6. Як потік одного елемента впливає на циклічність іншого?
7. Яка роль біогеохімічних циклів у збереженні життя на Землі?
8. Поясніть зв'язок між накопиченням парникових газів і мікробним колообігом вуглецю та азоту.
9. Поясніть походження парникових газів CO_2, метану та оксиду азоту.

РОЗДІЛ 17
ВЗАЄМОДІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ З ІНШИМИ ОРГАНІЗМАМИ

Більшість мікроорганізмів живуть у складних спільнотах, що включають організми з різним ступенем організації та метаболізмом. Стійка взаємодія між двома різними організмами, що живуть у тісному фізичному контакті, називається симбіозом. Основою виникнення симбіозу можуть бути трофічні, просторові, захисні чи інші типи зв'язків. Однак, у багатьох випадках переваги, що надає асоціація, не з'ясовані.

При найвищому ступені зв'язків (кооперації) формується консорціум – структурована симбіотична асоціація популяцій двох або більше видів мікроорганізмів, яка передбачає тісну інтеграцію їх метаболізму. В результаті симбіотичних зв'язків члени асоціації отримують виграш у цій співпраці.

Характер взаємовідносин мікроорганізмів з різними макроорганізмами визначається за допомогою формування відповідних біотичних зв'язків, причому один багатоклітинний організм може вступати в зв'язок із кількома різними мікроорганізмами одночасно.

При тривалому співіснуванні між мікро- і макроорганізмом відбувається процес їхньої спільної коеволюції. Це призводить до збільшення генетичної пластичності популяції, перенесення генів та інше. На прикладі ентеробактерій показано, що в симбіотичних популяціях їх клітини різноманітніші, ніж у вільноживучих. Хазяїн, зазвичай, надає сильніший вплив на структуру популяцій мікросимбіонту, ніж умови довкілля. У симбіозах мікроорганізмів проявляються властивості та ознаки, не потрібні для них самих, але такі що підвищують життєздатність хазяїна. Через спільну коеволюцію облігатні симбіонти втратили частину фунцій, тому не здатні розвиватися поза організмом хазяїна.

Особливістю симбіозів між мікро-і макроорганізмами слід вважати також загальний потік енергії, спільне регулювання експресії генів та наявність взаємної передачі фізіологічної, клітинної, організмової інформації з використанням різних регуляторних систем.

Як правило, мікроорганізми не є поодинокими одноклітинними істотами, а пов'язані в спільнотах з іншими мікроорганізмами в біоплівках на поверхнях або у вигляді завислих у воді агрегатів клітин. Саме спільноти взаємодіючих мікробних гільдій та популяцій, а не окремі організми, контролюють процеси навколишнього середовища.

Оскільки мікробні симбіози є результатом тисяч, а то й мільйонів років спільної еволюції, процеси їх взаємодії оптимізовані на рівні метаболомів та геномів. Тому залежно від багатьох чинників симбіотичні взаємодії варіюють від дуже стабільними до тимчасових. Симбіонти можуть жити всередині хазяїна як ендосимбіонти або на поверхні хазяїна як ектосимбіонти.

Менший організм у симбіотичних стосунках називають симбіонтом, а більший — хазяїном, а при взаємовигідній взаємодії ці організми розгля-

даються як партнери. Те, що колись вважалося зв'язкою мікроорганізм-хазяїн, іноді називають метаорганізмом, голобіонтом або суперорганізмом, щоб відобразити обов'язковий характер взаємодії партнерів.

17.1. Типи симбіотичних зв'язків

Залежно від того яку вигоду чи шкоду отримують партнери виділяють типи *партнерських взаємодій* – мутуалізм, кооперація, коменсалізм та *антагоністичних взаємодій* – аменсалізм, хижацтво, паразитизм і конкуренція. Чіткі межі між типами симбіозів часто важко визначити, до того ж вони можуть переходити одна в одну.

Мутуалізм (лат. mutuus – взаємність) це такий тип тісних партнерських відносин, в яких певну взаємну вигоду отримують обидва партнери. Це обов'язкові відносини, в яких обидва партнери залежать один від одного, а в багатьох випадках розділені окремі організми не виживають. Класичним прикладом мутуалістичних відносин є симбіоз бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* з бобовими рослинами, коли мікроорганізм і рослина обмінюються поживними речовинами. Бактерії отримують від рослини мінеральні поживні речовини, донори електронів для відновлення N_2, захист нітрогенази від токсичної дії кисню, а рослина отримує джерело азоту.

Кооперація, як і мутуалізм, це взаємовигідний тип партнерських відносин, але співіснуванням партнерів не є тісним та обов'язковим. Однак, часто важко відрізнити обов'язкове від необов'язкового, тому що те, що є обов'язковим в одному середовищі існування може не бути таким в іншому. Більш чіткою відмінністю є те, що при кооперації організми можуть рости незалежно, хоча іноді вони не можуть функціонувати повноцінно. Так, члени нормальної мікробіоти людини виконують важливі функції (синтез вітамінів, дозрівання імунної системи, конкуренція при заселенні небажаних мікроорганізмів та ін.) для організму людини, а самі отримують притулок з оптимальними умовами та харчуванням.

Коменсалізм (лат. com – разом; mensa – трапеза) – це відносини, в яких один симбіонт коменсал отримує користь, а хазяїну не завдається ніякої шкоди чи допомоги. Просторова близькість до хазяїна дозволяє коменсалу споживати речовини, захоплені хазяїном, при цьому коменсал часто знаходить притулок на/в хазяїні. Коменсал безпосередньо не залежить від метаболізму хазяїна, тому може виживати без нього.

Коменсальні асоціації також виникають, коли одна група мікроорганізмів змінює умови середовища, що робить його більш придатним для інших організмів. Прикладом цього є формування біоплівки при колонізації поверхні популяцією мікроорганізмів одного виду (початковий колонізатор), що дає можливість іншим мікроорганізмам прикріпитися до матриксу уже створеної біоплівки.

До антагоністичних взаємодій відноситься аменсалізм, конкуренція, паразитизм та хижацтво.

Аменсалізм (від а... – заперечний префікс і лат. mensa – трапеза) – це тип антагоністичної взаємодії, коли одні мікроорганізми утворюють продукти метаболізму, що несприятливо впливають на інші мікроорганізми. Або мікроорганізми, що швидше розмножуються, першими поглинають поживні речовини та займають екологічну нішу. Наприклад, флуоресцентні псевдомонади за рахунок синтезу сидерофорів поглинають йони заліза, тим самим обмежуючи ріст інших бактерій.

Утворені мікроорганізмами речовини (органічні кислоти, спирти та ін.), що змінюють середовище, можуть робити його непридатним для росту інших мікроорганізмів. Таким прикладом є взаємовідносини між молочнокислими та гнильними бактеріями в молоці. Парне молоко містить переважно гнильні бактерії і лише декілька відсотків – молочнокислих. Однак за добу молочнокислі бактерії, що продукують молочну кислоту, пригнічують ріст гнилісної мікробіоти та зводять її вміст до мінімуму.

Інші мікроорганізми проявляють антагоністичну дію продукуванням речовин, що мають цидну або статичну дію по відношенню до інших мікроорганізмів. Класичним прикладом аменсалізму є виробництво антибіотиків, які можуть пригнічувати або вбивати чутливі мікроорганізми.

Цікавим прикладом аменсалізму є мурахи роду *Acromyrmex*, які вирощують для власного споживання на своєму «огороді» гриби роду *Leucocoprinus*. Здатність виконувати це складне завдання залежить від актинобактерій з роду *Pseudonocardia*, які виробляють специфічні сполуки, що перешкоджають росту шкідника вирощуваних грибів – хижого гриба *Escovopsis spp*. (рис. 17.1).

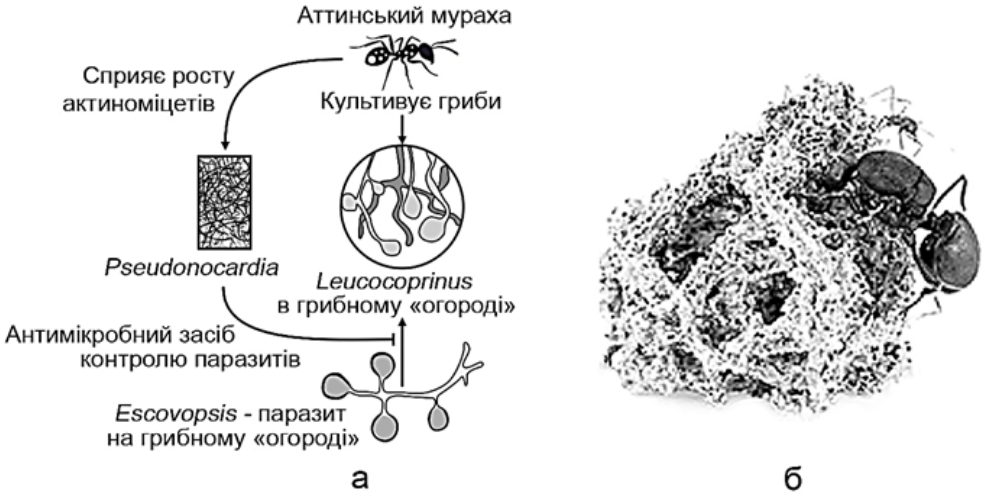


Рис. 17.1. Схема застосуванням мурахами *Atta mexicana* актинобактерій *Pseudonocardia*, що продукують антигрибкові речовини, для боротьби з паразитами в їх грибному «огороді» (а), Мурахи *Atta mexicana* на грибному «огороді» (б).

Мільйони років спільної еволюції призвели до появи мурах, які культивують певні штами грибів *Leucocoprinus*, на яких паразитують хижі гриби *Escovopsis spp*. Для захисту культивованих грибів мурахи в ході еволюційної історії розвили складні крипти в своїх екзоскелетах для перенесення та засівання підготовленого ними рослинного субстрату для вирощування актинобактерій *Pseudonocardia*, що виробляють антибіотик проти хижих грибів.

Антагоністичні взаємодії включають також вбивство (хижацтво), експлуатацію (паразитизм) і конкуренцію. Ті, хто отримують біохімічні прекурсори та енергію після вбивства жертви, є хижаками; паразити отримують користь, поки жертва жива. Конкуренцію найкраще охарактеризувати як непросте перемир'я між залученими до взаємодії мікроорганізмами.

Хижацтво характрне для мікроорганізмів, які нападають і вбивають свою жертву. Вони використовують різні стратегії – одні поодинці атакують свою здобич, а інші – групами. Екзохижаки прикріплюються до клітини жертви та виділяють літичні ферменти, які лізують клітину, а ендохижаки проникають в периплазму або цитоплазму клітини жертви та споживають її вміст.

Бактерії роду *Bdellovibrio* використовують стратегію одинокого ендохижака та вражають грамнегативні бактерії, в той час як гамапротеобактерії роду *Lysobacter* і дельтапротеобактерії роду *Myxococcus* полюють популяцією клітин, подібно до вовчої зграї, використовуючи ковзну рухливість накривають своїми клітинами клітини здобичі, колективно виділяють гідролітичні екзоферменти та споживають утворений лізат клітин жертв. Прикладом хижаків також є протисти, які харчуються переважно бактеріями та археями, поїдаючи їх.

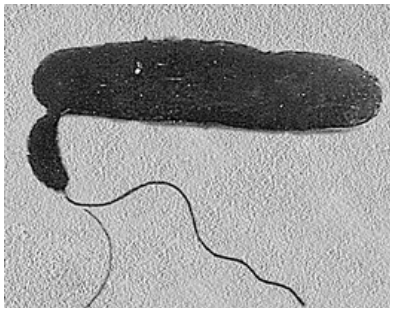


Рис. 17.2. *Bdellovibrio bacteriovorus* нападає на бактерію-жертву

Життєвий цикл бактерій роду *Bdellovibrio* починається з енергійної атаки хижака на клітину жертви. Хижак прикріплюється до клітинної стінки жертви безжгутиковим кінцем (рис. 17.2). Завдяки швидкій роботі джгутика клітина обертається навколо своєї довгої осі зі швидкістю, що перевищує 100 об/с. У результаті такого свердління в клітинній стінці жертви

з'являється отвір і клітина бделовібріона проникає у периплазматичний простір жертви та там розмножується.

Паразитизм є одним із самих складних мікробних взаємодій, при яких мікроорганізм-паразит отримує певну вигоду, але при цьому наносить шкоду хазяїну, що може призвести до загибелі останнього. Паразит і хазяїн повинні співіснувати принаймні тимчасово, щоб мікроорганізм-паразит мав достатньо часу для розмноження та колонізації нового хазяїна.

Співіснування може передбачати отримання паразитом поживних речовин, фізичне утримання в або на хазяїні, або і те, і інше. При цьому бажано підтримувати рівновагу між паразитом і хазяїном. Якщо баланс сприятливий для хазяїна (наприклад, завдяки сильному імунному захисту), паразит втрачає своє середовище існування і може не вижити. З іншого боку, якщо рівновага зміщується на користь паразита, то хазяїн може постраждати від дії паразита та не вижити. При збалансованих відносинах співіснування «паразит-хазяїн» може зберігатись тривалий час і паразитичний характер відносин може бути не очевидним.

Важливим аспектом багатьох симбіотичних стосунків, у тому числі паразитизму, є те, що з часом симбіонт відкидає надлишкову, невикористану геномну інформацію (геномна редукція). Це відбувається, коли симбіонт стає залежним через використання ключових метаболітів хазяїна, що спостерігається у збудників захворювань людини *Mycobacterium leprae, Mycoplasma genitalia* і *Encephalitozoon cuniculi*, які тепер можуть виживати лише всередині клітини свого хазяїна.

Конкуренція виникає, коли різні організми в популяції, гільдії чи спільноті намагаються використати один і той самий ресурс (фізичне місце розташування чи конкретна обмежена поживна речовина). При конкуренції мікроорганізми змагаються за загальні блага.

Якщо один із двох конкуруючих організмів має вищу швидкість росту, займаючи фізичне середовище існування, чи швидше споживає обмежену поживну речовину, він може домінувати в спільному середовищі. Це явище названо конкурентним виключенням. Конкурентне виключення частково пояснює феномен колонізаційної резистентності коли нормальна кишкова мікробіота запобігає розвитку патогенів і кишковому захворюванню.

Між видами взаємовідносин існують перехідні форми. Іноді важко визначити, чи цей тип взаємовідносин є мутуалістичним, чи паразитичним. Ступінь користі або шкоди, одержуваних кожним із партнерів можна оцінити, порівнявши стан двох партнерів за незалежного існування з їх станом в асоціації. Крім того, природа взаємин може змінюватися при зміні умов навколишнього середовища, так що взаємини, які почались як взаємовигідні, можуть стати паразитичними, і навпаки.

Далі розглянемо конкретні приклади симбіотичних зв'язків мікроорганізмів з іншими мікроорганізмами, рослинами, безхребетними та хребетними тваринами.

17.2. Симбіози між мікроорганізмами

Лишайники – є традиційним прикладом симбіотичної асоціації, що розвинулась до появи судинних рослин. Симбіоз лишайників походить від давньої мутуалістичної асоціації між двома домінуючими мікроорганізмами: грибом, зазвичай аскоміцетом, і водорістю, або ціанобактерією. Ця асоціація є однією з найдавніших форм життя наземних організмів, її можна простежити за 400 мільйонів років до девонського періоду.

Грибний партнер називається мікобіонтом, а водорості та ціанобактеріальний партнер – фікобіонтом. Водорість або ціанобактерія є фототрофним партнером і виробляє органічну речовину, яка живить гриб. Азотфіксуючі ціанобактерії (*Anabaena* або *Nostoc*) забезпечують гриб також джерелом азоту. Грибний партнер утворює структуровані шари (талом), в яких у верхній частині, щоб отримати найбільше сонячного світла, розташований шар водоростей (рис. 17.3). У кількох лишайників два фототрофних види можуть існувати в одному таломі.

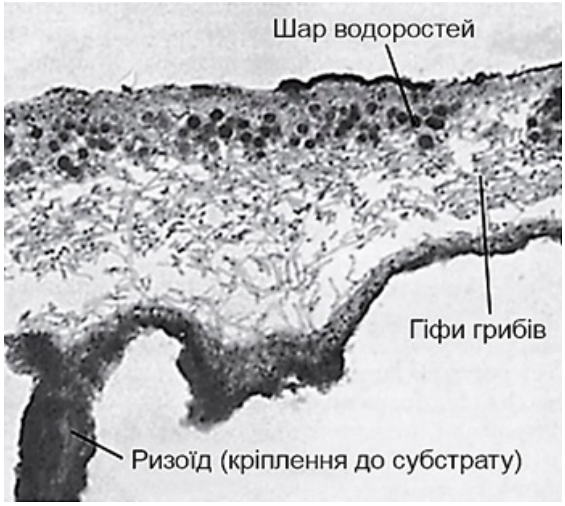


Рис. 17.3. Мікрофотографія поперечного зрізу талому лишайнику

Гриб виділяє лишайникові кислоти, які сприяють розчиненню та утворенню неорганічних поживних речовин із скелі чи іншого матеріалу, необхідних фікобіонту, захищає його від інтенсивного світла, забезпечує водою та мінералами та створює міцну субстратну основу, в якій фікобіонт росте, захищений від стресу навколишнього середовища, що дозволяє лишайникам колонізувати майже всі наземні середовища, включаючи пустелі. Відомо понад 18 000 видів грибів, здатних утворювати асоціації з різними фікобіонтами.

Молекулярно-біологічні дослідження показали, що крім кількох фікобіонтів, лишайники можуть мати більше одного виду грибів, а також бакте-

рії і дріжджі. Метагеномні та метаболомні дослідження виявили інші метаболічні переваги асоціації з бактеріями, включаючи виробництво вітамінів і захист від токсичних сполук.

Консорціум бактерій *«Chlorochromatium aggregatum».* У прісноводних середовищах утворюються мікробні мутуалістичні асоціації, які називаються консорціумами. *Консорціум* утворюється між нерухомими зеленими сірчаними бактеріями (аноксигенними фототрофами, забарвленими або в зелений, або коричневий колір) і деякими рухливими гетеротрофними бактеріями. Ці консорціуми зустрічаються повсюдно в сульфідних прісноводних озерах та можуть складати до 90% присутніх зелених сірчаних бактерій і майже 70% бактеріальної біомаси в цих озерах.

Основа мутуалізму цих консорціумів полягає у фототрофному виробництві органічних речовин зеленою сіркобактерією та рухливістю і споживанням органічної речовини хемотрофними партнерами. Консорціум отримує видову назву, але вона не позначає справжнього виду, оскільки не є єдиним організмом, тому назви беруться в лапки.

Морфологія консорціуму зелених фототрофних сіркобактерій залежить від його видового складу. Зазвичай він складається з 13–69 зелених сірчаних бактерій, які називаються епібіонтами, що прикріплені до центральної, джгутикової гетеротрофної бактерії (рис. 17.4). Відрізнити різні рухливі фототрофні консорціуми можна за морфологією епібіонтів. Так, у «*Chlorochromatium aggregatum*» центральна бактерія оточена паличкоподібними зеленими бактеріями, тоді як у «*Pelochromatium roseum*» епібіонти коричневі.

Консорціум «*Chlorochromatium glebulum*» включає зелені епібіонти, що містять газові везикули. Епібіонти мають 0,5–0,6 мкм в діаметрі. Зелені сірчані бактерії є облігатними анаеробними фототрофами, які утворюють окремий філум. Зелений і коричневий види епібіонтів відрізняються типами бактеріохлорофілу та каротиноїдів.

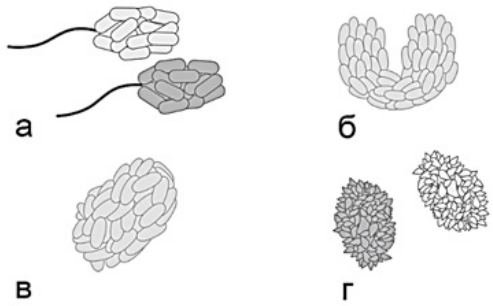


Рис. 17.4. Бактеріальні консорціуми. Зелені епібіонти (на рисунку світліші): (а) «*Chlorochromatium aggregatum*», (б) «*C. glebulum*», (в) «*C. magnum*», (г) «*C. lunatum*». Коричневі епібіонти (на рисунку темніші): (а) «*Pelochromatium roseum*», (г) «*P. selenoides*».

Як зелені, так і коричневі види зустрічаються в стратифікованих озерах, де світло проникає на глибину, на якій вода містить сірководень (H_2S), основний донор електронів для генерації трансмембранного потенціалу протонів та фіксації CO_2 фототрофами. У стратифікованих озерах в постійно мінливих градієнтах світла, кисню та сульфідів рухливі консорціуми швидко переміщуються, щоб постійно залишатися в умовах, найбільш сприятливих для фотосинтезу. Консорціуми демонструють позитивний хемотаксис до світла та сульфіду.

Епібіонт «*Chlorochromatium aggregatum*» виділено та вирощено в чистій культурі (рис. 17.5). Центральна бактерія «*Chlorochromatium aggregatum*» відноситься до класу *Betaproteobacteria*. Для росту їм потрібен α-кетоглутарат, який, ймовірно, забезпечує епібіонт. Крім цього метаболічний зв'язок між епібіонтом і центральною бактерією також включає обмін амінокислотами. Геномний аналіз центральної бактерії одного з консорціумів виявив масову втрату генів, що вказує на те, що цей організм не здатний рости незалежно від зеленої сірчаної бактерії.

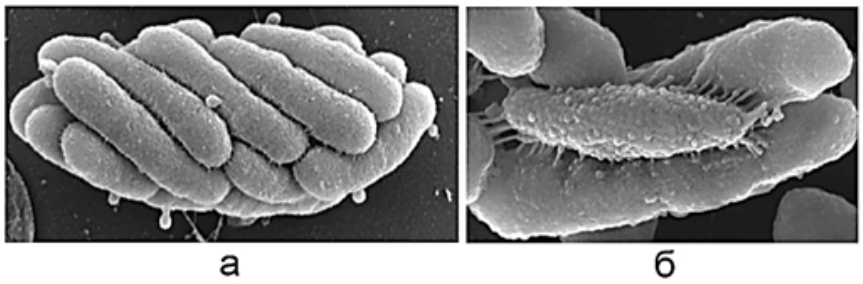


Рис. 17.5. Консорціум «*Chlorochromatium aggregatum*». Скануюча електронна мікрофотографія: (а) Епібіонти *Chlorobium chlorochromatii* щільно скупчені навколо джгутикової центральної бактерії; (б) Центральна бактерія з численними виростами зовнішньої мембрани, що тісно контактують з епібіонтами.

Скануюча електронна мікроскопія консорціуму (рис. 17.5) виявила схожі на фімбрії трубчасті вирости центральної бактерії, які покривають більшу частину поверхні її клітини та, вірогідно, зливаються з клітинами епібіонтів. Ймовірно, ці з'єднання дають можливість фототрофу та хемотрофу обмінюватися поживними речовинами. Той факт, що центральна бактерія не може рости без свого фототрофного партнера, а фототроф може рости автономно, є доказом того, що поживні речовини надходять від фототрофа до хемотрофа, тобто хемотроф залежить від свого фототрофного партнера.

Метанотрофні консорціуми. Метанотрофні консорціуми, які поєднують діяльність двох анаеробних мікроорганізмів, ефективно окиснюють метан до CO_2 у безкисневих морських відкладах.

Давно відомо, що метан активно окиснюється в безкисневих морських відкладах. Молекулярно-екологічні дослідження, показали, що для цього конкретні метаноокиснюючі (метанотрофні) археї утворюють тісні асоціації з бактеріями, які відновлюють сульфат, використовуючи їх як акцептор електронів (рис. 17.6).

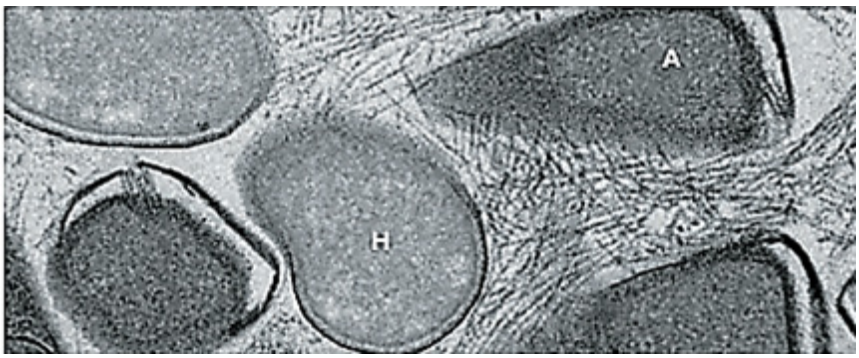


Рис. 17.6. Метанотрофний консорціум з геотермальних осадів: електронна мікрофотографія тонкого зрізу через консорціум, який показує електропровідні «нанодроти» сульфатредукуючих бактерій (Н), що електрично з'єднують їх з метанотрофом АНМЕ (А).

Метанотрофні археї включають три різні групи анаеробних метанокиснючих евріархей (АНМЕ). Члени кластера АНМЕ-1 належать до *Methanomicrobia*, АНМЕ-2 – до *Methanosarcinales*, а АНМЕ-3 – до *Methanococcoides*. Деякі види АНМЕ, що належать до *Methanomicrobia*, можуть повністю окиснювати коротколанцюгові алкани (етан, пропан, бутан). При цьому вони залежать від синтрофних взаємодій із бактеріями, які скидають прийняті від архей електрони на сульфат або інші акцептори.

Різноманітні бактерії, що відновлюють сульфат, включаючи види *Desulfosarcina* та *Desulfococcus* дельтапротеобактерій, а також види родини *Desulfobulbaceae* є синтрофними партнерами. Ці бактерії приймають електрони від метаногенів, які окиснюють вуглеводні, і утилізують їх шляхом відновлення сульфату до сульфіду. Перенесення електронів відбувається між клітинами двох видів за допомогою електропровідних відростків («нанопроводів»), що розташовані в міжклітинному простірі (рис. 17.6).

Прямий міжвидовий перенос електронів є дуже поширеним. Наприклад, бактерії роду *Geobacter* окрім прямого відновлення нерозчинних металів, також можуть утворювати консорціуми з метаногенами. *G. metallireducens* зазвичай використовує ацетат, а утворені при цьому електрони передає метаногенним археям *Methanosaeta harundinacea,* які використовують їх для відновлення CO_2 до метану. У цьому партнерстві *Geobacter* виграє тим, що використовує ацетат як вуглець і джерело енергії, а оскільки абіотичні акцептори електронів відсутні, він використовує мета-

ноген як акцептор електронів. У свою чергу метаноген також має переваги, оскільки замість розщеплення ацетату з утворенням метану він відновлює CO_2 до CH_4, що є енергетично більш вигідною реакцією.

17.3. Взаємодія мікроорганізмів з рослинами

Симбіотичні асоціації між мікроорганізмами і рослинами можуть бути мутуалістичними, або паразитичними. Більшість азотфіксуючих бактеріальних симбіонтів рослин відносяться до видів альфа- та бетапротеобактерій (рис. 17.7). Симбіози мікроорганізмів з рослинами розглянемо на прикладах мутуалізму бульбочкових бактерій роду *Rhizobium* з бобовими рослинами, бактерій роду *Frankia* та грибів з деревними рослинами, а паразитизму – бактерій *Rhizobium radiobacter*, що спричиняє нарости на рослинах (хвороба корончастий гал).

Симбіоз бульбочкових бактерій та бобових рослин. Взаємодія бульбочкових бактерій з бобовими рослинами відноситься до типу ендосимбіозів, за яких клітини мікроорганізмів знаходяться в клітинах та тканинах макроорганізму. Давно відомо, що на коренях бобових рослин утворюються особливі нарости або бульбочкові структури. Використання в аграрному виробництві бульбочкових бактерій через їх здатність фіксувати молекулярний азот економить фермерам великі кошти на придбання добрив.

Більшість азотфіксуючих бактеріальних симбіонтів рослин відносяться до ризобій, від назви основного роду *Rhizobium*, які можуть вільно рости в ґрунті або заражати бобові рослини. Зараження коренів бобових ризобіями призводить до утворення кореневих бульбочок, у яких бактерії перетворюють N_2 на NH_3. Фіксація азоту в кореневих бульбочках становить четверту частину N_2, що щорічно фіксується на Землі.

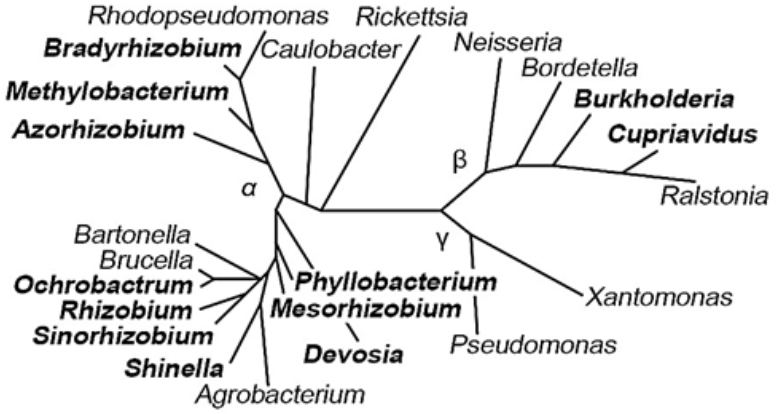


Рис. 17.7. Філогенія ризобіальних бактерій (жирним шрифтом) та споріднених з ними родів

Бульбочкові бактерії відносяться до роду *Rhizobium*. Назва їх виду, зазвичай, містить латинську назву рослини, з якою вони взаємодіють. Наприклад, у *Rhizobium trifolii* рослиною-хазяїном є конюшина, *Rhizobium phaseoli* – квасоля, *Rhizobium leguminosarum* – горох, кормові боби, віка, чина та ін.

Бульбочкові бактерії відносяться до мікроаерофільних мікроорганізмів, здатних розвиватися за низького парціального тиску кисню в середовищі; хемогетеротрофи часто потребують деяких вітамінів – тіаміну, пантотенової кислоти, біотину. При вільному існуванні в грунті використовують, за наявності, зв'язаний азот замість фіксації молекулярного азоту.

Етапи утворення кореневих бульбочок включають:

1. Взаємне розпізнавання партнера як рослиною, так і бактерією;
2. Прикріплення бактерії до кореневого волоска;
3. Секреція бактерією олігосахаридних сигнальних молекул (факторів Nod);
4. Бактеріальна інвазія кореневого волоска;
5. Пересування бактерій до головного кореня по інфекційній нитці;
6. Утворення та поділ модифікованих бактеріальних клітин (бактероїдів) у клітинах рослин, поділ клітин рослини та утворення кореневої бульбочки.

Бактерії мають специфічність щодо бобових рослин: кожен їх вид викликає утворення бульбочок на коренях одного або групи близьких видів бобових (рис. 17.8). В основі специфічності такого симбіозу лежить здатність бобових рослин синтезувати лектини – глікопротеїни, які мають властивість оборотно та вибірково зв'язувати вуглеводи та вуглеводні детермінанти біополімерів без утворення ковалентного зв'язку та зміни їх структури.

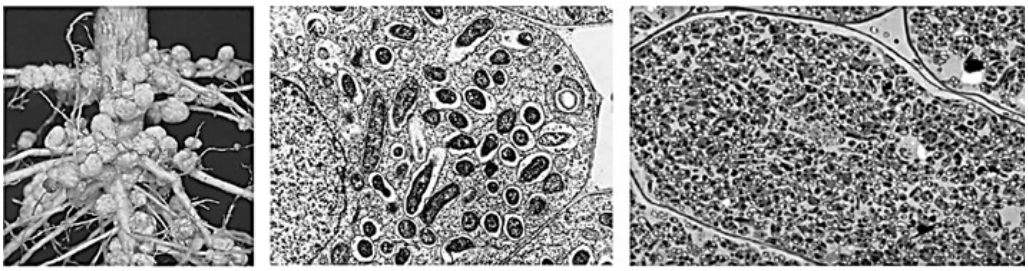


Рис. 17.8. Бульбочки на коренях сої, що утворилися внаслідок інфекції *Bradyrhizobium japonicum* (а); Симбіосоми в рослинній клітині (б); Електронна мікрофотографія бактероїда *Bradyrhizobium japonicum* (в)

Лектини знаходяться на зовнішній поверхні кореневих волосин. До складу зовнішньої мембрани клітинної стінки бульбочкових бактерій вхо-

дить адгезивний білок рікадгезин. Взаємодія поверхневих лектинів кореневої волосини з адгезивним білком мембрани бактерій роду *Rhizobium* визначає процес прикріплення бактерії до рослини та подальше інфікування кореневої волосини (рис. 17.9).

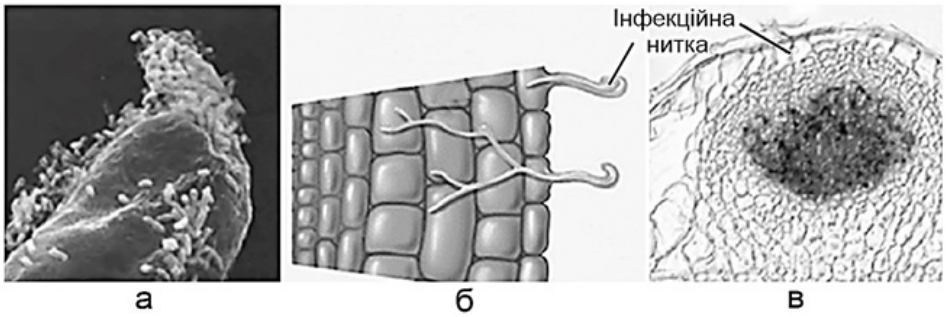


Рис. 17.9. Проникнення бульбочкових бактерій в корінь рослини:
а – скануюча електронна мікрофотографія бактерій *R. leguminosarum bv. viciae*, прикріплених до кореневої волосини садового гороху (*Pisum sativum* L.); б – схема проникнення інфекційної нитки бульбочкових бактерій в корінь рослини; в – світлова мікрофотографія ранньої стадії бульбочки бобової рослини (*Lotus japonicus*), інфікованої ризобіями

У клітинах кореневих волосин бобових синтезуються спеціальні речовини-хемоатрактанти для бактерій – флавоноїди та ізофлавоноїди. Хемоатрактанти індукують експресію бактеріальних *nod*-генів, що відповідають за синтез білків-нодулінів (Nod-факторів), які забезпечують міжвидову взаємодію шляхом утворення бульбочки.

У кореневу волосину проникає відразу кілька клітин бульбочкових бактерій, що супроводжується інвагінацією мембрани кореневої волосини та утворенням інфекційної трубки, вистеленої целюлозою (рис. 17.9). Інфекційна нитка проникає в кору кореня, проходячи прямо через її клітини, а не між ними.

Розвиток власне бульбочки починається, коли інфекційна нитка досягає тетраплоїдної клітини тканини кори. При цьому відбувається активна проліферація (утворення нових клітин) як самої тетрапоїдної клітини, так і сусідніх диплоїдних клітин. Проліферацію індукує індолілоцтова кислота – рослинний гормон, який синтезують бульбочкові бактерії.

Інфекційна нитка розпадається на видовжені клітини неправильної форми – *бактероїди*. Клітини кореня, що оточують бактероїди, інтенсивно діляться, тканини розростаються та утворюють *бульбочки*. Бактероїди швидко розмножуються в клітинах рослин і перетворюються на роздуті, деформовані та розгалужені бактеріальні клітини.

Мікроколонія бактероїдів оточується частинами цитоплазматичної мембрани рослини, утворюючи структуру, яка називається симбіосомою (рис. 17.8 б), і лише після формування симбіосоми починається фіксація

N_2. Наприкінці періоду росту рослини бактерії часто відмирають, а їх речовини поглинає рослина-хазяїн.

У бульбочкових бактерій за фіксацію атмосферного азоту відповідає *nif*-оперон, який локалізований у Sym-плазмідах. У Sym-плазміді також знаходяться *hos*-гени, що зумовлюють впізнання хазяїна, і *nod*-гени, що визначають здатність утворювати бульбочки. Гени *nif*-оперону детермінують синтез нітрогенази – основного ферменту, що бере участь у фіксації молекулярного азоту.

Нітрогеназа бактероїдів демонструє ті самі біохімічні властивості, що й нітрогеназа вільноживучих диазотрофних бактерій, включаючи чутливість до O_2 і здатність відновлювати ацетилен та N_2.

Нітрогеназа дуже чутлива до молекулярного кисню та інактивується ним, тому в бульбочках бобових рослин синтезується залізосірчаний білок *леггемоглобін*, що володіє високою спорідненістю до кисню. Леггемоглобін сприяє перенесенню кисню в симбіосоми, що містять азотфіксуючі бактерії для їх дихання та виконує буферні функції, пов'язуючи надлишковий кисень, який пригнічує каталітичну активність нітрогенази.

Утворення леггемоглобіну – це специфічний результат симбіозу: простетична група (протогем) синтезується бактероїдами, а білковий компонент – рослиною. Завдяки зв'язуванню надлишку кисню леггемоглобіном бактероїди забезпечуються ним у кількості, достатній для росту клітин і енергією, не перешкоджаючи при цьому фіксації азоту. Бульбочки з леггемоглобіном мають рожевий колір і здатні фіксувати молекулярний азот.

Від рослини через мембрану в симбіосому і власне бактероїд транспортуються проміжні продукти циклу трикарбонових кислот, зокрема, органічні кислоти сукцинат, малат і фумарат, які використовуються як донори електронів для виробництва АТФ та для відновлення N_2.

До симбіотичних азотфіксаторів належать також актиноміцети роду *Frankia*. Хазяїнами актиноміцетів-симбіонтів може бути більше 200 видів дводольних деревних рослин, що належать до 8 родин, серед яких вільха (*Alnus*), обліпиха (*Hippophae*), казуарина (*Casuarina*) та ін.

На коренях рослин за симбіозу з актиноміцетами роду *Frankia* утворюються бульбочки, які можуть досягати в діаметрі 5 см (рис. 17.10). Біохімічний механізм фіксації азоту у *Frankia* аналогічний такому у бульбочкових бактерій, проте він економічніший з погляду споживання АТФ. Слід зазначити, що бактерії роду *Frankia* здатні до азотфіксації у вільноживучому стані, тобто без контакту з рослиною.

Прикладом взаємовигідних ендосимбіозів є взаємовідносини азотфіксуючих бактерій родів *Chromatium* та *Klebsiella* з тропічними рослинами *Peretta* та *Psichoteria*. На листі цих рослин в результаті симбіозу з бактеріями утворюються своєрідні бульбочки, в яких здійснюється азотфіксація.

Азотфіксуючі представники зустрічаються також серед ціанобактерій, здатних утворювати симбіози з широким колом рослин, що включає

покритонасінні, голонасінні, папороті, мохи і навіть одноклітинні морські діатомові водорості. Найбільш вивченими є ендосимбіози ціанобактерій *Anabaena azollae* з водною папороттю *Azolla*. Папороть *Azolla* росте на поверхні затоплених рисових полів і може за належної агротехніки повністю задовольняти потреби рису в азоті.

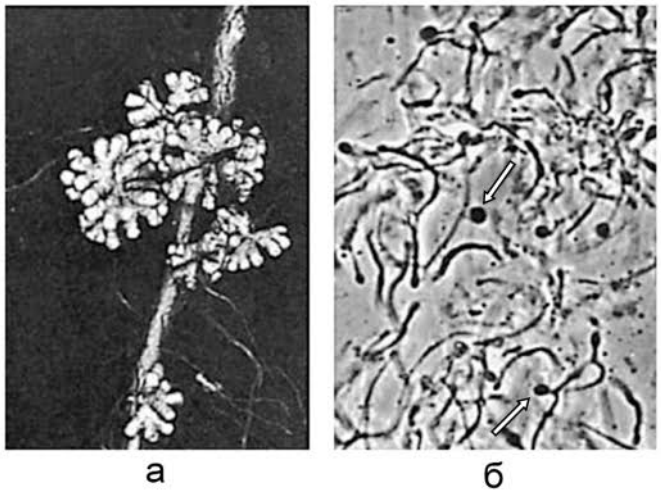


Рис. 17.10. Кореневі бульбочки, утворені бактеріями *Frankia* на вільсі *Alnus glutinosa* (а) та бактерії *Frankia* з бульбочок *Comptonia peregrina*. Стрілками показано везикули на кінчиках ниток гіф

Мікориза. Мікориза – симбіоз між грибами та рослинами, в якому поживні речовини переносяться в обох напрямках. Гриб переносить із ґрунту в рослину неорганічні поживні речовини, зокрема фосфор і азот, а рослина, у свою чергу, передає грибу переважно фотосинтезовані вуглеводи.

Розрізняють два типи мікориз. В ектомікоризі клітини грибів утворюють велику оболонку (грибну мантію) навколо зовнішньої сторони кореня з незначним проникненням у клітини кореня. В ендомікоризі гриб глибоко проникає в клітини тканин кореня.

Ектомікориза зустрічається в основному на коренях дерев, особливо хвойних, буків і дубів. Більшість мікоризних грибів не катаболізують целюлозу та інші полімери листового опаду. Вони отримують вуглець із виділень коренів, а неорганічні мінерали – із ґрунту. Незважаючи на тісний симбіотичний зв'язок між грибом і коренем, один вид дерев може утворювати кілька мікоризних асоціацій.

Перевагу взаємодії рослини з грибом наглядно видно з експерименту штучної інокуляції саджанців сосни грибом, які ростуть набагато швидше, ніж не інокульовані дерева (рис. 17.11). Рослина з мікоризою може ефективніше та з більшої площі поглинати воду та поживні речовини з навколишнього середовища і, таким чином, має конкурентну перевагу.

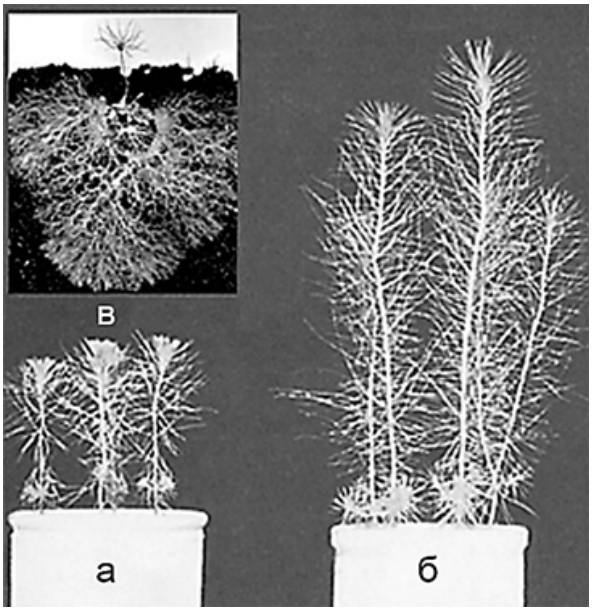


Рис. 17.11. Розсада сосни *Pinus radiata*: *а* – без мікоризи; б – з мікоризою; в – грибковий партнер саджанця сосни

Арбускулярна мікориза або ендомікориза – найбільш поширений тип мікоризи, коли гриб проникає в клітини кореневої системи рослини та формує арбускули – структури, що сприяють обміну поживними речовинами. В арбускулярній (arbuscular – «маленьке дерево») мікоризі (АМ) беруть участь гриби філогенетично окремого відділу *Glomeromycota*, більшість видів яких є облігатними мутуалістами рослин. АМ колонізують 70–90% усіх наземних рослин, у тому числі багато видів сільськогосподарських культур. Вважається, що зв'язок між рослинами та *Glomeromycota* є предковим типом мікоризи, що з'явилась приблизно 450 мільйонів років тому, і стала важливим еволюційним кроком в успішній інвазії земної суші наземними рослинами.

Гриби АМ продукують сигнальні фактори Мус, які ініціюють процес інфекції та формування мікоризного стану. Колонізація коренів грибом починається з проростання спори в ґрунті та утворення розгалуженого міцелію, що розпізнає рослину-хазяїна за допомогою взаємної хімічної сигналізації. Проростання спор і розгалуження міцелію індукуються рослинними гормонами стриголактонами.

Міцелій утворює структуру прикріплення, яка називається гіпоподій, та проникає у внутрішню область кори кореня, в клітини епідермісу та клітини зовнішньої кори, утворюючи дихотомічні розгалужені або згорнуті гіфальні структури – арбускули в клітинах внутрішньої кори рослин (рис. 17.12 а). Арбускулярні гіфи збільшують площу поверхні контакту між

рослиною та грибом. Неорганічний азот і фосфор гриб отримує з ґрунту, перетворює на аргінін і поліфосфат та переміщує їх в рослину.

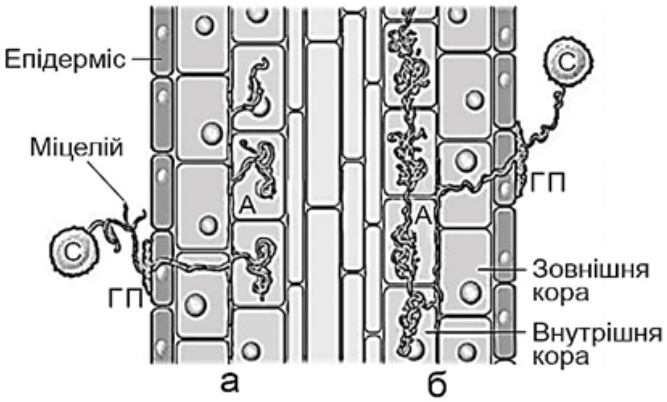


Рис. 17.12. Арбускулярна мікоризна колонізація рослин. А – Арбускули (дихотомічно розгалужені інвагінації, що утворюються шляхом росту міцелію або міжклітинно (а), або внутрішньоклітинно (б); С – спора гриба; ГП – гіпоподіум, утворений міцелієм

Фактори Мус дуже подібні до ризобіальних факторів Nod, і лише відносно незначні модифікації структури хітинового остова визначають їх специфічність. Ймовірно, що базові сигнальні системи, які використовуються в симбіозі бобових рослин і бульбочкових бактерій, що виникли приблизно 60 мільйонів років тому, були спочатку сформовані та еволюціонували в давньому симбіозі АМ грибів і рослин, а потім були адаптовані для симбіозу бобово-кореневої бульбочки.

Агробактерії та корончата хвороба рослин

На відміну від мутуалістичних бактерій роду *Rhizobium* представники цього роду також взаємодіють з рослинами по типу паразитичного симбіозу. Бактерії *Rhizobium radiobacter* (раніше *Agrobacterium tumefaciens*) викликають хворобу корончатого галу (бактеріальний рак), а *Rhizobium rhizogenes* (раніше *Agrobacterium rhizogenes*) – хворобу волосатого кореня.

Крончатий гал – це бактеріальне захворювання стебел і коренів багатьох деревних і трав'янистих рослин (рис. 17.13). Зараження бактеріями *Rhizobium radiobacter* викликає горбкуваті здуття (гали) на стеблах, коренях, стовбурах і гілках.

Клітини *Rhizobium radiobacter* індукують утворення пухлини лише за наявності у них Ті-плазміди (від англ. *tumor inducing* – індукція пухлини). У *Rhizobium rhizogenes* подібна плазміда під назвою Ri плазміда відповідає за індукцію хвороби волосатих коренів.

Бактерії *R. radiobacter* прикріплюються в місці пошкодження рослини за допомогою мікрофібрил, утворюють бактеріальні агрегати та створють

Рис. 17.13. Корончасті гали на молодому ялівці

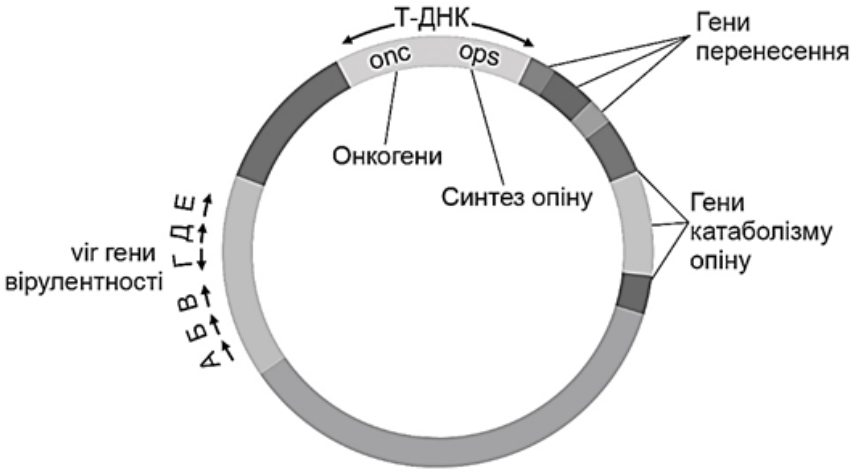


Рис. 17.14. Ті плазміда *Rhizobium radiobacter*

умови для перенесення Ті-плазміди (рис. 17.14) від бактерії до рослини. В клітину рослини переноситься тільки частина Ті-плазміди – трансферна ДНК (Т-ДНК), яка інтегрується в геном рослини. Т-ДНК містить гени, відповідальні за утворення пухлини, а також за синтез ряду модифікованих амінокислот – опінів. Найбільш поширеними з них є октопін і нопалін. Опіни виробляються клітинами рослини, що трансформовані Т-ДНК, та слугують джерелом вуглецю та азоту, а іноді й фосфору для бактерій *R. radiobacter*.

Гени *vir* у Ті-плазміді кодують білки, необхідні для перенесення Т-ДНК. Транскрипція генів *vir* індукується метаболітами, такими як фе-

нольні сполуки ацетосирингон і ферулат, синтезованими пошкодженими тканинами рослини. Гени трансмісивності на Ті-плазміді (рис. 17.14) дозволяють переносити її шляхом кон'югації від однієї бактеріальної клітини до іншої.

Гени *vir* кодують білки, що утворюють систему секреції IV типу для одноланцюгової Т-ДНК і перенесення білка між бактерією та рослиною, і таким чином нагадує бактеріальну кон'югацію. Т-ДНК може переноситись в еукаріотичні клітини грибів, водоростей, протистів і навіть клітинні лінії людини.

Потрапивши в клітину рослини, Т-ДНК інтегрується в її геном. Гени пухлиноутворення (*onc*) на плазміді Ті (рис. 17.14) експресують ферменти для виробництва рослинних гормонів. Експресія цих генів призводить до утворення пухлин і виробництва опіну.

Плазміда Ri, відповідальна за захворювання волосатих коренів, також містить гени *onc*. Однак у цьому випадку гени надають рослинам підвищену реакцію на ауксин, який призводить до перевиробництва тканини кореня, що є симптомом цього захворювання.

З позицій мікробіології та фітопатології хвороба корончатий гал та хвороба волосатих коренів потребують тісної взаємодії, яка призводять до генетичного обміну від бактерії до рослини. Отже, індукція утворення пухлин при цих захворюваннях є результатом природного механізму трансформації рослин. Через це інтерес вивчення системи взаємодії Ті–корончатий гал спрямовано на застосування цього процесу природного генетичного обміну в генетичній інженерії та біотехнології рослин. Створено кілька модифікованих Ті-плазмід, що використовують для отримання генетично модифікованих рослин з генами стійкості до гербіцидів та захисту від комах і посухи.

17.4. Взаємодія мікроорганізмів з комахами

Комахи є самим поширеним класом відомих нині тварин. Вважається, що близько 20% усіх комах підтримують з мікроорганізмами симбіотичні взаємовигідні відносини. Симбіози сприяють екологічному успіху комах, надаючи їм переваги в харчуванні або захисті від паразитів. Деякі симбіонти знаходяться на зовнішніх поверхнях комах або в травному тракті. Ендосимбіонти є внутрішньоклітинними симбіонтами, які зазвичай локалізуються в спеціалізованих органах комах.

Спадкові симбіонти комах передаються від покоління до покоління. Мікробні симбіонти можуть бути придбані хазяїном із навколишнього середовища (горизонтальна передача) або передані безпосередньо від батьків наступному поколінню (спадкова або вертикальна передача). Спосіб передачі симбіонтів пов'язаний зі специфічністю та стійкістю асоціації.

Типи спадкових симбіонтів. Всі відомі спадкові мікробні симбіонти комах не мають вільної життєвої стадії реплікації. Таким чином, вони є об-

лігатними симбіонтами. Хоча цим бактеріям для реплікації потрібен хазяїн, не всі хазяї залежать від симбіонтів. Відносно залежності від хазяїна, спадкові симбіонти є первинними або вторинними. Первинні симбіонти необхідні для розвитку та розмноження хазяїна. Вони обмежені спеціалізованою областю локалізації в організмі хазяїна, що називається бактеріомом. Бактеріальні клітини знаходяться всередині бактеріома в спеціалізованих клітинах – бактеріоцитах.

Вторинні симбіонти не потрібні для репродукції хазяїна. На відміну від первинних симбіонтів, вторинні симбіонти не завжди присутні в кожній особині виду і не обмежені певними тканинами хазяїна. Як і патогени, вони проникають у клітини та можуть жити позаклітинно в гемолімфі комахи.

Однак, щоб зберегтися в хазяїні, вторинний симбіонт повинен надавати певну перевагу, наприклад, забезпечувати харчові потреби або захист від екологічних стресів, таких як тепло. Наприклад, білокрилки, заражені бактерією *Rickettsia*, дають потомство приблизно вдвічі швидше, ніж неінфіковані мухи, і більше потомства доживає до дорослого стану. Вторинні симбіонти також можуть забезпечити захист від вторгнення патогена або хижака. Вид *Spiroplasma*, що вперше був помічений у *Drosophila neotestacea*, забезпечує захист від паразитичних нематод.

У більшості фактів симбіозу комах і бактерій підвищення життєздатності або захисту невідомі, хоча в одному випадку токсин, закодований лізогенним бактеріофагом, що переноситься симбіонтом, захищає комаху від зараження паразитичною осою.

Існують спадкові паразитичні симбіонти, які маніпулюють репродуктивною системою хазяїна, збільшуючи частоту жіночого потомства. Зараження популяції білокрилок рикетсіями – це приклад того, як швидко можуть поширюватися ознаки, притаманні симбіонтам в популяції. Важливе прикладне застосування базового розуміння симбіонтів комах полягає у використанні їх у боротьбі з комахами-шкідниками та контролі трансмісивних хвороб, таких як малярія та філяріатоз у людей.

Наприклад, симбіотичні *Wolbachia*, які є маніпуляторами розмноження, широко поширені серед видів комах (можливо, інфікуючи до 60–70% усіх видів комах). Сперма самців, інфікованих *Wolbachia*, може стерилізувати неінфікованих самок.

Облігатні внутрішньоклітинні симбіонти комах. Бактерії симбіонти дозволяють багатьом комахам використовувати харчові ресурси, що багаті одними поживними речовинами, але бідні іншими. Щоб отримати належне харчування, деякі комахи використовують метаболічний потенціал своїх мікроорганізмів-симбіонтів.

Прикладом такої взаємодії є попелиця *Acyrthosiphon pisum* та її внутрішньоклітинний партнер гамапротеобактерія *Buchnera aphidicola* (рис.

17.15), яка використовується як модельна система для вивчення мутуалістичних симбіозів. Бактерії *B. aphidicola* забезпечують свого хазяїна незамінними амінокислотами, відсутніми в соку рослин, яким живиться попелиця.

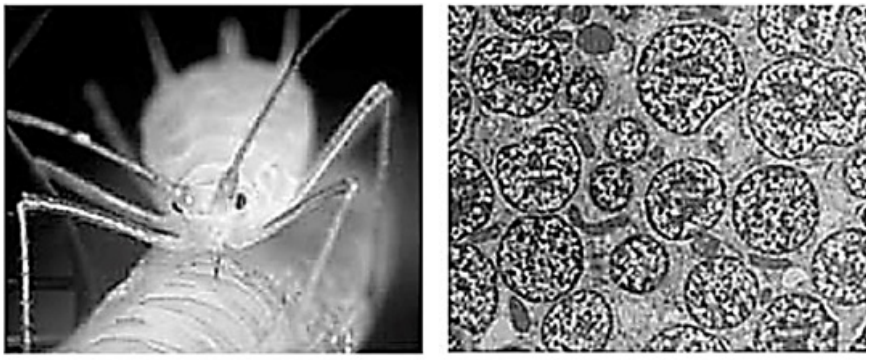


Рис. 17.15. Попелиця (а) і бактерії *Buchnera aphidicola* в бактеріоцитах (б)

Молекулярні дослідження показали, що більшість представників родин попелиць живе з бактеріями *Buchnera,* що локалізовані в їх бактеріоцитах. Зріла попелиця містить мільйони цих бактерій. В порівнянні з інфікованими контрольні попелиці, вільні від симбіонтів, вимагають раціону, що містить усі амінокислоти, які або відсутні, або є рідкісними в соку флоеми. Попелиця *Acyrthosiphon pisum* та її внуотішньоклітинний симбіонт *B. aphidicola* здійснюють біосинтез кількох амінокислот в кооперації, тобто, певні етапи відбуваються в різних організмах. Отже, ці партнери є облігатними мутуалістичними симбіонтами. Вважається, що ендосимбіонт попелиці з'явився близько 150 мільйонів років тому. В процесі спільної еволюції бактерії *B. aphidicola* втратили біля 75% генів, тому їх геноми розміром лише близько 0,65 Мб.

Мурахи, які вирощують гриби, є ще одним прикладом складного симбіозу, який утворився між комахою і численними мікроорганізмами. Борошнисті червеці (*Planococcus citri*) є одними з найбільш незвичайних прикладів партнерства між двома симбіонтами, які заражають ту саму комаху. Борошнистий червець має двох стабільних бактеріальних симбіонтів, *Tremblaya princeps* (бетапротеобактерія) і *Moranella endobia*» (гамапротеобактерія). Ці симбіонти співпрацюють у забезпеченні свого хазяїна незамінними амінокислотами, відсутніми в його раціоні. Однак *Moranella* насправді живе в *Tremblaya*, це єдиний відомий приклад симбіозу бактерії всередині бактерії.

Захисний симбіоз. На додаток до симбіозів, які забезпечують поживні переваги, симбіоз між комахами та мікробами забезпечує комах оборон-

ною зброєю. Широко поширена захисна стратегія, яку використовують комахи для відлякування хвороботворних мікроорганізмів і хижаків, відбувається шляхом виробництва токсичних і антимікробних хімічних речовин. Хімічний репелент (відлякувач) у багатьох випадках є продуктом мікроорганізмів, симбіотично пов'язаних з комахою.

Приклад такої оборонної стратегії є жук *Paederus* (жук-синєкрил), який відлякує хижаків, використовуючи хімічну речовину педерин (рис. 17.16), синтезовану ендосимбіотичними бактеріями роду *Pseudomonas*. Ця цитотоксична речовина (пригнічує мітоз у еукаріотів) накопичується в гемолімфі комах і відкладається в їх яйцях, ефективно стримуючи поїдання їх членистоногими. Жук більш відомий у тропіках тим, що викликає тяжкі дерматити та утворення пухирів на шкірі людини, якщо комаха буде розчавлена людиною і педерин-вмісна гемолімфа попаде на шкіру.

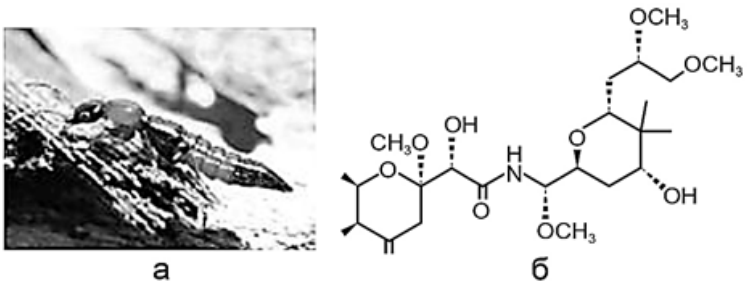


Рис. 17.16. Жук-синєкрил (а), молекула педерину (б)

Відомо багато захисних симбіозів, які захищають комах від хижацтва, паразитизму та мікробних збудників. Захисні хімічні речовини виробляються різноманітними бактеріальними симбіонтами, включаючи представників філумів *Proteobacteria, Firmicutes* і *Actinobacteria*. Деякі є внутрішньоклітинними, інші знаходяться в кишківнику, ще інші пов'язані зі спеціалізованими анатомічними структурами екзоскелету комах.

Порівняльний метагеномний аналіз симбіонтів показав, що гени, відповідальні за синтез обороних хімічних речовин, зазвичай знаходяться в плазмідах та інших мобільних генетичних елементах, так що навіть близькоспоріднені симбіонти можуть виробляти дуже різні захисні хімічні речовини. Специфічна асоціація між комахами та захисними симбіонтами підтримується різноманітними механізмами передачі, включаючи суворо вертикальне успадкування від матері по зародковій лінії та горизонтальне отримання з навколишнього середовища в кожному поколінні.

Терміти. Мікробні симбіонти термітів розкладають більшу частину целюлози та геміцелюлози в рослинному матеріалі, який вони споживають. На відміну від спадкових симбіонтів комах, більшість термітів містять симбіотичні бактерії в органах травлення. Харчування термітів включає

лігноцелюлозні рослинні матеріали та органічні речовини ґрунту. Найбільше терміти поширені в тропічних і субтропічних регіонах, де вони можуть становити до 95% біомаси ґрунтових комах.

Задній відділ кишкового тракту вищих термітів (родина *Termitidae*) містить щільне та різноманітне співтовариство переважно анаеробних бактерій, включаючи целюлозолітичні види. Навпаки, нижчі терміти дають притулок різноманітним популяціям як анаеробних бактерій, так і целюлолітичним протистам. Бактерії нижчих термітів майже не беруть участь в травленні клітковини. Під час мікробної ферментації вуглеводів у задній кишці утворюються ацетат та інші органічні кислоти, які є первинним джерелом вуглецю та енергії для термітів (рис. 17.16).

Мікробні спільноти кишківника суттєво відрізняються у термітів різних родів. Аналіз послідовностей генів 16S рРНК мікроорганізмів вмісту задньої кишки двох родів вищих термітів (*Nasutitermes* і *Microcerotermes*) і одного роду нижчих термітів (*Reticulitermes*) виявили високу видову різноманітність з 12 філумів бактерій та декількох видів архей (рис. 17.17).

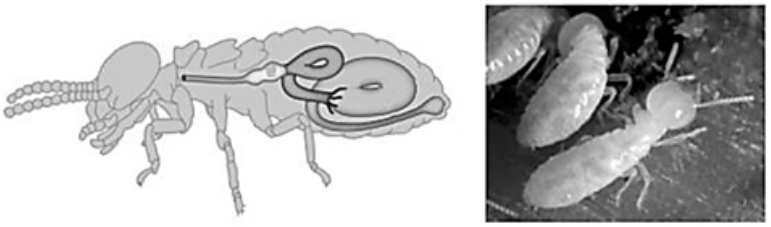


Рис. 17.17. Анатомія кишківника термітів

Метагеномний аналіз мікробної спільноти задньої кишки терміта *Nasuti termes* виявив бактеріальні гени глікозилгідролази, що гідролізують целюлозу та геміцелюлозу. Ці метагеномні дані чітко вказують на причетність спірохет і фібробактерій до перетравлення лігноцелюлози, хоча відповідні целюлозолітичні бактерії ще не були виділені з вищих термітів.

Чисельність *Bacteroidetes* значно відрізняється між різними видами вищих термітів, залежно від їхніх харчових уподобань. Зокрема, *Bacteroidetes* багато у вищих термітів, які перетравлюють деревину за допомогою базидіоміцетного гриба, що розкладає лігнін (*Termitomyces spp*.). Ці терміти культивують гриби, які живляться лігноцелюлозним рослинним опадом. Бактерії філуму *Bacteroidetes* у цих термітів кодують багато глікозилгідролаз, що допомагають у розщепленні матеріалу клітинної стінки рослин і грибів.

Стабільна горизонтальна передача кишкових симбіонтів, ймовірно, відбувається як результат соціальної поведінки та тісного контакту, характерного для термітів.

Багато симбіонтів термітів містять гени, які кодують фермент нітрогеназу, необхідний для фіксації N_2. В ацетогенних спірохет задньої кишки *Nasutitermes* широко присутні гени, що кодують ферменти ацетил-КоА шляху відновлення CO_2 до CH_4. Вважається, що терміти та симбіонтні мікроорганізми кишківника в результаті їх діяльності роблять помітний внесок у зростання парникових газів в атмосфері. За своєю загальною біомасою термітів можна порівняти з загальною біомасою наземних хребетних тварин.

Кишкова мікробіота бджіл. Роль бджіл (*Apis mellifera*) у запиленні рослин просто величезна – це їх головна робота в природі. Вони благотворно впливають на життєстійкість рослин і підвищують їх врожайність. В останні роки в усьому світі спостерігаються суттєві втрати колоній медоносних бджіл. Мікроорганізми спричинюють інфекційні хвороби бджіл: риккетсіоз, європейський гнилець, паратиф, септицемія, меланоз, аскосфероз, аспергільоз.

Бджола збирає нектар, яким харчується її потомство. Занепад популяції бджіл звернув увагу мікробіологів на важливість мікробіому кишківника бджіл для боротьби з патогенними мікроорганізмами і стресовими факторами навколишнього середовища.

Мікробні кишкові спільноти медоносних бджіл (рис. 17.18) дуже прості. Основна спільнота дорослих робочих бджіл складається лише з п’яти домінуючих культивованих видів бактерій.

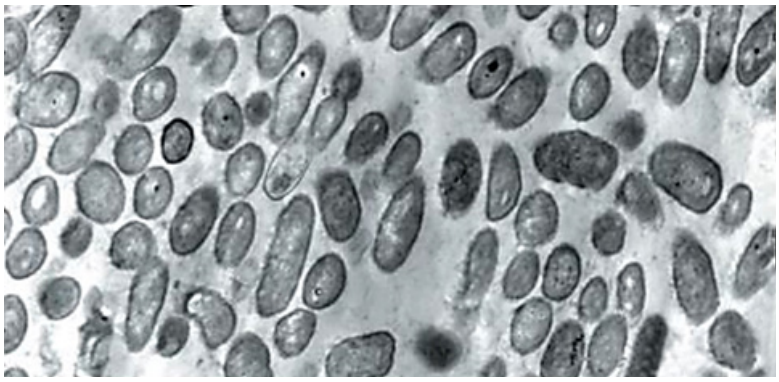


Рис. 17.18. Сканувальна електронна мікрофотографія мікробної спільноти середньої кишки медоносної бджоли

До них відносяться дві грамнегативні протеобактерії (*Snodgrassella alvi* і *Gilliamella apicola*), два види *Lactobacillus* і вид *Bifidobacterium S. alvi і G. apicola* заповнюють просвіт медоносної бджоли кишки. Іноді зустрічаються до чотирьох інших видів бактерій.

Між мікроорганізмами та бджолами існує метаболічна взаємозалежність. Так, бактерії *S. alvi* окиснюють продукти бродіння *G. apicola,*

а *G. apicola* має гени для розкладання пектину, полісахариду з клітинної стінки пилкових зерен. Оскільки самі бджоли не виробляють пектиназу, а пилок є ключовим компонентом їх раціону, то мікробіота кишківника бджіл необхідна для утилізації цього важливого джерела харчування.

Деякі мікроорганізми бджолиної кишки також несуть гени для використання незвичайних цукрів, таких як арабіноза та рафіноза, які є неперетравлюваними та потенційно токсичними для бджіл. Цей точно налаштований мікробіом виконує захисну роль у комах, оскільки пригнічує інвазивні мікроорганізми шляхом прямої конкуренції за територію та ресурси, а також шляхом стимулювання комах виробляти антимікробні пептиди проти патогенних бактерій.

17.5. Біолюмінесцентні симбіонти

Деякі бактерії можуть випромінювати світло, і ця здатність була використана деякими морськими безхребетними та рибами. Відомо кілька видів гамапротеобактерій з родів *Vibrio, Aliivibrio, Photobacterium, Shewanella* та *Photorhabdus*, що можуть випромінювати світло. Цей процес називається біолюмінесценцією.

Більшість біолюмінесцентних бактерій населяють морське середовище, а деякі види колонізують спеціалізовані світні органи певних морських риб і кальмарів, які вони використовують для подачі сигналів, уникнення хижаків і приваблювання здобичі (рис. 17.19 а). При симбіотичному проживанні в світних органах риб і кальмарів, або сапрофітно, наприклад, на шкірі мертвої риби або паразитуючи в тілі ракоподібних, біолюмінесцентні бактерії можна розпізнати за світлом, яке вони виробляють.

Хоча ізоляти *Photobacterium, Aliivibrio* та *Vibrio* є факультативними аеробами, вони біолюмінесцеюють лише за наявності O_2. Люмінесценція детермінується генами *luxCDABE* і каталізується ферментом люциферазою,

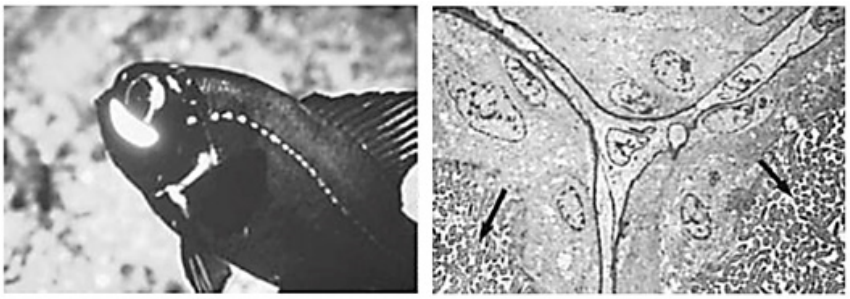


Рис. 17.19. Біолюмінесцентні бактерії-симбіонти світних органів риби-ліхтарика. (а) Риба-ліхтарик *Photoblepharon palpebratus* з світним органом, що містить біолюмінесцентні бактерії. (б) Електронна мікрофотографія біолюмінесцентних бактерій в тканинах світного органу *P. palpebratus* (стрілки)

який використовує O_2, довголанцюговий аліфатичний альдегід (RCHO), такий як тетрадеканол, і відновлений флавінмононуклеотид ($ФМНН_2$) як субстрати:

$$ФМН{\cdot}H_2 + O_2 + RCHO \xrightarrow{\text{Люцифераза}} ФМН + RCOOH + H_2O + \text{світло}$$

Система генерування світла є метаболічним процесом для шунтування електронів від $ФМН{\cdot}H_2$ до O_2 безпосередньо без використання інших носіїв електронів, таких як хінони та цитохроми. Люмінесценція у багатьох світних бактерій виникає лише при високій щільності популяції (рис. 17.19 б). Фермент люцифераза та інші білки системи люмінесценції бактерій чутливі до щільності популяції та реагують індукцією транскрипції генів *luxCDABE*, що контролюється регуляторним білком LuxR і молекулою індуктора ацилгомосерин лактону (АГЛ). Під час росту клітини виробляють АГЛ, який може швидко проходити крізь цитоплазматичну мембрану в будь-якому напрямку, дифундуючи в інші клітини. В умовах, коли досягається висока локальна щільність популяції симбіотичних клітин, як в умовах штучного культивування, так і в світному органі риби чи кальмара накопичується АГЛ. Тільки коли речовина досягає певної концентрації в клітині, АГЛ зв'язується з LuxR, утворюючи комплекс, який активує транскрипцію *luxCDABE*, і клітини починають світитися.

Це приклад механізму регуляції генів, який називається quorum sensing (відчуття кворуму), оскільки це явище залежить від щільності популяції. Стратегія індукції люмінесценції гарантує, що люмінесценція розвивається лише тоді, коли щільність популяції достатньо висока, щоб вироблене світло було видимим для інших тварин. Цей спосіб регуляції виявлено у багатьох бактерій. Він контролює виробництво позаклітинних ферментів і експресію факторів вірулентності, для яких висока щільність популяції потрібна, щоб проявити сукупний біологічний ефект.

Симбіоз Кальмар–*Aliivibrio*. Гавайський короткохвостий кальмар *Euprymna scolopes* є невеликим (приблизно 4 см) морським безхребетним (рис. 17.20 а), який містить велику популяцію біолюмінесцентної бактерії *Aliivibrio fischeri* (рис. 17.20 б) у світному органі, розташованому на його черевній стороні. Кальмар і бактерія є мутуалістичними партнерами. Світний орган гавайського короткохвостого кальмара є модельною системою для вивчення таких симбіозів.

Бактерії випромінюють світло, яке нагадує місячне світло, що проникає в морську воду. Ймовірно, це маскує кальмара від хижаків, що атакують знизу. Відомо декілька видів кальмарів, які також мають світні симбіонти.

Симбіонтна система *E. scolopes* - *A. fischeri* – це важлива і добре вивчена модель бактеріально-тваринних симбіозів. У симбіозі з кальмаром перебуває лише один вид бактерій на відміну від великої кількості видів у симбіозах термітів або товстого кишечника ссавців. Крім того, цей симбіоз

Рис. 17.20. Симбіоз кальмара та бактерій *Aliivibrio fischeri*: (а) Гавайський короткохвостий кальмар *Euprymna scolopes*. (б) Трансмісійна електронна мікрофотографія біолюмінесцентних бактерій *Aliivibrio fischeri* в тканині світного органу *E. scolopes*.

не є обов'язковим; і кальмар, і його бактеріальний партнер можуть виживати окремо один від одного в лабораторії, що дозволяє вирощувати молодих кальмарів, а потім експериментально колонізувати їх.

Молоді кальмари, щойно вилупилися з яєць, не містять клітин *A. fischeri*. Таким чином, передача бактеріальних клітин молоді кальмарів є горизонтальною, а не вертикальною (від батьків до нащадків) подією. Майже одразу після того, як молоді особини виходять з яєць, клітини *A. fischeri* в навколишній морській воді починають колонізувати їх, проникаючи через війкові протоки, які закінчуються незрілим світловим органом. Дивно, але світловий орган колонізується саме *A. fischeri*, а не бактеріями будь-якого іншого виду, присутніми у морській воді.

При контакті з пептидогліканом війкова поверхня незрілого світного органу молодого кальмара виділяє кислий слиз, який затримує грамнегативні, але не грампозитивні бактерії. Адгезовані клітини реагують хемотаксично на градієнт специфічних цукрів, що вивільнюються з колонізаційних пор кальмара, мігруючи вгору за цим хімічним градієнтом до крипти світного органу. Тільки одна клітина симбіонта входить і росте в кожній кріпті світного органу, утворюючи щільну популяцію (рис. 17.20 б). Кожен світний орган у зрілого *E. scolopes* містить від 10^8 до 10^9 клітин *A. fischeri*.

Колонізації *A. fischeri* сприяє оксид азоту (NO), вироблений кальмаром і включений у слиз світного органу. Оксид азоту є сильним окиснювачем і спричиняє достатнє окиснювальне пошкодження, щоб вбити бактеріальні клітини. Бактерії *A. fischeri* можуть витримувати дію NO завдяки активності NO-інактивуючих ферментів, що надає їм переваги в колонізації перед іншими бактеріями.

Щоранку кальмари майже повністю вивільняють усіх бактерій із світного органу та починають вирощувати нову популяцію. Уже в другій половині дня світний орган відновлює щільну популяцію клітин *A. fischeri*, необхідних для виробництва видимого світла.

Вважається, що цей щоденний вигін бактеріальних клітин є механізмом засівання середовища клітинами бактеріальних симбіонтів, що збільшує шанси того, що наступне покоління молодих кальмарів буде колонізовано, а симбіоз збережеться.

A. fischeri явно виграє від симбіозу з кальмарами, оскільки в світному органі бактерія росте набагато швидше, ніж у воді океану, завдяки тому, що вона забезпечується поживними речовинами від кальмара та знаходиться в захищеному середовищі, де може уникнути хижаків, а кальмар використовує бактерії для подачі сигналів, уникнення хижаків і приваблювання здобичі.

17.6. Симбіози хемолітотрофних бактерій в екосистемах гідротермальних джерел

У глибинах океанів біля підводних гарячих джерел рифтових зон існують хемотрофні екосистеми з різноманітними спільнотами безхребетних та їхніх мікробних симбіонтів.

Рідини з гідротермальних джерел містять велику кількість відновлених неорганічних сполук (H_2S, Mn^{2+}, NH_4^+, H_2, CO), що використовують хемолітотрофні бактерії та археї як донори електронів, а кисень – як кінцевий акцептор електронів, фіксують CO_2 і синтезують органічні речовини. Формуючи симбіотичні асоціації з безхребетними, хемолітотрофні мікроорганізми забезпечують їм існування за повної відсутності світла.

Тварини (трубчасті черви, гігантські молюски, мідії, креветки, краби та інші), пов'язані з гідротермальними джерелами, або харчуються безпосередньо клітинами вільноживучих хемолітотрофів, або утворюють з ними тісні асоціації. Мутуалістичні хемолітотрофи або щільно прикріплені до поверхні тварин, або мешкають у тканинах тварин, постачаючи їм органічні сполуки в обмін на безпечне місце проживання та легкий доступ до донорів електронів, необхідних для їх енергетичного метаболізму.

Наприклад, трубчасті черви *Riftia spp.,* (рис. 17.21 а, б) не мають рота та кишківника, але містять губчастий орган, що називається трофосомою. Трофосома становить половину ваги червa, запакована спеціалізованими клітинами бактеріоцитами, які містять гамапротеобактерії *Candidatus Endoriftia persephone*, що окиснюють відновлені сполуки сірки (рис. 17.21 в). Ці хемолітотрофні ендосимбіонтні бактерії досягають щільності до 10^{11} кл/гр тканини.

Червоне перо трубочника (рис. 17.21 б), насичене кровеносними судинами, використовується для поглинання та транспортування неорганічних субстратів до бактеріальних симбіонтів. Трубчасті черви *Riftia spp.* мають унікальний гемоглобін, який забезпечує ендосимбіонтів відновленою сіркою та киснем. Сірководень (H_2S) і O_2 забираються з морської води гемоглобіном червів і доставляються до трофосоми. CO_2 переноситься до

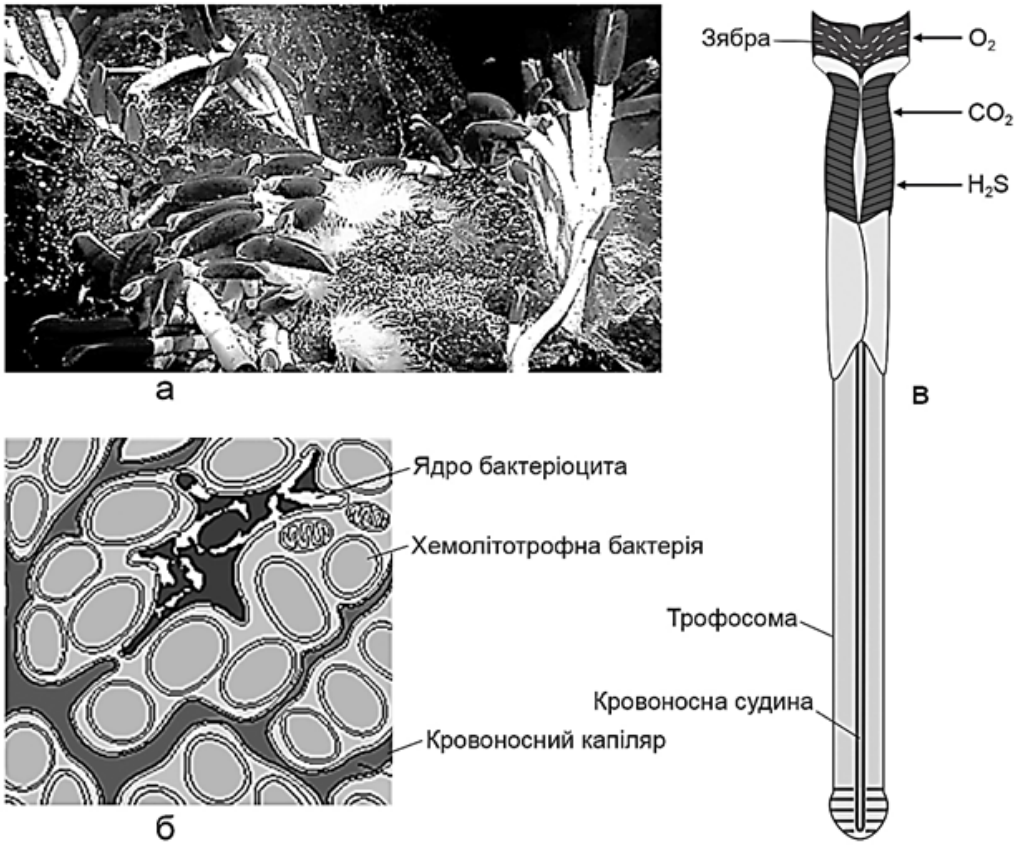


Рис. 17.21. Симбіоз хемолітотрофних сіркоокиснюючих бактерій з трубчатими червами *Riftia spp.* (тип *Annelida*). (а) Фото колонії трубчастих червів; (б) Розташування хемолітотрофних сіркоокиснюючих бактерій в трофосомі; (в) Схема будови тіла *Riftia spp.*

ендосимбіонтів гемоглобіном, а також вивільнюється при декарбоксилюванні органічних кислот, таких як малат і сукцинат.

Бактерії з трофосом, виявляють активність ферментів циклу Кальвіна та зворотного циклу трикарбонових кислот, що відповідають за фіксацію CO_2 та ферментів і переносників електронів, необхідних для отримання енергії з відновлених сполук сірки. Таким чином, трубочник живиться органічними сполуками, які утворюються з CO_2 хемолітотрофними мікроорганізмами.

Крім трубчастих червів поблизу гідротермальних джерел поширені гігантські молюски та мідії, в зябрових тканинах яких також знайдено сіркоокиснювальні бактеріальні симбіонти. Філогенетичний аналіз показав, що кожна тварина містить один або кілька різних штамів бактеріального симбіонта.

Інші морські безхребетні, які живуть біля холодних просочувань природного газу (сипи) на відносно невеликих глибинах також мають коеволюційний бактеріальний симбіоз (табл. 17.1). Наприклад, гігантські молюски мають метанотрофні мікробні симбіонти, які споживають CH_4 і забезпечують їх живлення. Хоча метанотрофи не є автотрофами (CH_4 є органічною сполукою), вони використовують метан як донор електронів і джерело вуглецю та постачають молюскам органічний вуглець.

Таблиця 17.1

Симбіоз хемолітотрофних та метанотрофних ендосимбіонтів з морськими тваринами

Хазяїн (рід або порядок)	Загальна назва	Середовище існування	Метаболічний тип симбіонта
Demospongiae	Губка	Сипи	Метанотрофи
Catenulida	Плоский черв	Мілководдя	Сіркові хемолітотрофии
Monhysterida	Безрота нематода	Мілководдя	Сіркові хемолітотрофи
Solemya, Lucina	Молюск	Гідротермальні венти, сипи, мілководдя	Сіркові хемолітотрофи
Calyptogena	Молюск	Гідротермальні венти, сипи	Сіркові хемолітотрофи
Bathymodiolus	Мідія	Гідротермальні венти, сипи	Сіркові і H_2 хемолітотрофи, метанотрофи
Alviniconcha	Молюск	Гідротермальні венти	Сіркові хемолітотрофи
Riftia	Трубчастий черв	Гідротермальні венти, сипи	Сіркові хемолітотрофи

Мідія *Bathymodiolus puteoserpentis* живе в подвійному симбіозі з метаноокиснюючими та сіркоокиснюючими бактеріями, що локалізовані в зябровій тканині. Сіркоокиснюючий симбіонт також має здатність використовувати H_2 як донор електронів, що робить цю мідію однією з найбільш метаболічно різноманітних представників фауни хемотрофної екосистеми.

Як і облігатні симбіонти комах, більшість симбіонтів морських безхребетних мають малі геноми, що свідчить про облігатну асоціацію з їх хазяїном.

17.7. Фототрофні симбіози з тваринами

Деякі тварини встановили мутуалістичні асоціації з водоростями або ціанобактеріями (табл. 17.2). Тварини в більшості цих асоціацій належать до типів, які демонструють дуже просту будову тіла, наприклад, *Porifera* (губки) і *Cnidaria* (корали, актинії та гідроїди).

Таблиця 17.2

Симбіози між фототрофними мікроорганізмами та морськими тваринами

Хазяїн	Загальна назва	Симбіонт
Porifera	Губки	*Cyanobacteria, Chlorella*, *Symbiodinium*
Cnidaria	Корали, актинії	*Symbiodinium, Chlorella*
Platyhelminthes	Плоскі черви	Діатомові, примітивні хлорофіти
Mollusca	Молюски	*Symbiodinium, Chlorella*
Ascidia	Асцидії	*Cyanobacteria*

Відомо лише кілька прикладів симбіотичних асоціацій з більш організованими тваринами, такими як плоскі черви (*Platyhelminthes*), їстівні молюски (*Mollusca*) та асцидії (*Urochordata*). Найбільш поширеними симбіонтами є зелені водорості *Chlorella* (асоціюється з губками та прісноводними гідрами), ціанобактерії (асоціюються з морськими губками) і види роду динофлагелятів *Symbiodinium* (асоціюються з кам'янистими коралами).

Симбіоз оленерогого коралу. Оленерогий корал є представником мутуалізму між кам'янистими коралами та динофлагелятами *Symbiodinium*. Кам'янисті корали є одними з найбільш видовищних та екологічно значущих асоціацій тварин і фототрофних мікроорганізмів. Кожен корал являє собою колонію генетично ідентичних поліпів (рис. 17.22 а), які будують структуру з карбонату кальцію. Симбіонт *Symbiodinium* розподілений по всій кораловій тканині (рис. 17.22 б) та разом вони утворюють трофічну і структурну основу екосистеми коралових рифів.

Кам'янисті корали мають просту будову тіла, що складається з ектодерми та гастродерми (рис. 17.23 а) і динофлагелят, розташованих внутрішньоклітинно в мембранозв'язаних везикулах, які називаються симбіосомами, всередині клітин гастродермального шару тканини (рис. 17.23 б, в). Скелет корала є ефективною структурою, що значно покращує збирання світла клітинами *Symbiodinium* для підтримки симбіозу.

Корали, що будують рифи, випускають гамети в морську воду. Личинка поселяється на поверхні, де започатковує нову колонію коралів. Сим-

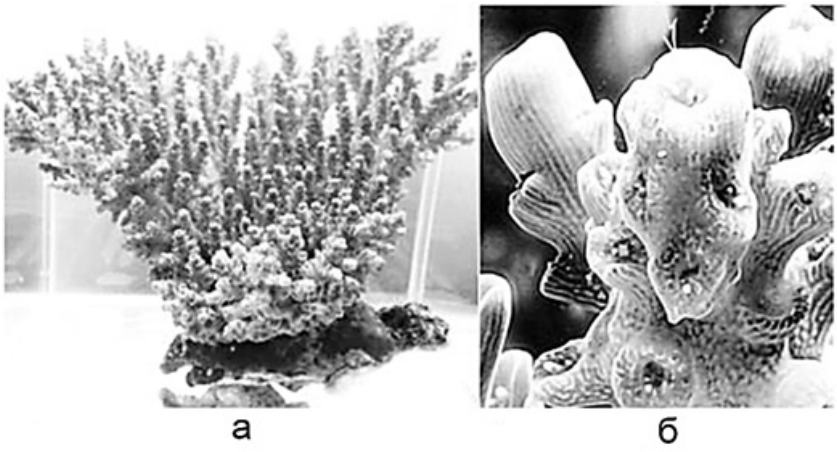


Рис. 17.22. Оленерогий корал. (а) Розгалужена колонія рифоутворюючих коралів; (б) Коралова гілка з фотосинтезуючими симбіонтами, що живуть у тканині корала

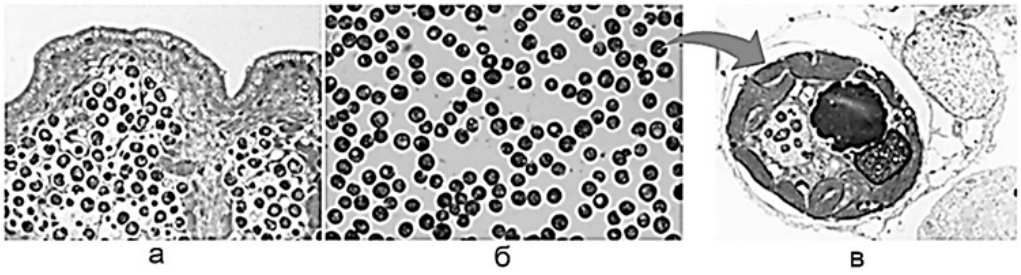


Рис. 17.23. *Symbiodinium* симбіонти морських безхребетних. (а) Мікрофотографія тонкого зрізу тканини мантії гігантського молюска; (б) Клітини *Symbiodinium* м'якого корала; (в) Трансмісійна електронна мікрофотографія клітини *Symbiodinium* всередині вакуолі клітини кам'янистого корала *Ctenactis echinata*

біонти водоростей можуть бути присутніми в яйцеклітинах до їх виходу від батьків, або придбані з навколишнього середовища молодими коралами. Корал, що розвивається, поглинає динофлагеляти та перетравлює їх, крім клітин специфічного штаму *Symbiodinium,* з яким у цих коралів уже встановлено мутуалістичні зв'язки. Після встановлення асоціації корал контролює ріст *Symbiodinium* за допомогою хімічних сигналів.

Обидва партнери в симбіозі розвинули пристосування для обміну поживними речовинами. Динофлагеляти віддають більшу частину свого фотосинтетично фіксованого вуглецю (цукри, гліцерин і амінокислоти) коралу в обмін на неорганічний азот, фосфор і неорганічний вуглець від хазяїна. Цей мутуалізм дозволив кораловим рифам процвітати на великих просторах бідних поживними речовинами океанських вод. У зв'язку зі змі-

нами клімату з'явилась проблема знебарвлення коралів через втрату фототрофного симбіонта, викликану втратою цих пігментованих симбіонтів, що оголює білий вапняковой скелет.

17.8. Симбіоз мікроорганізмів з жуйними тваринами

Жуйні тварини в процесі еволюції сформували симбіотичні асоціації з мікроорганізмами, які дозволили їм жити на рослинній дієті, багатій на вуглеводи, але бідній білками. Ссавці різних еволюційних ліній незалежно розвинули травоїдний спосіб життя (рис. 17.24) приблизно 60 мільйонів років тому. У більшості видів ссавців з'явилися кишкові структури, які сприяють мутуалістичним асоціаціям з мікроорганізмами.

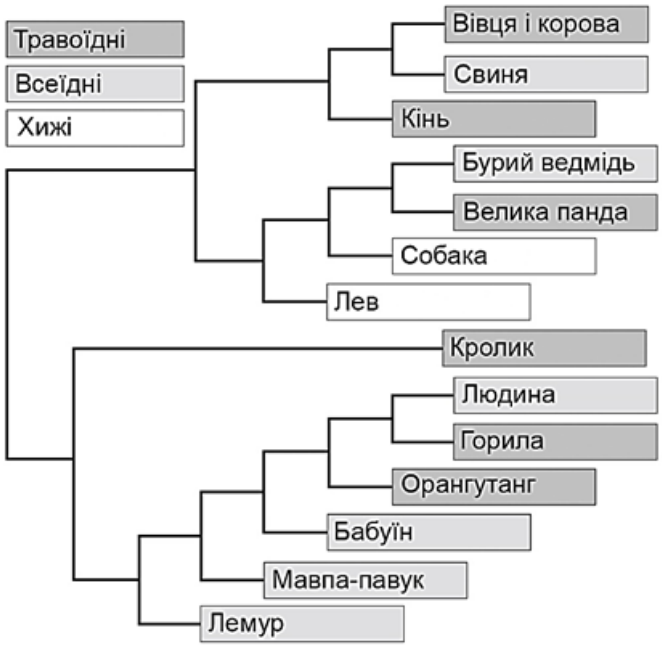


Рис. 17.24. Філогенетичне дерево походження травоїдних ссавці

У травоїдних ссавців розвинулись два типи травлення – передня і задня кишки. У травоїдних з передньою кишкою мікробна ферментаційна камера розташована перед тонкою кишкою. Ця архітектура кишечника виникла у мавп-колобінів, лінивців і сумчастих макроподів незалежно від жуйних тварин, таких як велика рогата худоба та вівці (рис. 17.25). У них спожиті поживні речовини розщеплює мікробіота кишечника, перш ніж досягти шлунка та тонкого кишківника.

Коні та кролики є травоїдними ссавцями, але з ферментаційною камерою в задній кишці. Вони мають лише шлунок і використовують сліпу кишку, як ферментаційну камеру, розташовану між тонким і товстим киш-

ковиком (рис. 17.25). Тому ссавці, такі як кролики, які в основному покладаються на мікробне розщеплення рослинної клітковини в сліпій кишці, називаються ферментаторами сліпої кишки. Сліпа кишка містить мікроорганізми, які гідролізують целюлозу. В інших ферментаторів задньої кишки як сліпа, так і товста кишки є основними місцями мікробного розщеплення клітковини.

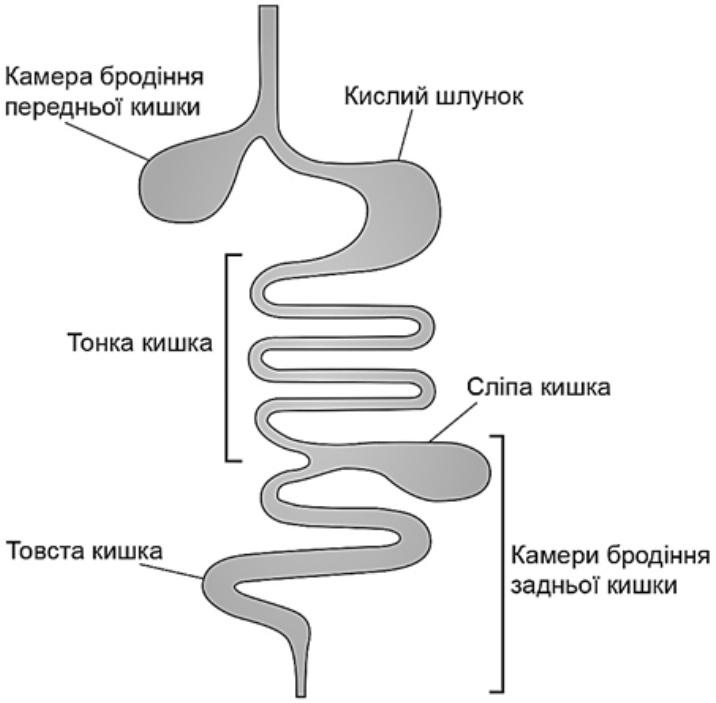


Рис. 17.25. Варіації архітектури кишківника хребетних

З поживної точки зору ферментери передньої кишки мають перевагу перед ферментерами задньої кишки, оскільки целюлозолітичні мікроорганізми передньої кишки проходять потім через кислотний шлунок, в якому більшість з них стають джерелом білка для тварини. Навпаки, у тварин, таких як коні та кролики, залишки целюлозолітичної мікробної спільноти не утилізуються та виходять з фекаліями.

Домінуючими травоїдними на Землі є жуйні тварини, які мають спеціальний травний орган (ферментер передньої кишки) – рубець, в якому целюлоза та інші рослинні полісахариди перетравлюються мікроорганізмами. Жуйними є корови, вівці, кози, верблюди, буйволи, лосі. Загальними характеристиками рубця є його великий розмір (у корови до 150 літрів), розташування перед кислотним шлунком, постійна температура (39 °C), вузький діапазон pH (5,5–7,0) та безкисневе середовище.

Корм потрапляє в першу камеру чотирикамерного шлунка – рубець (рис. 17.26). Частково перетравлений рослинний матеріал вільно переміщується між рубцем і сіткою, основною функцією якої є збір дрібних частинок та переміщення їх до книжки. Більші частинки корму (так звана жуйка) відригуються, знову пережовуються, змішуються зі слиною, що містить бікарбонат, і повертаються в рубець, де вони далі перетравлюються бактеріями рубця. Згодом дрібні та більш ретельно перетравлені частинки потрапляють до книжки, а звідти – до сичуга (рис. 17.26), органу, схожого на справжній кислотний шлунок, в якому починаються процеси травлення, що тривають у тонкій і товстій кишці.

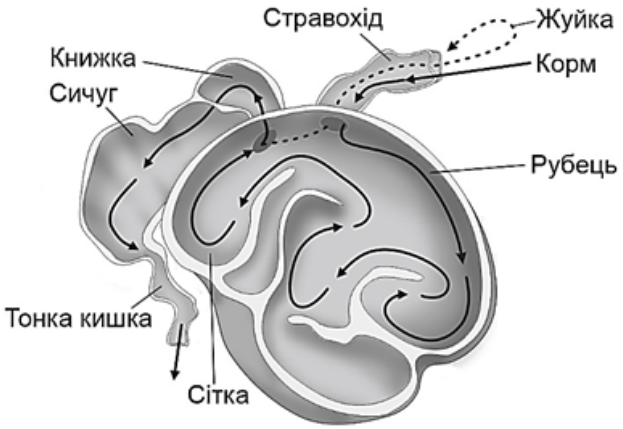


Рис. 17.26. Відділи шлунка корови

Мікробна ферментація в рубці продовжується 20–50 год. Протягом цього часу целюлозолітичні мікроорганізми гідролізують целюлозу до глюкози, яка зброджується бактеріями з утворенням низькомолекулярних жирних кислот (НЖК) – головним чином ацетату, пропіононату та бутирату, а також вуглекислого газу та метану (рис. 17.27). НЖК проходять через стінку рубця в кровотік і окиснюються в клітинах як джерело енергії. Газоподібні продукти бродіння CO_2 і CH_4 тварина виділяє при зригуванні.

У рубці міститься велика кількість бактерій (10^{10}–10^{11} кл/г вмісту). Більшість бактерій щільно прикріплені до частинок корму. Ці частинки проходять через шлунково-кишковий тракт тварини, де вони зазнають подальших процесів травлення, подібних до процесів нежуйних тварин. Бактеріальні клітини, що перетравлювали рослинну клітковину в рубці, самі перетравлюються в кислому сичузі та забезпечують організм тварини основним джерелом білка та вітамінів.

У рубці присутня велика кількість бактерій, архей, різноманітних грибів та нефототрофних протист. Разом ці мікроорганізми складають високоінтегровану та ефективну мікробну спільноту, склад якої змінюється залежно від типів та кількості споживаного корму.

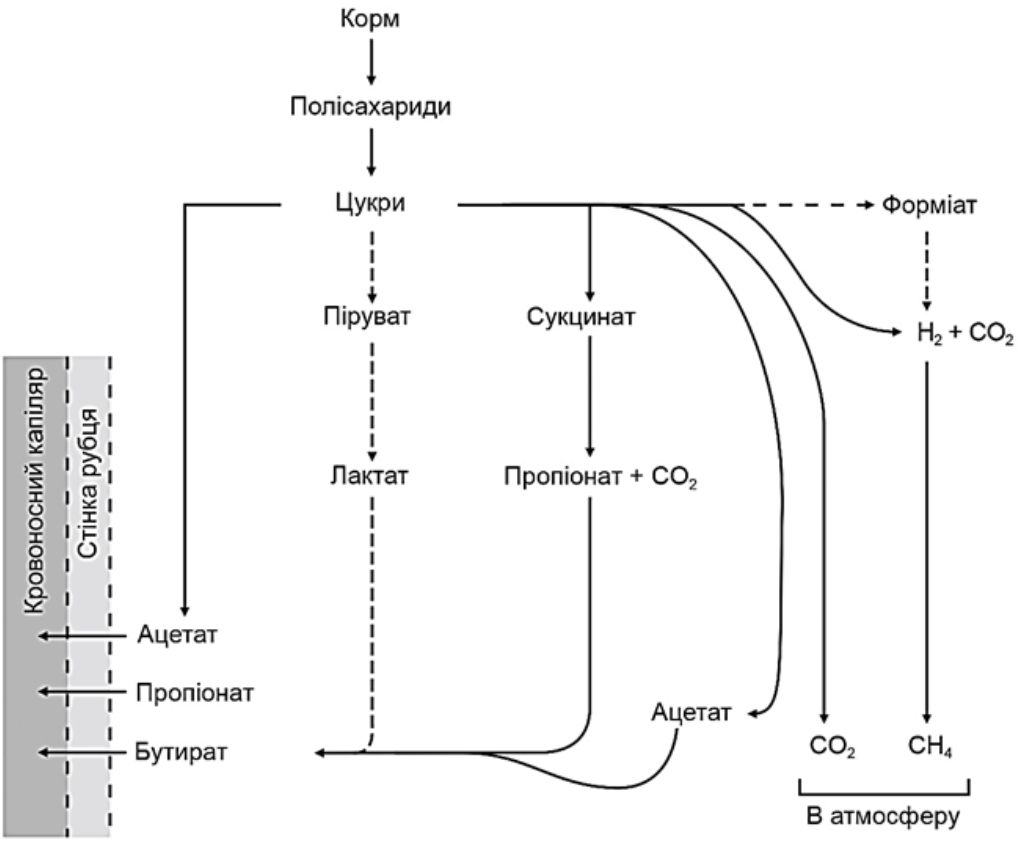


Рис. 17.27. Метаболічні шляхи та біохімічні реакції в рубці. Основні шляхи – суцільні лінії; пунктирні лінії позначають другорядні шляхи

Анаеробні бактерії та археї домінують у рубці, оскільки це суто безкисневий відділ. Целюлоза гідролізується екзоферментами анаеробних мікроорганізмів та перетворюється у харчовому ланцюгу на жирні кислоти, CO_2 і CH_4 (рис. 17.27). Аналіз послідовностей генів 16S рРНК зі зразків рубця вказує на те, що рубець містить 300–400 видів бактерій і архей. Серед мікробної спільноти домінують бактерії філумів *Firmicutes* і *Bacteroidetes* та архейні метаногени, що складають практично всю популяцію архей.

Бактерії рубця гідролізують клітковину до цукрів і ферментують їх до НЖК. Самі поширені целюлолітичні бактерії рубця – *Fibrobacter succinogenes і Ruminococcus albus*.

Окрім популяцій бактерій і архей, у рубці є популяції війчастих протистів із щільністю приблизно 10^6 кл/мл. Протисти як і бактерії є анаеробами, що рідко зустрічається серед еукаріотів. Вони споживають бактерії та відіграють важливу роль у контролі щільності бактерій.

Анаеробні гриби рубця зазвичай є видами, що чергуються між джгутиковою та таломною формами. Вони відіграють важливу роль у розкладанні целюлози, лігніну, геміцелюлози та пектину.

Значні різкі зміни мікробного складу рубця можуть спричинити хворобу або навіть смерть тварини. Так, при раптовому переведенні годівлі корови з фуражного на зерновий раціон в рубці швидко розмножується молочнокисла бактерія *Streptococcus bovis* з близько 10^7 кл/г в нормі до понад 10^{10} кл/г, що стає переважаючою в мікробній спільноті, оскільки зерно містить високий рівень крохмалю, на якому *S. bovis* швидко росте. *S. bovis* продукує велику кількість молочної кислоти, що підкислює нижній рубець і порушує активність нормальної мікробіоти та викликає запалення епітелію, спричиняє крововиливи, закислення крові та загибель тварини.

Питання для самостійного контролю

1. Назвіть типи взаємовідносин мікроорганізмів між собою та з іншими мікроорганізмами.
2. Які мікроорганізми утворюють симбіотичне партнерство в лишайнику?
3. Яку перевагу рухливість надає фототрофному консорціуму бактерій?
4. Який із двох організмів-партнерів – анаеробна метанокиснюча евріархея чи сульфатредукуюча бактерія, має здатність жити незалежно?
5. Що таке бактероїд? Яку функцію виконує леггемоглобін?
6. Чим відрізняються ендомікориза від ектомікориза?
7. Чим відрізняються гени vir від Т-ДНК у Ті-плазміді?
8. Які наслідки зменшення геному симбіонта комах?
9. Що незвичайного в складі мікробіому кишечника медоносної бджоли?
10. Чому у багатьох термітів відновний ацетогенез переважає над метаногенезом?
11. Що таке визначення кворуму та як воно контролює біолюмінесценцію?
12. Як живляться гігантські трубочники гідротермальних джерел?
13. Де в коралі локалізуються клітини *Symbiodinium*?
14. Чим відрізняються тварини з ферментацією у передній і задній кишці в вилученні поживних речовин з рослин?
15. Як гриби та протисти можуть виживати в безкисневому рубці?
16. Наведіть приклад того, як зміна типу клітковини, яку дають жуйній тварині, може призвести до зміни складу мікроорганізмів в його рубці.
17. Чому метаболізм *Streptococcus bovis* викликає проблеми в годуванні корови?

РОЗДІЛ 18
МІКРОБІОМ ЛЮДИНИ

Організм людини (як і тварин) не може функціонувати нормально без своїх мікробних партнерів, тобто є *голобіонтом* або мегаорганізмом (людина-мікробіом). *Мікробіом* – це сукупність всіх мікроорганізмів (та їх генів), які присутні зазвичай в організмі та на ньому. На відміну від мікробіому термін *мікробіота* людини означає сукупність лише мікроорганізмів (без генів) у та на організмі, окремих органах і системах (мікробіота шкіри, мікробіота кишківника та ін.), в той час як *метагеном* людини – це, відповідно, набір тільки генів всіх мікроорганізмів.

Конкуренція та взаємність між різними мікроорганізмами та їх хазяїном допомогає підтримувати життєву стабільність. Мікроорганізми, які звичайно пов'язані з тілом людини, відомі ще як *нормальна мікробіота*.

18.1. Нормальна мікробіота

Нормальна мікробіота тіла – єдиний природний комплекс, що складається з сукупності гетерогенних мікробоценозів у різних ділянках (біотопах) організму людини, що виконують певні функцій для нього. Подібна інтеграція є необхідною, вона універсальна для живого світу та сформувалась внаслідок відбору в процесі біологічної еволюції.

Біотопи тіла людини суттєво різняться по газовому складу повітряного середовища, спектру ферментів та імунних факторів, продуктів метаболізму та інших біологічно активних речовин, рівню pH, набору екзогенних речовин. Ці та інші параметри різні в ротовій порожнині, стравоході, шлунку, тонкій та товстій кишці, піхві, носі, верхніх та нижніх дихальних шляхах, на шкірі (рис. 18.1).

Процес заселення епітелію мікроорганізмами, неможливий без попередньої адгезії. Адгезія (прикріплення, фіксація) мікроорганізмів зумовлена лігандно-рецепторною спорідненістю поверхневих структур епітеліальних клітин та мікроорганізмів. Тож у мікроекологічному відношенні організм людини полібіотопний і кожен біотоп разом із відповідним мікробіоценозом становить специфічну екосистему.

Тканини та порожнини, що сполучаються з зовнішнім середовищем, є відкритими біологічними системами, які колонізовані мікроорганізмами. Мікробіоценози слизових різних біотопів відрізняються між собою за якісним складом та щільністю населення (рис. 18.1).

Відповідно до сучасних уявлень, природну мікробіоту будь-якого біотопу поділяють за походженням на постійну (синоніми: резидентна, індигенна, аутохтонна) та випадкову (синоніми: транзиторна, алохтонна). Якщо постійна мікробіота містить специфічні представники для даного біотопу, то випадкова складається з мікроорганізмів, занесених ззовні.

Так, у шлунково-кишковому тракті можуть виявитися сторонні мікроорганізми, що потрапили з їжею або напоями. Шкірні покриви найчастіше

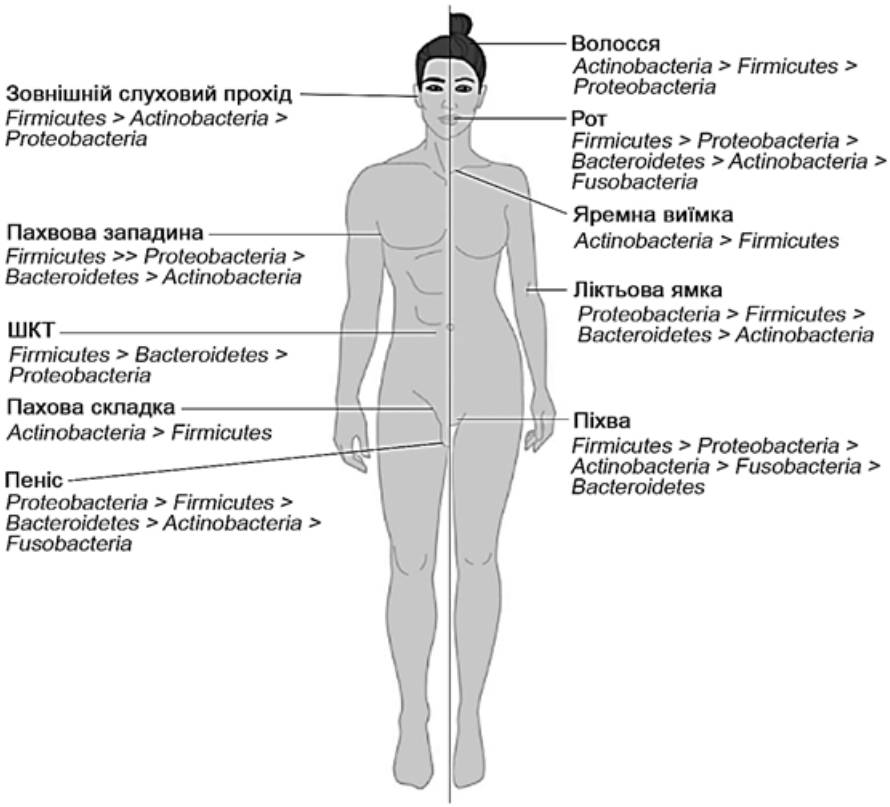


Рис. 18.1. Основні філуми бактерій, виявлені методом метагеномного аналізу, на тілі людини

контамінуються випадковою мікробіотою із навколишнього середовища. Постійна мікробіота конкретного біотопу стабільна за складом. Водночас склад та фізіологічна роль мікроорганізмів, їх складових, далеко не рівнозначні, тому в постійній мікробіоті розрізняють дві фракції: облігатну та факультативну. Облігатна мікробіота є головною складовою будь-якого мікробоценозу, вона протидіє заселенню біотопу випадковими мікроорганізмами, бере участь у процесах ферментації, імуностимуляції, тобто виконує захисні чи інші нормофізіологічні функції.

Природна мікробіота людини неоднорідна як за складом, так і за роллю окремих її компонентів в нормі та патології. У ній закладена здатність не тільки до нормофізіологічних функцій, а й до агресії по відношенню до організму хазяїна. Однак останнє притаманне лише незначній частині симбіотичної мікробіоти організму, яку називають *опортуністичною*.

Оскільки переважна більшість мікроорганізмів ще не піддається культивуванню, були розроблені передові методи секвенування, що дозволило мікробіологам швидко порівнювати мікробіоми різних індивідуумів і

визначати динамічний зв'язок між мікробіомом та генетикою, станом здоров'я та дієтою людини, що не применшує значення культивування при вивченні мікробіому

Молекулярна ідентифікація мікроорганізмів, повязаних з тілом людини, призвела до революції в мікробіології, фізіології, імунології, патофізіології людини. За результатами дослідницького проєкту «Мікробіом людини» Національного інституту охорони здоров'я (США) середня доросла людина має приблизно в три рази більше мікробних клітин (10^{14}), ніж власних соматичних клітин. Сумарний геном мікроорганізмів налічує понад 8 мільйонів різних генів, що виконують важливі функції, які не може забезпечити геном людини (приблизно 22 000 генів людини).

Встановлено, що різноманіття всіх бактерій мікробіому людини налічує приблизно 2172 види, які загалом належать до 12 різних філумів. Найбільше представлені 5 основних філумів бактерій: *Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria* та *Fusobacteria.*

Завдяки метагеномному аналізу стало можливим охарактеризувати бактеріальний склад чотирьох найбільших біотопів людського тіла (шкіра, ротова порожнина, шлунково-кишковий та урогенітальний тракт) за визначеними таксонами високого рівня (рис. 18.2).

Рис. 18.2. Біологічна різноманітність мікробних популяцій шкіри, глотки, сечостатевого та шлунково-кишкового трактів

Встановлено, що у кожному з цих біотопів одна група бактерій, як правило, переважає, і в кожному біотопі ці групи різні. Так, на шкірі – це види *Propionibacterium*; в глотці – види *Streptococcus*, сечостатевих органах – види *Lactobacillus*, шлунково-кишковому тракті – види *Bacteroides*. Різноманітність грампозитивних бактерій найбільша на шкірі та в сечостатевому тракті, тоді як в шлунково-кишковому тракті найбільша різноманітність – у грамнегативних бактерій.

Мікроорганізми адаптовані до окремих біотопів тіла людини: шкіра, ротова порожнина, ШКТ, дихальні шляхи, око, вухо, сечостатевий шлях.

Склад мікробіому кожного з них залежить від різних факторів, таких як вік, стать, дієта, харчування та навколишнє середовище. Єдиного, стан-

дартного, здорового мікробіому не існує. Кожна людина містить унікальне зібрання мікроорганізмів, які збираються в результаті взаємодії з навколишнім середовищем, харчуванням, ліками та багатьма іншими факторами.

У здорової людини, незалежно від віку, внутрішні тканини (наприклад, мозок, кров, спинномозкова рідина, м'язи) зазвичай вільні від мікроорганізмів. І навпаки, поверхневі тканини (наприклад, шкіра та слизові оболонки) постійно контактують із навколишнім середовищем і колонізуються різними мікроорганізмами, серед яких види бактерій значно переважають археїв, грибів та найпростіших. Види *культивованої мікробіоти*, яка зазвичай є характерною для різних частин тіла, представлені в таблиці 18.1.

18.2. Мікробіота шкіри

Поверхня шкіри або епідерміс має слабокислий pH, високу концентрацію хлориду натрію, в певних зонах дефіцит вологи, шкірний жир і антимікробні пептиди. Було підраховано, що на кожен квадратний сантиметр шкіри припадає близько мільйона резидентних бактерій, тобто шкіра підтримує близько 10^{10} бактерій, які живуть у різних біотопах з різними умовами (рис. 18.2).

На шкірі, як правило, присутні тимчасові мешканці, які, зазвичай, не здатні розмножуватися. Загалом виявлено близько 20 філумів бактерій, але більшість філотипів належать до одної з чотирьох груп: *Actinobacteria* (~52%), *Firmicutes* (~24%), *Proteobacteria* (~16%), *Bacteroidetes* (~6%) та понад 200 різних родів, серед яких, зазвичай, переважають види трьох родів *Corynebacterium*, *Propionibacterium* і *Staphylococcus*.

Поверхню шкіри можна розділити на три екологічні ніші: сухі, вологі та сальні (містять шкірне сало). Загалом різноманітність бактерій є найбільшою в сухих місцях (н. п., передпліччя, сідниці, кисті), де містяться суміші грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів з філумів *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes* і *Cutibacterium*.

Вологі ділянки (н. п., пупок, під пахвами, сідничні складки) виявляють меншу різноманітність, підтримуючи переважно представників *Firmicutes* та *Actinobacteria* (н. п., *Staphylococcus* і *Corynebacterium spp.,* відповідно) на додаток до невеликої кількості інших бактерій. Найменшим розноманіттям характеризуються сальні ділянки (н. п., лоб, за вухом і спина), де домінують *Cutibacterium spp*. та інші актинобактерії (рис. 18.1).

Більшість бактерій шкіри знаходяться на поверхневих клітинах, колонізують мертві клітини або тісно пов'язані з сальними та потовими залозами. Секрети цих залоз забезпечують воду, амінокислоти, сечовину, електроліти та жирні кислоти, що служать поживними речовинами в основному для резидентних бактерій, таких як *Staphylococcus epidermidis*.

Сальні залози виділяють складні ліпіди, які можуть частково розкладатися ферментами деяких грампозитивних бактерій, зокрема *Cutibacterium*

Таблиця 18.1

Склад культивованої нормальної мікробіоти різних біотопів тіла дюдини

Систем тіла	Місце на тілі	Мікроорганізми
Око	Кон'юнктива	Коагулазонегативні стафілококи, *Hemophilus* spp.*, Staphylococcus aureus, Streptococcus* spp.
	Зовнішнє вухо	Коагулазонегативні стафілококи, Дифтероїди, *Pseudomonas spp., Enterobacteria* (зрідка)
Шкіра	Поверхня безслизової оболонки	Коагулазонегативні стафілококи, Дифтероїди, *Cutibacterium acnes, Staphylococcus aureus, Streptococcus* spp.*, Bacillus* spp.*, Malassezia furfur, Candida* spp.*, Mycobacterium spp.* (зрідка)
Дихальний шлях	Ніс	Коагулазонегативні стафілококи, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus, Neisseria* spp, *Haemophilus* spp.
Шлунково-кишковий тракт	Рот і ротоглотка	*Streptococcus* spp. Коагулазонегативні стафілококи, *Veillanella* spp., *Fusobacterium* spp., *Treponema* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Neisseria* spp.*, Branhamella* spp.*, Hemophilus* spp.*,* Дифтероїди, *Candida* spp., *Actinomyces* spp. *Eikenella corradens, Staphylococcus aureus*
	Шлунок	*Streptococcus* spp.*, Staphylococcus* spp. *Lactobacillus* spp., *Peptostreptococcus* spp.
	Тонка кишка	*Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Mycobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Enterobacteria*
	Товста кишка	*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinefobacter* spp.*,* Коагулазонегативні стафілококи*, Staphylococcus aureus, Mycobacterium spp., Actinomyces spp*.
Сечостатевий тракт	Товста кишка	Коагулазонегативні стафілококи, Дифтероїди, *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp.
	Вагіна	*Lactobacillus* spp., *Peptostreptococcus* spp., Дифтероїди, *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp.

acnes. Ці бактерії зазвичай нешкідливі, однак вони пов'язані зі звичайними вуграми. Наприклад, колонізації фолікулярної системи сальних залоз бактеріями *C. acnes* сприяє її здатність гідролізувати тригліцериди, присутні в шкірному салі, що призводить до вивільнення жирних кислот. Це сприяє адгезії бактерій та іноді викликає захворювання акне.

Ці бактерії перетворюють ліпіди, що виділяються сальними залозами, на ненасичені жирні кислоти, такі як олеїнова кислота, що мають сильну антимікробну дію проти грамнегативних бактерій і грибів. Деякі з цих жирних кислот є леткими і можуть мати сильний специфічний запах, для нейтралізації якого багато дезодорантів містять антибактеріальні речовини, що вибірково діють на грампозитивних бактерій, зменшуючи вироблення летких ненасичених жирних кислот і неприємний запах тіла.

На шкірі присутні також еукаріотичні мікроорганізми та археї. Дріжджі роду *Malassezia* є найпоширенішим грибком на шкірі та принаймні п'ять різних їх видів зазвичай присутні на шкірі здорових людей.

Найбільшу антагоністичну активність по відношенню до випадкових умовнопатогенних бактерій виявляють дифтероїди та непатогенні стафілококи. Основними факторами їх антагонізму є ненасичені жирні кислоти, що утворюються при бактеріальному розщепленні шкірного жиру, а також метаболіти, що мають вибіркові антибактеріальні властивості.

У дорослих людей механізми колонізаційного захисту шкірних покривів найбільш виражені. У людей похилого віку ці механізми менш активні, оскільки зменшується секреція ліпідів шкіри та частка дифтероїдів, тому концентрація природної мікробіоти шкіри підвищена, причому частіше виявляються невластиві здоровій шкірі дріжджоподібні гриби роду *Candida*, кишкова паличка та ін.

18.3. Мікробіота дихальних шляхів

Дихальні шляхи поділяються на верхні дихальні шляхи (ВДШ) — ніздрі, пазухи, глотка, ротоглотка та нижні дихальні шляхи (НДШ) — гортань нижче голосових зв'язок, трахеї, бронхи та легені. ВДШ колонізується різноманітними групами мікроорганізмів (табл. 18.1). Мікроорганізми постійно потрапляють у ВДШ з повітрям під час дихання, але більшість з них звязується слизом носових та ротового шляхів і викидається з виділеннями або проковтується.

Як і шкіра, передня частина носа колонізована грампозитивними, ліпофільними бактеріями родів *Staphylococcus, Corynebacterium* і *Cutibacterium*. Глибше в носовій порожнині знаходять представники родів грампозитивних *Streptococcus* і *Dolosigranulum* та грамнегативних *Moraxella* і *Haemophilus* spp. бактерій.

Найбільш різноманітна мікробіота ротоглотки, де крім бактерій, що зустрічаються в носоглотці, є представники родів *Neisseria, Rothia, Veillonella, Prevotella* та *Leptotrichia*. ВДШ також є помешканням для ве-

ликої різноманітності вірусів, деякі з них є патогенними. Часто потенційні патогени, такі як *Staphylococcus aureus* і *Streptococcus pneumoniae*, є частиною нормальної мікробіоти в носоглотці здорових людей.

Мікробіом НДШ вивчений мало, оскільки відбір зразків з легенів без мікробного забруднення з ВДШ є технічно складним та інвазивним. Мікроорганізми надходять в НДШ з повітрям та, переважно, з ротоглотки, але їхнє перебування є тимчасовим, оскільки вони викидаються та замінюються новими.

У здорових людей немає постійної природної мікробіоти НДШ. В них міститься дуже низька кількість бактерій, які потрапляють із верхніх дихальних шляхів під час дихання. Мікроорганізми осідають на стінках дихальних шляхів, що вистелені миготливими епітеліальними клітинами. Війки виштовхують бактерії та інші тверді частинки до ВДШ, звідки вони потім викидаються зі слиною та носовими виділеннями або проковтуються.

18.4. Мікробіота ока та зовнішнього вуха

При народженні та протягом усього життя людини невелика кількість бактерій знаходиться на кон'юнктиві ока. Серед них переважають бактерії *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus, Haemophilus spp.* і *Streptococcus pneumoniae*.

Нормальна мікробіота зовнішнього вуха нагадує мікробіоту шкіри, з домінуванням коагулазонегативних стафілококів та видів *Corynebacterium*.

18.5. Мікробіота сечостатевого тракту

Верхні сечовивідні шляхи (нирки, сечоводи і сечовий міхур) зазвичай вільні від мікроорганізмів. Як у чоловіків, так і у жінок, кілька поширених видів бактерій (*S. epidermidis, E. faecalis* і *Corynebacterium spp.*) виділяють з дистальної частини уретри (табл. 18.1). На відміну від чоловіків сечостатевий шлях дорослої жінки завдяки великій площі поверхні та слизовим виділенням мають різноманітну мікробіоту, яка змінюється з менструальним циклом.

Культивовані мікроорганізми є кислотостійкими лактобактеріями, включаючи *Lactobacillus acidophilus*. Вони зброджують глікоген, який виробляється епітелієм, з утворенням молочної кислоти, тому pH піхви та шийки матки підтримується в межах 4,0–4,6, що пригнічує інші мікроорганізми. Окрім *L. acidophilus*, *методом метагеномного аналізу* ідентифіковано різноманітні анаеробні грамнегативні та грампозитивні бактерії, деякі з них включають ті, що, зазвичай, мешкають на вологих ділянках шкіри (рис. 18.2 і табл. 18.1).

Матка в нормі стерильна, а при хронічному дисбактеріозі піхви або урогенітальній інфекції на фоні зниженої чисельності захисної молочнокислої мікробіоти незалежно від віку переважають ентеробактерії, енте-

рококи, стафілококи та дріжджоподібні гриби роду *Candida*. За вагітності зростає кількість лактобактерій, які сприяють очищенню пологових шляхів матері від мікробіоти, несприятливої для новонародженого.

18.6. Мікробіота шлунково-кишкового тракту

Слизові оболонки всього тіла підтримують ріст нормальної мікробіоти, яка допомагає запобігти зараженню патогенними мікроорганізмами. Слизові оболонки складаються з щільно упакованих епітеліальних клітин, які контактують із зовнішнім середовищем і зустрічаються по всьому тілу, вистилаючи сечостатеві, дихальні та шлунково-кишковий шляхи. Слизові оболонки виділяють муцин, утворюючи слизовий (мукозний) шар, який утримує вологу та перешкоджає прикріпленню мікроорганізмів.

Мікробіоту, що вистилає щільним газоном стінки порожнин, називають мукозною мікробіотою або М-біотою. Вона є найважливішою, оскільки представлена постійною (резидентною) мікробіотою та виконує нормофізіологічні функції разом із секреторними імуноглобулінами, лізоцимом, системою лактопероксидази, травними ферментами та іншими гуморальними факторами макроорганізму.

Крім того, є мікроорганізми, які слабко пов'язані зі стінками порожнин (пристінкова мікробіота) або зовсім не фіксуються в біотопі (просвітна мікробіота). Ймовірно, ці компоненти відіграють певну роль у різноманітних біохімічних реакціях, важливих для процесу травлення та моторно-евакуаторної функції кишковика. Крім того, навіть невелика кількість патогенних мікроорганізмів, що випадково потрапили в біотоп, за певних обставин можуть закріпитися на слизовій і навіть проникнути в неї.

18.6.1. Ротова порожнина

Шлунково-кишковий тракт починається з ротової порожнини та включає глотку, стравохід, шлунок, дванадцятипалу кишку, тонку кишку, сліпу кишку, апендикс, товсту кишку, пряму кишку, анус (рис. 18.3). Складна суміш поживних речовин, присутніх у слині ротової порожнини (містить білки, глікопротеїни, амінокислоти, пептиди та вітаміни) та в уживаній їжі, живить різноманітну спільноту з аеробів і анаеробів.

Слина містить також антибактеріальні речовини, до яких відноситься лізоцим, який розщеплює глікозидні зв'язки в пептидоглікані клітинної стінки бактерій і викликає лізис бактерій, та лактопероксидазу, що генерує токсичний для мікроорганізмів синглетний кисень.

Ротова порожнина забезпечує різноманітні середовища проживання мікробів, кожне з яких колонізовано видами, що ростуть переважно у вигляді біоплівок. Існують значні варіації у різноманітності та специфіці колонізації різними видами бактерій слини, епітелію та поверхонь порожнини рота.

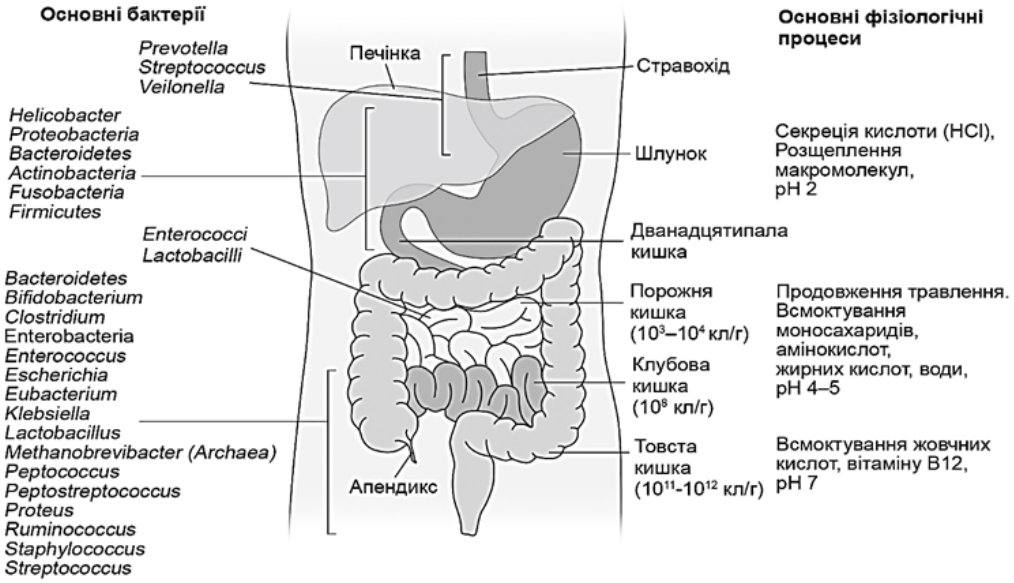


Рис. 18.3. Шлунково-кишковий тракт здорової людини та основні представники його мікробіоти

Рис. 18.4. Клітини *Nanosynbacter lyticus* (стрілки), прикріплені до актинобактерії *Actinomyces odontolyticus*

Мікробоценоз ротової порожнини різноманітний, у ньому представлено близько 300 видів мікроорганізмів. Максимальна концентрація бактерій складає 10^8–10^{11} життєздатних клітин в 1 мл слини та грамі зіскрібку з слизових, вмісту ясенних кишень. Анаеробна мікробіота ротової порожнини починає швидко зростати після прорізування зубів у дітей. У десневых кишенях концентрація мікробів може досягати 10^{11} кл/мл, причому 99% з них є анаеробами.

Майже всі бактерії, що населяють здорову ротову порожнину, можна віднести до семи філумів: *Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Saccharibacteria* та *Spirochaetes*. Цей біотоп включає не менше 750 видів аеробних і анаеробних мікроорганізмів, в т. ч. незначну кількість метаногенних архей і дріжджів, розподілених на поверхнях зубів, тканин і в слині. Більшість цих мікроорганізмів мають факультативно аеробний метаболізм. Найбільш поширеними серед бактерій *Firmicutes* є бактерії роду *Streptococcus* (~20%) і облігатно-анаеробні *Veillonella* (~9%), хоча відносна кількість їх сильно варіює в залежності від вживаної їжі.

Унікальним є виявлення в ротовій порожнині бактерій виду *Nanosynbacter lyticus* філуму *Saccharibacteria,* представників якого вперше було виявлено глибоко в надрах Землі. Ця мініатюрна бактерія (200–300 нм) має редукований геном, не може синтезувати амінокислоти, вітаміни та попередники клітинної стінки, тому існує як облігатний епіпаразит, що черпає поживні речовини з інших бактерій ротової порожнини шляхом фізичного прикріплення до них.

Незабаром після народження немовляти ротова порожнина колонізується мікроорганізмами з навколишнього середовища, більшість з яких є аеробами та облігатними анаеробами. При появі зубів бактерії *Streptococcus parasanguis* і *S. mutans* прикріплюються до поверхонь емалі, а *S. salivarius* – до поверхні щічного епітелію ясен та колонізують слину. Стрептококи виробляють глікокалікс і інші фактори адгезії, які дозволяють їм прикріплюватися до поверхонь порожнини рота. Наявність цих бактерій сприяє остаточному утворенню зубного нальоту, карієсу, гінгівіту та пародонтозу.

Бактерії, що знаходяться в ротовій порожнині, сприяють здоров'ю хазяїна, тримаючи під контролем патогенні бактерії та запобігаючи їх доступу до поверхонь слизової. Карієс, запалення ясен і захворювання пародонту є одними з найбільш помітних проявів порушення загалом стабільного мутуалізму. З ротової порожнини їжа та мікроорганізми потрапляють через стравохід у шлунок.

18.6.2. Стравохід та шлунок

Склад мікробіоти стравоходу та шлунка у здорових дітей та дорослих не буває постійним, оскільки залежить від характеру прийнятої їжі. Бактерії, що виявляються в стравоході, відповідають мікробному пейзажу порожнини рота.

Вміст культивованих мікроорганізмів у здоровому шлунку складає у 10^2–10^3 КУО/г. Під дією кислоти шлунка (pH 2–3) більшість мікроорганізмів гинуть. У результаті шлунок зазвичай містить менше 10 життєздатних бактерій на мілілітр шлункової рідини. В основному це представники родів *Streptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Peptostreptococcus spp.,* а також

дріжджі роду *Candida*. Мікроорганізми можуть вижити, якщо вони швидко проходять через шлунок або якщо мікроорганізми, які потрапляють з їжею, особливо стійкі до дії кислоти.

18.6.3. Тонка кишка

Тонка кишка ділиться на три відділи: дванадцятипала, порожня та клубова кишки. Мікробіота тонкої кишки здорових людей нечисленна. У клубовій кишці загальна кількість бактерій становить 10^6 КУО/мл, а в інших відділах тонкого кишківника – менше 10^4 КУО/мл. Дванадцятипала кишка (перші 25 см тонкої кишки) містить мало мікроорганізмів внаслідок спільного впливу кислого соку шлунка, інгібувальної дії жовчі та секретів підшлункової залози.

З присутніх бактерій більшу частину мікробіоти складають грампозитивні коки та палички. У порожній кишці зрідка виявляють *Enterococcus faecalis*, лактобацили, дифтероїди, дріжджі *Candida albicans*. У дистальній частині тонкої кишки (клубова кишка) мікробіота починає набувати характеристик мікробіоти товстої кишки. Саме в клубовій кишці pH стає більш лужним. Тут мешкають анаеробні грамнегативні бактерії та представники родини *Enterobacteriaceae*.

18.6.4. Товста кишка

Товста кишка людини є одним з найбільш відомих щільних мікробних біотопів на Землі з концентрацією 10^{12} КУО/г вмісту кишки. Площа мікробної колонізації величезна, тому сумарна біомаса бактерій становить приблизно 5% загальної ваги кишківника. Внутрішній шар муцину, який виробляється слизовою оболонкою кишки та контактує з нею, частково насичений киснем, але загалом вільний від бактерій. Рідко заселений зовнішній шар слизу прилягає до сильно колонізованого аноксичного просвіту, що отримує неперетравлені частинки їжі з тонкої кишки (рис. 18.5).

Серед мікробіоти товстої кишки виявлено понад тисячу різних видів мікроорганізмів, більшість з яких ще не культивовані. У здоровому мікробіомі домінують представники філумів *Firmicutes* і *Bacteroidetes* (рис. 18.2). На рівні роду існує величезна індивідуальна мінливість, тому було сформульовано поняття основного мікробіому, тобто групи таксонів (зазвичай на рівні роду), притаманних для людей, які мають спільні характеристики.

Мікробіом колективно виконує певні метаболічні та регуляторні функції. Метагеномний аналіз біорізноманітності показує, що люди, які дотримуються дієти з низьким вмістом клітковини та високим вмістом жиру, типової для більшості промислово розвинених країн, мають характерний основний мікробіом відмінний від тих, хто споживає рослинну дієту (з високим вмістом клітковини та низьким вмістом жиру). По суті, ці дві групи людей живлять свої мікробіоми по-різному. Мікробіом швидко реагує на

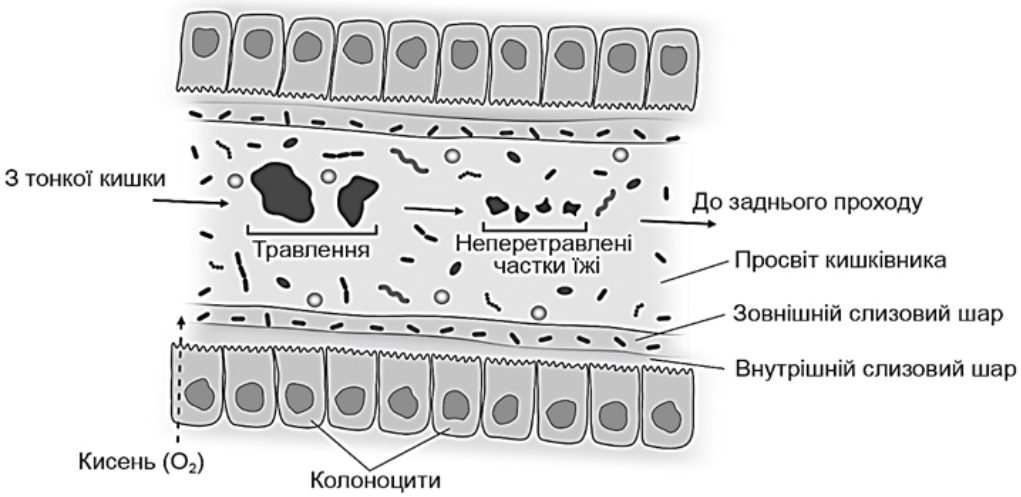


Рис. 18.5. Колонізація мікробіотою зовнішнього шару слизу та просвіту товстого кишківника

суттєві зміни в дієті змінами в складі популяцій, які дуже варіабельні і зберігаються до тих пір, поки зберігається склад харчової дієти.

Аналіз великих масивів метагеномних даних дав підстави визначити, що основний мікробіом кишківника людей, які дотримуються дієти з низьким вмістом клітковини та високим вмістом білка, як правило, включає роди *Bacteroides, Faecalibacterium, Clostridia, Prevotella, Coprococcus* і *Ruminococcus*.

У сукупності кишкова мікробіота працює як орган, який має метаболічні, імунологічні та ендокринні функції. Кишкові мікроорганізми ферментують їжу, яку кишкові ферменти не можуть перетравити, оскільки бракує генів, що кодують необхідні ферменти, синтезують вітаміни, метаболізують харчові токсини та канцерогени, забезпечують дозрівання імунної системи, впливають на ріст і диференціацію клітин-хазяїна, які вистилають товсту кишку (колоноцитів), регулюють розвиток кишкового кровопостачання, захищають від кишкових патогенів та перетворюють стероїди, такі як холестерин і жовчні кислоти, в інші сполуки.

Наприклад, до половини холестерину, який споживається, перетворюється мікроорганізмами в копростанол, що виводиться з організму. Так само первинні жовчні кислоти, що виробляються печінкою, модифікуються кишковими мікроорганізмами до структурно різних вторинних жовчних кислот, які у свою чергу впливають на ріст інших мікроорганізмів кишківника (н. п., збудника *Clostridioides difficile*) та транспортуються до печінки, нирок і серця, де вони, як вважається, стимулюють ліпідний, глюкозний

та енергетичний обмін. Різні мікроорганізми відповідають за різні модифікації жовчних кислот, що мають різні за дією ефекти. Це може слугувати наочним прикладом того, як склад мікробіому впливає на здоров'я та гомеостаз людини.

18.6.5. Розвиток мікробіоти з віком людини

Мікробіота травного тракту – сама численна та важлива для підтримки здоров'я людини. Особливо велика її роль у дитячому організмі, який розвивається. Існує два критичні моменти у процесі формування кишкового мікробіоценозу. Перший – при народженні дитини, коли протягом першої доби починається колонізація стерильного кишківника, другий – коли дитину відлучають від грудного вигодовування.

У новонароджених та дітей раннього віку до народження організм стерильний, в утробі матері ембріон захищений від вторгнення мікроорганізмів плацентарним та іншими бар'єрами. Різні ділянки тіла новонародженого швидко колонізуються, отримуючи мікроорганізми від матері та навколишнього середовища. Розвиток зрілого кишкового співтовариства займає близько трьох років і на нього значний вплив мають різні фактори та життєві події. Кожна особина має унікальний мікробіом, але він змінюється з віком та дієтою.

Колонізація та спадковість кишкової мікробіоти. Колонізація починається одразу після народження спочатку стерильної кишки, коли немовля вперше стикається з мікроорганізмами під час проходження через пологові шляхи матері. Природні вагінальні пологи на відміну від кесаревого розтину мають глибокий вплив на ранню структуру мікробіому. Далі новонароджений швидко отримує бактерії, що присутні в грудному молоці та шкірі, а пізніше під час контакту з іншими людьми та домашніми тваринами.

Подальше формування нормальної мікробіоти шлунково-кишкового тракту переважно залежить від типу вигодовування. При грудному вигодовуванні у здорових доношених дітей уже наприкінці першого – початку другого тижня життя в мікробоценозі товстого кишківника за рахунок вищої швидкості росту чітко переважає анаеробна мікробіота (понад 95%), а решта (близько 5%) – представлена різноманітними факультативними аеробами.

Подібна динаміка розвитку повноцінного кишкового мікробіоценозу новонароджених обумовлена дією комплексу стимуляторів росту бактерій у грудному молоці, у тому числі таких факторів, що стимулюють ріст біфідобактерій. Чисельно біфідобактерії значно переважають інших членів кишкового біоценозу здорових дітей першого року життя, решта представлена бактероїдами, пептококами, вейлонелами, фузобактеріями, лактобацилами, ентерококами, ешерихіями, стрептококами, стафілококами (рис.18.6).

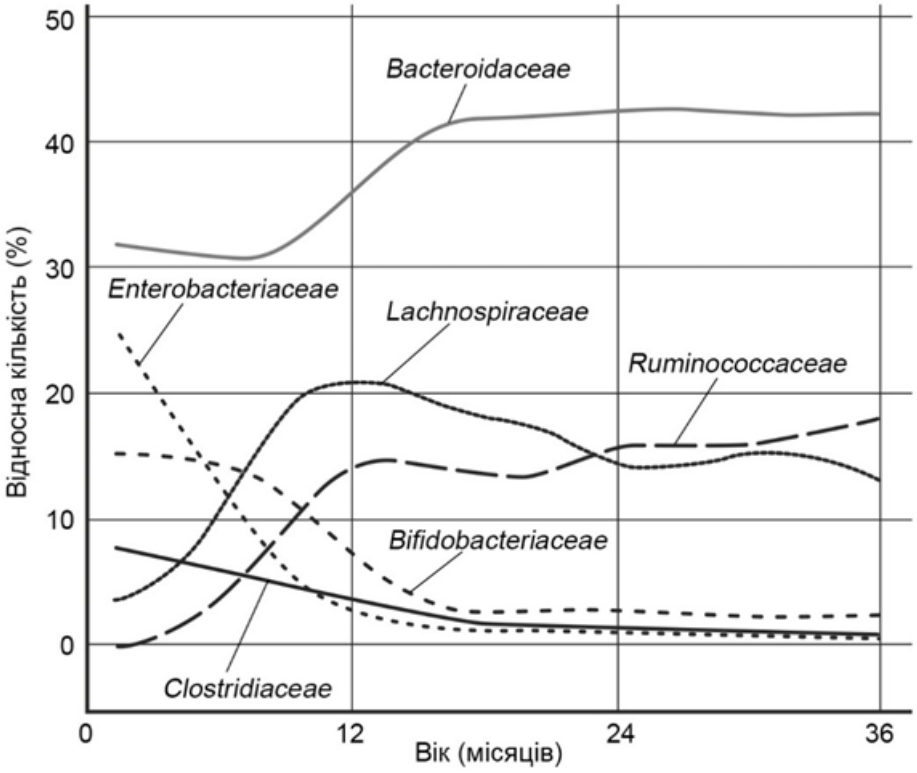


Рис. 18.6. Динаміка формування бактеріальної кишкової мікробіоти дітей після народження

Події ранньої колонізації мають вирішальне значення для перехресної взаємодії між мікробіомом та імунною системою, яка необхідна для формування добре функціонуючої системи захисту від патогенів. Порушення нормальної послідовності колонізації може бути пов'язане з розвитком у подальшому житті алергії, астми, діабету першого типу та ожиріння. Раннє годування корисними пробіотичними мікроорганізмами часто розглядається як спосіб уникнути цих захворювань.

Кишкове мікробне співтовариство немовлят досягає дорослого складу приблизно біля 3 років. Перший рік є періодом значних коливань у складі спільноти, другий рік є перехідною фазою та супроводжується дозріванням до стабільної дорослої композиції мікробіоти протягом третього року. Незріле кишкове співтовариство містить велику кількість видів, пов'язаних із факультативно аеробними *Enterobacteriaceae* (рис. 18.6).

Бактерії родів *Bifidobacterium* і *Bacteroides* є важливими ранніми колонізаторами. Кишкове співтовариство дозріває з припиненням грудного вигодовування, при цьому кількість бактерій родів, що належать до філуму *Firmicutes* і родини *Bacteroidaceae,* значно збільшується, в той час як

представників родини *Enterobacteriaceae* зменшується до дуже низького рівня.

Основними факторами, які контролюють раннє формування кишкового мікробіому після народження, є те, чи пологи відбувалися вагінальними шляхом, чи шляхом кесаревого розтину, а також чи харчувалось немовля грудним молоком, чи молочною сумішшю. Вагінально народжена дитина колонізується кишковою мікробіотою матері та включає види *Escherichia* та *Bilophila*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* і *Bacteroides*. Навпаки, мікробіота кишечника дитини, народженої за допомогою кесаревого розтину, значно відрізняється від мікробіоти матері та, як правило, збагачена видами *Staphylococcus* і *Streptococcus*, а також видами *Veillonella*, що вказує на те, що ранніми колонізаторами були бактерії шкіри, порожнини рота та навколишнього середовища.

Склад мікробіоти немовлят, яких годували молочними сумішами значно відрізняється від тих, хто був на грудному годуванні. У 4 місяці залишається чітка різниця між дітьми, які отримували виключно грудне молоко, і тими, хто отримував молочну суміш. Немовлята, які перебувають на штучному вигодовуванні, як правило, мають підвищену кількість *Clostridioides difficile* – потенційно серйозного збудника, а також інших потенційних патогенів, таких як *Citrobacter* і *Enterobacter*, тоді як у кишківнику дітей, які залишаються на грудному молоці у 12 місяців продовжують переважати *Bifidobacterium* і *Lactobacillus*.

При штучному вигодовуванні становлення повноцінної мікробіоти кишківника суттєво затримується. Фактично замість еубіозу (тобто нормального складу мікробоценозу) формується дисбіоз. Найнесприятливіші наслідки для здоров'я дитини має низький вміст біфідобактерій через дефіцит біфідогенних факторів, що як відомо, містяться тільки в нативному молоці матері.

Положення посилюється відсутністю факторів місцевого антиінфекційного захисту кишківника дитини – секреторного імуноглобуліну класу IgA (SIgA), лактоферину, лізоциму, лактопероксидази, інтерферону, лімфоцитів та макрофагів. Ці унікальні компоненти також є лише у грудному молоці. Частота інфекційних захворювань у дітей, які отримували пастеризоване молоко з додаванням штучних сумішей, у кілька разів вище, ніж у дітей, вигодованих материнським молоком.

Дозрівання мікробіому кишківника значною мірою обумовлено відсутністю грудного молока в раціоні, що зазвичай відбувається між 9 і 12 місяцями, а не введенням твердої їжі.

Стабільність дорослого мікробіому. Метагеномний аналіз різноманітності мікробної спільноти дорослої людини виявив декілька тисяч видів кишкових бактерій, однак у окремих особин мікробіом включає біля 200 видів мікроорганізмів і залишається стабільним протягом тривалого

часу. Найбільш стабільними з цих видів, як правило, є представники філумів *Bacteroidetes* і *Actinobacteria,* в той час, як види філумів *Firmicutes* і *Proteobacteria* виявляються менш стабільними членами кишкового співтовариства.

Видовий склад кишківника окремої особини, як правило, відображає склад членів родини, та, ймовірно, це встановлюється на ранньому етапі життя. Таким чином, ранні колонізатори, отримані від батьків або рідних, значною мірою визначають метаболічні та імунологічні властивості дорослого мікробіому та можуть бути важливим фактором здоров'я дорослих або схильності до захворювань.

З віком склад мікробіому змінюється. Найбільші зміни відбуваються у відносних пропорціях представників філумів *Firmicutes* і *Bacteroidetes*, при цьому зростає частка *Bacteroidetes* у людей похилого віку порівняно з більшою часткою *Firmicutes* у молодих дорослих. З віком також спостерігається значне зниження біфідобактерій і деяких видів клостридій.

18.6.6. Мікробіом і гомеостаз організму людини

Еубіоз кишківника – це оптимальне співвідношення мікроорганізмів-представників нормальної кишкової мікробіоти, яке підтримує гомеостаз організму людини. Проте, конкретно визначити співвідношення видового складу неможливо, оскільки окремі особини суттєво відрізняються між собою за особливостями свого кишкового мікробного співтовариства та змінами його складу, що пов'язані з багатьма факторами.

Однак, все ж зрозуміло, що для гомеостаза організму потрібен таксономічно різноманітний «здоровий мікробіом», який запропоновано визначати за складом його функціонального ядра. Функціональний стрижневий мікробіом включає ті мікроорганізми, які забезпечують хазяїна набором активностей, необхідних для здоров'я та гомеостазу, що потребує визначення характеристики мікробних генів і метаболітів.

Мікробіом і метаболізм. Клітини хазяїна добре поглинають прості цукри та кілька полісахаридів, але здебільшого саме кишкова мікробіота здійснює травлення складних органічних сполук, що споживаються. Дослідження мікробіомів безмікробних (БМ) мишей, які народжуються шляхом кесаревого розтину та вирощуються в стерильних вольєрах, показали, що кишкова мікробіота перетворює значну частину складних компонентів їжі на низькомолекулярні сполуки, що споживаються клітинами хазяїна. На відміну від них мікроорганізми кишківника еволюціонували, щоб гідролізувати складні полісахариди на їх мономери, які багато кишкових бактерій ферментують в коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК) – *бутират, пропіонат та ацетат* (рис. 18.7).

Бутират є основним джерелом енергії для кишкових епітеліальних клітин (колоноцитів). Фактично, бутират збільшує мітохондріальну актив-

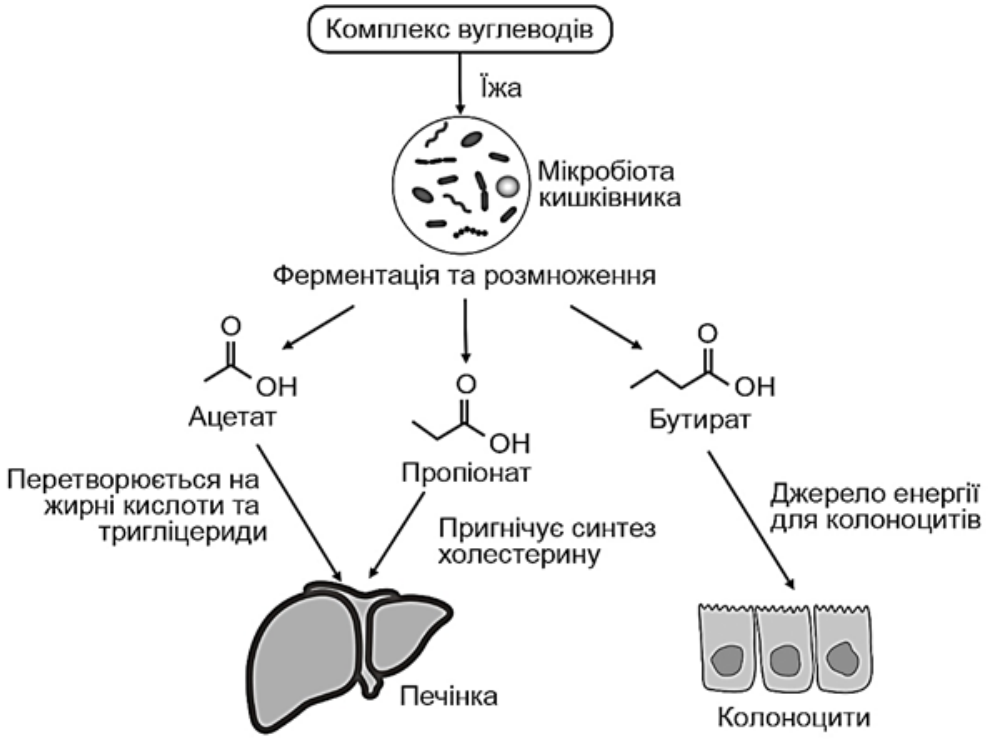


Рис. 18.7. Схема впливу кінцевих продуктів ферментації на метаболізм клітин хазяїна

ність колоноцитів, які багато вуглецевих субстратів окиснюють до CO_2. *Пропіонат* потрапляє в печінку, де пригнічує синтез холестерину, і разом з бутиратом допомагає регулювати вагу, збільшуючи виділення кишкових гормонів, що пригнічують відчуття голоду. В той же час *ацетат* легко поглинається різноманітними клітинами хазяїна та діє як попередник синтезу ліпідів у печінці та жирових клітинах. Зсув в складі кишкової мікробіоти, який спостерігаються в людей з ожирінням, призводить до збільшення кількості бактерій, що виробляють ацетат. Ці зміни сприяють збільшенню ваги і зменшенню бактерій-продуцентів бутирату та пропіонату, які навпаки запобігають ожирінню.

Розуміння ролі КЛЖК у регуляції ваги привертає увагу на значення продуктів метаболізму (метаболом) кишкового мікробіому в підтримці гомеостазу організму людини.

Мікробіом та імунітет. Коменсальні бактерії в здоровій товстій кишці конкурують з патогенами за поживні речовини та простір як безпосередньо так і шляхом непрямої взаємодії мікробіом-хазяїн-патоген.

Добре охарактеризована безпосередня взаємодія мікробіом-збудник полягає у продукції токсичних пептидів (бактеріоцини, мікроцини та ко-

ліцини) однією групою бактерії, які спеціально націлені на інших, в той час як мікроби-продуценти цих сполук залишаються неушкодженими (рис. 18.8). Бактеріоцини виробляються бактеріями та спрямовані на таксономічно споріднені мікроорганізми. Ці пептиди вбивають цільові бактерії, утворюючи пори та деполяризуючи мембрану.

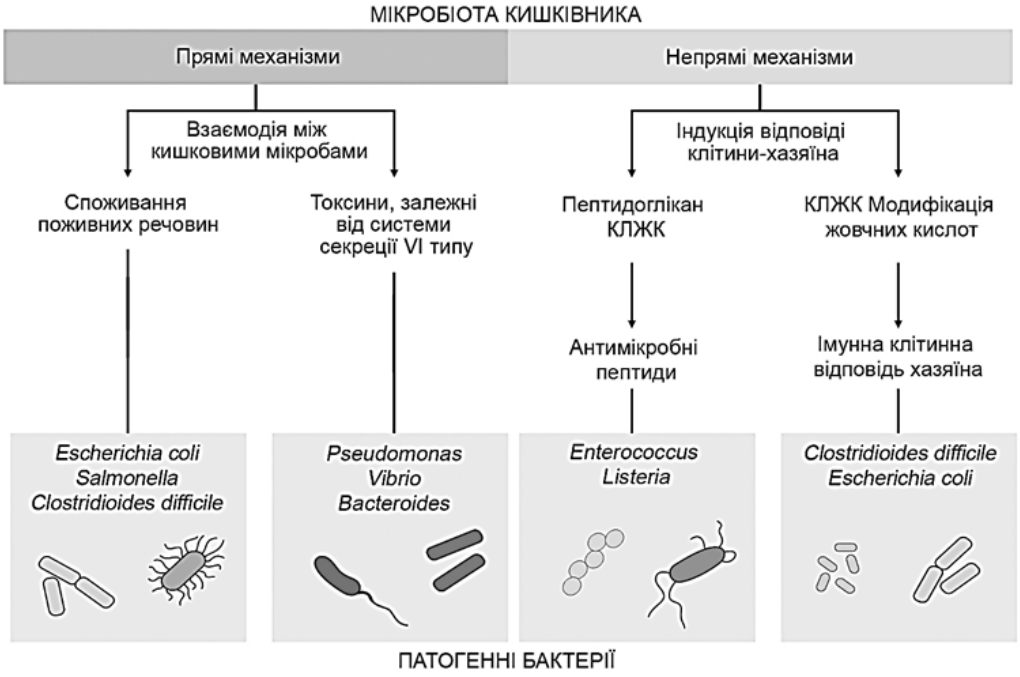


Рис. 18.8. Мікробіота кишківника, яка прямо чи опосередковано впливає на ріст патогенів

Мікроцини синтезує широкий ряд бактерій родини *Enterobacteriaceae*, а коліцини є продуктами *E. coli*. Ці два класи пептидів також володіють більш широким арсеналом токсичних механізмів, включаючи інгібування синтезу клітинної стінки, РНК-полімерази та тРНК-синтетази, а також – нуклеазною активністю. Деякі грамнегативні бактерії доставляють бактеріоцидні токсини безпосередньо через клітинну стінку та мембрану конкуруючих бактерій, використовуючи їх системи секреції VI типу (T6SS).

Приклади непрямої взаємодії мікробіом-хазяїн-патоген включають здатність пептидоглікану та коротколанцюгових жирних кислот, що вивільняються мікроорганізмами, індукувати продукування клітиною-хазяїном лектину С-типу, що зв'язують вуглеводи, яким потрібен кальцій. У цьому випадку лектин С-типу вибірково вбиває патогенні грампозитивні бактерії *C. difficile* і *Enterococcus faecalis*.

Мікробіота кишківника може також хімічно змінювати жовчні кислоти, що виробляє хазяїн. Жовчні кислоти, що надійшли в кішківник, відно-

сяться до первинних жовчних кислот, а після їх хімічної модифікації (наприклад, дегідроксилювання, дегідрування) кишковою мікробіотою вони називаються вторинними жовчними кислотами. Вторинні жовчні кислоти служать сигналами для хазяїна щодо інгібування росту збудника.

Нарешті продукт ферментації бутират стимулює колоноцити хазяїна споживати кисень через β-окиснення жирних кислот. Це, у свою чергу, обмежує дифузію кисню в просвіт кишки, що надає перевагу для росту анаеробів перед факультативними анаеробами, такими як *E. coli* та *S. enterica*.

В дослідженнях на безмікробних мишах (БМ) встановлено, що архітектура клітин кишківника безмікробних мишей відрізняється від звичайних мишей, оскільки для виробництва АМФ потрібні бактерії кишківника. Мікроорганізми в просвіті кишківника впливають на розвиток імунних клітин і тканин. У БМ мишей виявлено обмежений розвиток нейтрофілів, моноцитів, макрофагів та дендритних клітин вродженої імунної системи, що дозрівають у кістковому мозку.

Слизова оболонка кишківника вкрита кишково-асоційованою лімфоїдною тканиною – ділянками, багатими імунними клітинами, включаючи пейєрові бляшки та ізольовані лімфоїдні фолікули. При стимуляції мікробами або їх продуктами ці ділянки розвиваються в лімфоїдні фолікули, де активуються клітини вродженої та адаптивної імунної системи.

Коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), що виробляються кишковою мікробіотою, а також цитокіни, які виділяються кишковими імунними клітинами, необхідні для дозрівання імунних клітин у всьому тілі.

Макрофаги, що знаходяться в таких тканинах як ЦНС, шкіра та кишечник, також потребують функціонального мікробіому для підтримки нормальної морфології та міграції до місць інфекції. Ймовірно, що колоноцити та імунні клітини під ними та між ними розпізнають і реагують на мікроорганізми мікробіому, у тому числі на патогени.

Культивована бактерія *Bacteroides fragilis* виробляє полісахарид А, який усуває запалення, пригнічуючи вивільнення прозапального цитокіну IL-17. В той же час мікробіоми з непропорційною кількістю бактерій, що належать до філуму *Proteobacteria*, сприяють запаленню через виробництво довголанцюгових жирних кислот.

Отже, нормальна мікробіота кішківника активує імунну систему. Незрілі Т-лімфоцити направляються в кишківник, де вони вчаться розпізнавати представників нормальної микробіоти і не атакувати їх. Організм регулює склад мікробіому кишківника шляхом секреції імуноглобуліну А, протимікробних пептидів і мікро-РНК. За відсутності нормального мікробного біоценозу спостерігаються численні дисфункції, що було показано на безмікробних тваринах, названих гнотобіонтами. Розвиток безмікробної тварини супроводжується відхиленнями від норми, значним збільшенням сліпої кишки, слабким розвитком лімфатичної системи. Істотною особливістю таких тварин є підвищена чутливість до мікроорганізмів. Зараження

їх зовсім нешкідливими для звичайних тварин мікроорганізмами нерідко призводить до смерті.

Мікробіом і центральна нервова система. Одним з інтригуючих у взаємовідносинах мікробіом-людина є питання, як кишкова мікробіота може впливати на центральну нервову систему (рис. 18.9). Різноманітні дослідження показали, що специфічні поведінкові риси (допитливість, комунікабельність, тривожність, депресія) відрізняються при порівнянні безмікробних мишей (БМ) і мишей з нормальною мікробіотою. Коли БМ мишей годують з додаванням відповідних бактерій, ці риси нормалізуються.

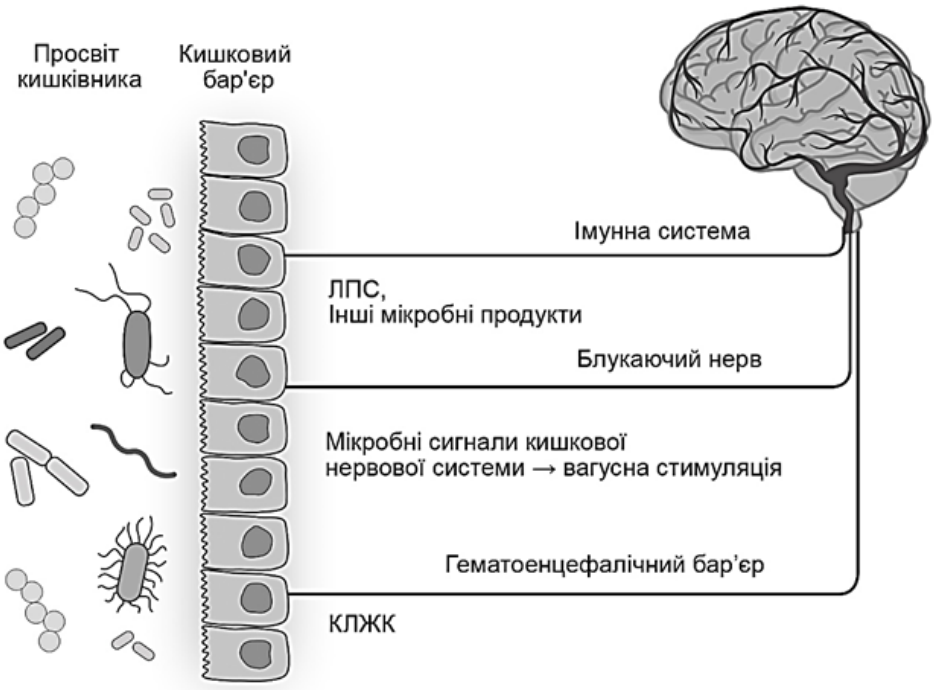


Рис. 18.9. Вплтв мікробіоти кишківника на мозок. ЛПС – ліпополісахарид; КЛЖК – коротколанцюгові жирні кислоти

Крім того, деякі поведінкові риси передаються між мишами при фекально-мікробній трансплантації (ФМТ). Вплив мікробіома також є спадковим, оскільки мікробіом кишківника вагітних мишей впливає на розвиток нервової системи їхнього потомства. Цікаво, що бактерії, які стимулюють материнську секрецію прозапального цитокіну IL-17, народжують мишенят, що демонструють антисоціальну поведінку. Такі результати спонукають до проведення досліджень молекулярних зв'язків між мікробіомом і центральною нервовою системою (ЦНС).

Нейромедіатори – це невеликі молекули, необхідні для функціонування нервової системи. Порівняно зі звичайними мишами БМ миші мають вищі показники синтезу та деградації нейромедіаторів дофаміну, норадреналіну та серотоніну в мозку. Серотонін, що виробляється в ЦНС, бере участь у настрої, апетиті, сні, навчанні та пам'яті.

Ще один механізм впливу мікробіому на ЦНС функціонує завдяки прямому контакту мікроорганізмів кишківника з мережею нервів, які вистиляють шлунково-кишковий тракт і з'єднані з ЦНС через блукаючий нерв (рис. 18.9). Кишкові бактерії безпосередньо стимулюють нейрони кишкової нервової системи, які потім зв'язуються з блукаючим нервом. Блукаючий нерв, у свою чергу, передає сигнали в мозок. Блукаючий нерв може диференціювати подразники представників нормальної мікробіоти та патогенів навіть за відсутності запалення.

Нарешті, розчинні мікробні метаболіти кишкових мікроорганізмів (н. п., КЛЖК), які утворюються при розкладанні клітковини, що надходить з їжею, можуть впливати на ЦНС, що показано в дослідах з бутиратом на БМ мишах. Разом з тим мікробіом може опосередковувати нейродегенеративні захворювання, такі як хвороби Паркінсона та Альцгеймера.

Дієта та здоровий кишківник. Дієта є критично важливим чинником гомеостазу. Зокрема, коротколанцюгові жирні кислоти (КЛЖК), насамперед, бутират, пропіонат і ацетат, що утворюються шляхом ферментації клітковини кишковою мікробіотою, відіграють центральну роль у розвитку та підтримці здорового кишківника. КЛЖК не тільки є важливим джерелом енергії для кишкових клітин, але вони також функціонують як сигнальні молекули для регулювання клітинного метаболізму та імунного нагляду.

Зв'язування КЛЖК зі специфічними рецепторами поверхні клітин кишківника регулює клітинний метаболізм, збільшує секрецію антимікробних пептидів, відомих як дефензини, підвищує вироблення гормонів, що впливають на відновлення енергії та відчуття голоду, а також має пригнічувальну дію на запальний процес через сигнальну систему регуляторних Т-клітин.

Серед КЛЖК бутират, зокрема, виконує критичну функцію в контролі імунного нагляду та метаболізму колоноцитів, що є абсорбційними епітеліальними клітинами товстої кишки. Бутират активує специфічний регуляторний білок колоноцитів, що прискорює мітохондріальне бета-окиснення жирних кислот. Цей процес споживання кисню допомагає підтримувати безкисневе середовище поблизу поверхні епітелію, сприятливе для облігатно анаеробних бактерій, які виробляють бутират.

Якщо мікроорганізми, що продукують бутират, пригнічуються, наприклад, різкою зміною дієти або в результаті лікування антибіотиками, метаболізм колоноцитів зміщується в бік ферментації глюкози та зниження споживання кисню. Це призводить до більшого проходження кисню через

поверхню слизової оболонки кишківника та розмноженню факультативно аеробних бактерій родини *Enterobacteriaceae*, які можуть викликати запальну реакцію.

Оскільки передача сигналу КЛЖК також сприяє утворенню щільного сполучення клітин епітелію, вважається, що пригнічення активності специфічного регуляторного білка сприяє розвитку синдрому негерметичної кишки у людей. Порушення щільності сполучень клітин епітелію призводить до зростання негативного впливу мікробіоти кишківника, що викликає запальну реакцію.

Таке порушення здорової функції кишківника називається дисбіозом (дисбактеріозом), характерною ознакою якого є збільшення кількості бактерій родини *Enterobacteriaceae* та хронічне запалення.

18.7. Дисбіоз

Природна мікробіота тіла є одним із перших бар'єрів, що забезпечують неспецифічну резистентність та гомеостаз внутрішнього середовища організму. Еубіоз (нормобіоз) характеризується стабільним складом мікробіоценозів та повним обсягом їх фізіологічних функцій. Стан еубіозу є проявом гармонійного симбіозу макроорганізму та його природної мікробіоти, що відображає рухливу рівновагу між ними.

Дисбіоз характеризується відхиленнями у складі мікробного суспільства, що суттєво виходить за межі фізіологічної норми. У результаті порушується захисна та інші корисні функції нормальної мікробіоти, виникає загроза розвитку патологічних процесів. Важливим є розуміння факторів, що можуть порушити склад нормальної мікробіоти та стан еубіозу у здорової людини.

Нормальна мікробіота здорової людини відносно стабільна, однак стійкість мікробіоценозів насамперед залежить від стану біотопу, що є частиною організму, з яким інтегрована мікробіота. Мікробіота новонародженої дитини, немовляти, людини похилого віку, хворого особливо чутлива до дії ушкоджуючих агентів.

У ранньому віці формуванню здорової природної мікробіоти перешкоджає патологія під час пологів, патологія центральної нервової системи у післяпологовому періоді, респіраторна інфекція, штучне вигодовування, харчова алергізація, раннє переведення на штучне вигодовування.

Найбільш важливими факторами, які здатні порушити склад нормобіоти є:

1) застосування антибіотиків, гормонів, імунодепресантів, променевої терапії;

2) хірургічні операції, особливо на органах шлунково-кишкового тракту;

3) тривалий вплив несприятливих екологічних факторів;

4) гострі кишкові інфекції, різні хронічні захворювання шлунка, кишківника та печінки;

5) нервово-психічний стрес;

6) голодування, нераціональне харчування, авітаміноз.

Антибактеріальні препарати впливають на стан мікробіоти організму безпосередньо (первинний дисбіоз). Інші чинники, вражаючи макроорганізм, погіршують умови для розвитку нормобіоти в біотопах (вторинний дисбіоз). При цьому виникає дефіцит захисної мікробіоти.

Внаслідок зниження колонізаційної резистентності біотопу створюються сприятливі умови приживлення екзогенної патогенної мікробіоти. Відбувається також надмірне розмноження «опортуністичної» фракції мікробіоценозу з умовно-патогенним потенціалом. Її мирне співіснування з організмом хазяїна припиняється щойно виникають відповідні умови для розмноження та колонізації. При глибокому дисбіозі опортуністичні мікроорганізми з місць свого звичайного проживання поширюються в невластиві їм біотопи, стерильні органи і тканини та відіграють важливу роль у розвитку запальних захворювань кишечника та ожиріння.

Важається, що порушення складу нормального мікробіому можуть бути повя’зані з розвитком різноманітних захворювань (рис.18.10), таких як аутоімунні захворювання, астма та алергії, запальні захворювання кишківника та різноманітні неврологічні стани. Із них метаболічний синдром, серцево-судинні захворювання та рак разом спричиняють більшість захворювань і смертей у промислово розвинених країнах світу.

Рис. 18.10. Дисбіоз призводить до різноманітних захворювань, що супроводжуються запаленням

Метаболічний синдром. Метаболічний синдром – це стан організму, що характеризується: великою окружністю талії, високим рівнем тригліцеридів у крові, високим кров'яним тиском, а також підвищеним рівнем ліпопротеїнів низької щільності та рівнем глюкози в крові. Патофізіологія метаболічного синдрому включає резистентність до інсуліну, тобто нездатність клітин організму належним чином засвоювати інсулін із кровотоку. Метаболічний синдром також підвищує ризик інсульту та серцевих захворювань і став глобальною епідемією.

Метаболічний синдром і ожиріння пов'язані хронічним запаленням низького рівня та змінами у мікробіомі, спричиненими дієтою, що призводить до обмеженого мікробного різноманіття та дисбіозу.

Дисбіоз у свою чергу призводить до підвищення проникності герметичних сполучень між колоноцитами, що робить слизовий бар'єр «негерметичним». Це дозволяє ліпополісахаридам (ЛПС), які відшаровуються від грамнегативних бактерій, коли вони ростуть, порушувати бар'єр слизової оболонки. Фактично рівні ЛПС у крові людей з ожирінням можуть бути в два-три рази вищими ніж у худих людей. ЛПС є дуже потужними імуномодулюючими молекулами, які при виявленні імунними та іншими клітинами, включаючи адипоцити (жирові клітини), легко стимулюють вивільнення прозапальних цитокінів, що може призводити до хронічного запалення низького рівня, яке характеризує ожиріння та метаболічний синдром.

Крім того, ЛПС у печінці сприяють резистентності до інсуліну, накопиченню тригліцеридів і розвитку хвороби жирової печінки. ЛПС у крові також індукують експресію прозапальних і адгезивних молекул клітинами, які вистилають кровоносні судини, сприяючи розвитку серцево-судинних захворювань через атеросклероз, що характеризується накопиченням жиру, холестерину, кальцію та інших сполук на внутрішній стороні кровоносних судин.

Зміни в складі мікробіому при дисбактеріозі призводять до збільшення виробництва ацетату та зменшення бутирату. Це відповідно зменшує позитивний вплив бутирату на імунну систему, а високий рівень ацетату сприяє виробленню гормону греліну, який стимулює апетит.

Серцево-судинні захворювання. Серцево-судинні захворювання та метаболічний синдром пов'язані загальною ознакою наявності атеросклерозу. Стереотипна дієта людини з серцево-судинними захворюванням це – багато червоного м'яса та продуктів з високим вмістом жиру. В результаті кишкові мікроорганізми отримують мало клітковини, і виробляють мало протизапальних КЛЖК.

Така дієта сприяє росту мікробної популяції «м'ясоїдних» бактерій, які стикаються з високими рівнями амінокислоти L-карнітину, якої багато в червоному м'ясі, і фосфатидилхоліну, якого багато в сирі, морепродуктах, яйцях і м'ясі. Мікробний метаболізм L-карнітину і фосфатидилхоліну при-

зводить до виробництва триметиламіну (ТМА). Після того як ТМА всмоктується в кровотік, він потрапляє в печінку, де ферментативно окиснюється клітинами печінки до триметиламін-N-оксиду (ТМАО), який, як показано в дослідах на мишах, прискорює розвиток атеросклерозу.

Рак. Взаємозв'язок між мікробіомом і раком особливо важливий і складний. Мікроорганізми як фактори виникнення раку беруть участь приблизно в 20% всіх злоякісних новоутворень. Відомо кілька механізмів, за допомогою яких мікроорганізми можуть викликати або сприяти розвитку раку у людей.

Деякі бактерії можуть прямо чи опосередковано спричиняти пошкодження ДНК. Наприклад, деякі штами *E. coli* мають геномний острівець, який відповідає за синтез колібактину, що здатний пошкоджувати ДНК. Поглинутий кишковими клітинами, колібактин призводить до дволанцюгових розривів ДНК. Бактерії *E. coli*, що виявлені при колоректальному раку людини продукують колібактин, який в досліді стимулює формування кишкової пухлини у мишей.

Більш непрямий підхід до пошкодження ДНК виявляють бактерії *Bacteroides fragilis*, які продукують ентеротоксин і виділяють металопротеазу, що стимулює виробництво високих рівнів активних форм кисню клітинами-хазяїна, які, у свою чергу, є канцерогенними.

Бактерії деяких штамів *Helicobacter pylori*, які викликають виразку шлунка, здатні виробляти білок CagA. Цей білок поглинається клітинами шлунка та призводить до посилення регуляції генів, що контролюють проліферацію клітин шлунка, виживання, міграцію та формування кровоносних судин, необхідних для утворення пухлини.

Крім спричинення первинного пухлиногенезу, фузобактерії та споріднені види мікробіому можуть брати участь у метастазуванні пухлин.

Хронічне запалення низького рівня, спровоковане ожирінням і метаболічною ендотоксемією, пов'язують з підвищеним ризиком розвитку різних видів раку. Епідеміологічні дослідження виявляють, що деякі види раку, для яких люди з ожирінням піддаються більшому ризику, включають рак стравоходу, печінки, нирок, підшлункової залози, колоректальний рак, рак ендометрія, молочної залози, яєчників і щитовидної залози.

Запальні захворювання кишківника (ЗЗК) — це група хронічних захворювань, які характеризуються деструктивним неспецифічним імунним запаленням стінки кишківника. До основних форм належать: хвороба Крона (ХК) та неспецифічний виразковий коліт (ВК). Постійне запалення призводить до прогресуючого ураження травного тракту, що може спричинити серйозні ускладнення, які загрожують життю. Від хвороби Крона та виразкового коліту страждають близько 5 млн людей у всьому світі. Останніми десятиріччями запальні захворювання кишківника все частіше зустрічаються у дітей.

Хвороба Крона – це хронічне захворювання, при якому відбувається запалення будь-якого відділу травного тракту, але найчастіше вражається клубова кишка та проксимальний відділ товстої кишки. Ця хвороба характеризується запаленням, що може призвести до мікроперфорацій кишки та утворення свищів. Виразковий коліт – це запалення суто товстого кишківника, окремих його ділянок або всієї кишки.

ЗЗК виникають через порушення імунної відповіді на кишкові бактерії та продукти їх метаболізму. При цьому спостерігаються зміни як у складі, так і в функції кишкової мікробіоти.

18.8. Корекція складу мікробіоти кишківника

Всесвітня організація охорони здоров'я (ФАО-ВООЗ) визначила, що пробіотики – це «живі мікроорганізми, які при введенні в адекватних кількостях приносять користь для здоров'я».

Пробіотики. В якості пробіотичних найбільш часто використовують бактерії родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus*. Відповідно до рекомендацій ФАО-ВООЗ пробіотики віднесені до категорії харчових продуктів та харчових добавок, які рекомендуються для отримання користі для здоров'я. У подальшому передбачається перевести їх в категорію продуктів, що складаються з мікроорганізмів, які використовуються для лікування конкретного стану.

Хоча набагато важче контролювати однорідність та ефективність мікробного продукту, ніж препарату з унікальною хімічною структурою, визнання того, що мікробіом, по суті, є нещодавно відкритим органом, необхідним для гомеостаза людини, стимулює розвиток розробки та виробництва пробіотиків для профілактичної медицини.

Поки дослідники, фармацевтичні компанії та регулюючі органи узгоджують свій підхід до пробіотиків, як до ліків, вони успішно застосовуються в тваринництві та птахівництві.

Наприклад, використання *Lactobacillus acidophilus* в кормах для великої рогатої худоби на 60% зменшує носійство патогенного штаму *E. coli* O157:H7. Пробіотичні бактерії *Bacillus subtilis* збільшують масу тіла домашньої птиці та зменшують вміст коліформ і кампілобактерій в оброблених тушках. Різні пробіотичні мікроорганізми широко використовуються в птахівництві проти сальмонельозної інфекції.

Молекулярний аналіз інфекцій, спричинених *Clostridioides difficile*, підкреслив важливість розуміння механізмів для розробка ефективної пробіотикотерапії. Показано, що бактерії *C. scindens* є ефективним пробіотиком, який пригнічує ріст *C. difficile*, що пов'язано зі здатністю перетворювати холеву кислоту в дезоксихолеву кислоту, яка є інгібітором росту *C. difficile*. У аналогічних дослідженнях одужання від діареї, спричиненої *Vibrio cholerae* асоціюється з підвищеною чисельністю бактерій

Ruminococcus obeum, які виробляють аутоіндуктор (AI-2) кворум сенсингу, що пригнічує експресію факторів колонізації *V. cholerae* та ефективно запобігає інфікуванню холерним вібріоном.

Бактерії штаму *Bacillus* запобігають колонізації патогенним золотистим стафілококом, перешкоджаючи сигнальній системі кворум сенсингу *S. aureus*, що зрештою запобігає транскрипції генів, які кодують вірулентність, тому можуть застосовуватись як ефективний пробіотик для усунення кишкової та носової колонізації *S. aureus*.

Пробіотичні бактерій *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* показали ефективність у зниженні частоти некротичного ентероколіту (НЕК), важкого запального ураження кишківника недоношених новонароджених з низькою вагою, що дало підстави вважати НЕК різновидом дисбактеріозу з порушенням нормальної послідовності колонізації кишківника.

Відкриття того, що багато так званих пробіотичних мікроорганізмів не ефективно колонізують кишківник, призвело до розробки *синбіотиків* – харчових продуктів або добавок, які містять як пробіотик, так і пребіотик.

Пребіотики. Пребіотик – це сполука(и), додана для посилення колонізації та позитивних переваг пробіотичних мікроорганізмів для здоров'я людини.

Пребіотики не слід плутати з пробіотиками. Пребіотики – це, зазвичай, вуглеводи, які не засвоюються але є чудовим джерелом вуглецю та енергії для певних кишкових бактерій. Вважається, що фруктоолігосахариди, полімери фруктози, присутні в багатьох овочах, стимулюють бажані кишкові мікроорганізми. Так, основним пребіотиком вважається складний полісахарид інулін.

Синбіотики. Синбіотик – це комплексний препарат на основі пробіотика у поєднанні з пребіотиком, тобто живі корисні мікроорганізми з субстратом для них. Пребіотик додається в пробіотик для сприяння росту та колонізації пробіотичного мікроорганізму. Наприклад, синбіотик, що містить *Lactobacillus plantarum* і фруктоолігосахарид, який перорально дають новонародженим, знижує ризик смерті від сепсису на 40%.

Прийом пробіотиків з харчовими продуктами, має обмежену терапевтичну цінність, тому були розроблені більш ефективні методи трансплантації фекальної кишкової мікробіоти.

Фекальна трансплантація. Метою фекальної трансплантації є відновлення нормальної мікробіоти кишківника людини з кишковим захворюванням бактеріального походження, а також формування трансплантованого мікробного співтовариства та виключення хвороботворних мікроорганізмів.

Показано, що частка пацієнтів, яких вилікували за допомогою фекальної трансплантації від інфекції *C. difficile*, становить майже 90%, в той час як за стандартного лікування антибіотиками – лише приблизно 25%.

Фекальні трансплантації можуть полегшити деякі форми метаболічного синдрому. У пацієнтів з метаболічним синдромом, які отримували фекальну трансплантацію від худого донора, було виявлено підвищення фекальних рівнів бутирату, більшу загальну мікробну різноманітність кишківника та збільшення кількості кишкової бактерії *Roseburia intestinalis*, яка вважається корисним мікроорганізмом завдяки продукції бутирату.

Досягнуті в останні роки успіхи цілеспрямованої корекції кишкового співтовариства з використанням пробіотиків і пребіотиків та фекальної трансплантації демонструють обнадійливі перспективи лікування хвороб, повязаних з дисбактеріозами кишківника та покращення здоров'я.

Питання для самостійного контролю

1. Охарактеризуйте біотопи тіла людини, в яких мешкають мікроорганізми нормальної мікробіоти.
2. Опишіть функції нормальної мікробіоти.
3. Наведіть відмінності складу мікробіоти різних відділів шлунково-кишкового тракту.
4. Які основні ділянки тіла найбільше колонізують мікроорганізми?
5. Чому може бути корисним знання нашого мікробіому та його функціонування?
6. Яка роль мікробіому кішківника в підтриманні гомеостазу організму людини?
7. Як коротколанцюгові жирні кислоти (бутират, пропіонат та ацетат) впливають на метаболізм людини?
8. Охарактеризуйте мікроорганізми, які переважають у ротовій порожнині дорослої людини та їх метаболічні потреби.
9. Як нормальна мікробіота кішківника активує імунну систему?
10. Чому нижні дихальні шляхи зазвичай вільні від мікробів?
11. Яке значення вагінальних лактобацил для здорової дорослої жінки?
12. Порівняйте популяції мікроорганізмів у трьох основних мікросередовищах шкіри.
13. Опишіть властивості мікроорганізмів, які добре ростуть на шкірі.
14. Які фактори сприяють ранній колонізації кишковою спільнотою новонароджених?
15. Який(і) фактор(и) є найважливішим у переході від незрілого мікробного співтовариства кишківника до зрілого?
16. Що таке дисбіоз?
17. Які підходи використовують для корекції складу мікробіоти кишківника?
18. Що таке пробіотик? Чим він відрізняється від пребіотика та синбіотика?

РОЗДІЛ 19
ПАТОГЕННІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ

19.1. Інфекційні хвороби

Інфекційні хвороби – це розлади здоров'я людей, що спричинені мікроорганізмами-збудниками та продуктами їх життєдіяльності, які передаються від інфікованих осіб здоровим і здатні до масового поширення. Інфекційні хвороби, що характеризуються тяжкими та стійкими розладами здоров'я, становлять небезпеку для життя та здоров'я, відносяться до небезпечних інфекційних хвороб. Особливо небезпечні інфекційні хвороби – це хвороби (у тому числі карантинні: чума, холера, жовта лихоманка), що характеризуються тяжкими та стійкими розладами здоров'я, високим рівнем смертності, швидким поширенням цих хвороб серед населення.

Будь-який мікроорганізм, який є збудником захворювання, іменується як патоген, а його здатність викликати захворювання – *патогенністю*. *Вірулентність* – це ступінь патогенності або шкоди, заподіяної збудником хазяїну. Навіть представники нормальної мікробіоти, наприклад, пов'язані з кишківником або шкірою, можуть стати умовно-патогенними мікроорганізмами, якщо вони за певних умов інфікують хазяїна.

Щоб викликати захворювання, мікроорганізм повинен не тільки контактувати з хазяїном, але й мати можливість виживати в ньому. Бактерії, протисти, гриби та віруси потребують відповідного середовища, у якому вони можуть рости та розмножуватися. Збудник повинен бути забезпечений хазяїном необхідними факторами – температурою, pH, вологістю, киснем (або його відсутністю) тощо.

Мікроорганізми вважають позаклітинними патогенами, якщо вони залишаються в тканинах і рідинах, але не потрапляють у клітини хазяїна під час перебігу захворювання. Наприклад, деякі бактерії та гриби можуть активно рости і розмножуватися в крові або в міжклітинному просторі. *Yersinia pestis*, що викликає чуму, є хороший приклад надзвичайно вірулентного позаклітинного патогену.

Мікроорганізми, які ростуть і розмножуються в клітинах хазяїна, називаються внутрішньоклітинними збудниками. Факультативні внутрішньоклітинні збудники можуть знаходитись в клітинах хазяїна або в навколишньому середовищі, але можуть рости також в чистій культурі без підтримки клітин хазяїна. *Brucella abortus* – це бактерія, яка росте та розмножується в макрофагах, нейтрофілах і клітинах, що оточують ембріон, а *Histoplasma capsulatum* – гриб, який росте всередині фагоцитів, але обидва збудники можна культивувати *in vitro*.

На відміну від них, облігатні внутрішньоклітинні патогени не здатні до росту та розмноження поза клітиною-хазяїном. За визначенням, усі віруси є облігатними внутрішньоклітинними патогенами, оскільки для реплікації їм потрібна клітина-хазяїн. Деякі бактерії також є облігатними

внутрішньоклітинними збудниками, такі як хламідії та рикетсії, що викликають такі захворювання як плямиста лихоманка Скелястих гір і тиф. Ці бактерії неможливо виростити в лабораторії поза клітинами-хазяїна. Малярійний паразит є прикладом найпростіших, які потребують клітин хазяїна для росту та диференціювання.

Клінічно перебіг інфекційного захворювання зазвичай має характерну картину та може бути розділений на декілька фаз. Інкубаційний період – це час між проникненням збудника та розвитком ознак і симптомів. Збудник розмножується, але не досяг достатнього рівня, щоб викликати клінічні прояви. Тривалість цього періоду залежить від збудника. Далі настає продромальна стадія з появою ознак і симптомів, які ще недостатньо специфічні, щоб поставити чіткий діагноз. Після цього настає період, коли хвороба протікає найважче і проявляє характерні ознаки та симптоми. На цьому етапі, зазвичай, запускається імунна відповідь хазяїна. Нарешті, під час періоду одужання, ознаки та симптоми починають зникати. Це стадія одужання – реконвалесценції.

Інфекційні захворювання не виявляються доки різні фізичні та/або фізіологічні події не попередять хазяїна про вторгнення збудника. Ці захворювання часто мають характерні ознаки, які можна безпосередньо спостерігати (лихоманка або висип) та симптоми – суб'єктивні зміни, такі як біль і втрата апетиту.

Щоб збудник заразив хазяїна та згодом спричинив захворювання, мають відбутися певні події. По-перше, мікроорганізм має бути перенесений від попереднього хазяїна або резервуара та потрапити до нового хазяїна. Певні фактори впливають на успіх цього процесу: вірулентність мікроорганізму, кількість мікроорганізмів-збудників, а також наявність у них факторів адгезії та інвазії. По-друге, збудник повинен бути в змозі випередити резидентну мікробіоту в змаганні за ресурси та вижити під натиском захисних механізмів хазяїна, виробляючи різноманітні молекули (наприклад, антифагоцитарні фактори) як засіб контратаки. По-третє, хвороба виникає, коли мікроорганізм або виробляє молекули, які безпосередньо пошкоджують клітини хазяїна, стимулює імунні клітини знищувати інфіковану тканину, або змінює геном клітин-хазяїна, що впливає на нормальне його функціонування.

19.2. Перенесення та проникнення збудника до хазяїна

Перш ніж збудник зможе викликати захворювання він повинен вступити в контакт з організмом хазяїна. Збудники переносяться з джерела інфекції прямо чи опосередковано через проміжного агента. *Джерело інфекції* – це носії збудника (хворі люди, тварини, рослини, неживі об'єкти), від яких патоген тим чи іншим шляхом передається до хазяїна. *Період інфекційності* – це час, впродовж якого джерело (наприклад, людина або забруднена вода) поширює патоген.

Резервуар – це природне місце навколишнього середовища, в якому зазвичай мешкає збудник, з якого джерело отримує патоген або де може відбутися пряме зараження хазяїна. Таким чином, резервуар іноді виконує роль джерела, що може бути живим або неживим. Наприклад, резервуаром збудника лептоспірозу є хворі та перехворілі тварини, які виділяють лептоспіри із організму в навколишнє середовище з сечею, фекаліями, молоком, а також виділеннями з легенів і статевих органів. Заражена питна вода є резервуаром *Vibrio cholerae*.

При передачі збудників інфекцій від тварин до людини захворювання, що виникають, називаються *зоонозами*. Таким чином тварини можуть служити резервуарами, наприклад, коли скажена собака передає вірус сказу, кусаючи людину. Крім того, укуси членистоногих переносників, таких як комарі, кліщі, блохи, кусаючі мухи, можуть призвести до інфекції (наприклад, малярія, хвороба Лайма, чума).

Перенесення збудника є критичним етапом інфекційного процесу. Це відбувається прямо або опосередковано основними шляхами (рис. 19.1):

– фекально-оральний – збудники виділяються з випорожненнями та сечею хворих і можуть потрапляти аліментарним шляхом (через рот) при використанні інфікованої їжі або води;

– повітряно-краплинний або повітряно-пиловий – мікроорганізми переносяться в організм хазяїна аерозольним способом;

– контактний – зараження відбувається шляхом прямого контакту з хворим чи носієм, а також непрямим контактом через забруднені предмети побуту;

– транспортний (парентеральний) шлях зараження, характерний для передачі інфекції через нестерильне медичне обладнання, ін’єкції, хірургічні операції, переливання крові тощо;

– трансмісивний – це шлях передачі збудника через укуси кровосисних комах (іксодових, гамазови та червонотілкових кліщів, комарів, москитів тощо;

– вертикальний шлях передачі спостерігається при зараженні плоду від матері через плаценту, а також під час пологів та відразу після них.

Натомість збудник також повинен контактувати з відповідною для нього тканиною хазяїна. Наприклад, риновіруси передаються повітряно-краплинним шляхом від одного хазяїна до іншого. Як тільки вірус вступає в контакт з епітелієм верхніх дихальних шляхів, він проникає та викликає захворювання лише у верхніх дихальних шляхах, і не інфікує будь-які інші типи клітин хазяїна. Ця специфіка називається *тропізмом*. Багато збудників виявляють специфічність до певних клітин, тканин і органів. Тропізм збудника зазвичай відображає наявність специфічних рецепторів на поверхні клітини-хазяїна необхідних для цього мікроорганізму.

Рис. 19.1. Шляхи передачі збудника інфекційної хвороби

При фекально-оральному шляху передачі інфекції патогени, що містяться у випорожненнях одного хазяїна чи джерела інфекції, потрапляють до травної системи іншого хазяїна через рот. У природі як правило патогени потраплять до води та харчових продуктів, а потім – до людини. Іноді від заражених фекалій до харчових продуктів патогенів переносять мухи, таргани тощо.

Повітряно-крапельний шлях. Оскільки повітря не є придатним середовищем для росту патогенів, будь-який патоген, який передається повітрям, повинен походити з такого джерела як люди, тварини, рослини, ґрунт, їжа або вода. При передачі повітряно-крапельним шляхом збудник завислий у повітрі у вигляді крапель або пилу переноситься до хазяїна.

Краплі утворюються зі слини, слизу та інших рідин організму та можуть мати діаметр до 2 мм. Через свій розмір краплі вимагають близької відстані для передачі між хазяїном і тим, кому безпосередньо передаються (менше одного метра). Ядра крапель – це менші частинки діаметром від 1 до 5 мкм, що утворюються в результаті випаровування більших крапель. На відміну від крапель, набагато менші ядра крапель можуть залишатися в повітрі впродовж годин або днів і переноситись на великі відстані.

Контактний шлях. Контактна передача передбачає дотик хазяїна до джерела (або резервуара) збудника. Контакт може бути прямим і непрямим. Прямий контакт передбачає реальну фізичну взаємодію з джерелом інфекції. Цей шлях часто називають особистим контактом. Передача від людини до людини відбувається переважно через дотик, поцілунок або статевий контакт.

Транспортний шлях. Неживі матеріали, які опосередковано переносять хвороботворні мікроорганізми, називають транспортними засобами

збудника. При передачі контактним шляхом транспортний засіб, часто, поширює збудник до кількох хазяїнів. Приклади таких транспортерів включають хірургічні інструменти, посуд, стетоскопи, постільну білизну, столові предмети, одяг та інше. Біологічні матеріали (рідини та тканини) є важливими загальними переносниками багатьох захворювань людини, крім того, вони можуть підтримувати розмноження патогенів.

Векторний шлях. Безпосередні живі носії трансмісивного збудника хвороби називаються переносниками або векторами. Більшість переносників – це членистоногі (н. п., комахи, кліщі, блохи) або хребетні (н. п., собаки, коти, кажани). Передача через вектор часто забезпечує патогену також розмноження та поширення всередині вектора. Якщо кількість збудника дуже велика у хазяїна, то переносник, наприклад, кусаюча комаха, має більше можливості отримати збудника та передати його новому хазяїну.

Вертикальна передача. Пряма передача хвороботворних мікроорганізмів відбувається не лише через горизонтальне перенесення від людини до людини, а й через вертикальний шлях. Вертикальна передача патогенів відбувається, коли ненароджена дитина отримує збудник від інфікованої матері. Хоча вертикальна передача відбувається не так часто, як горизонтальна, деякі мікроорганізми переносяться цим шляхом. Прикладами вроджених інфекцій є гонорея, сифіліс, герпес, кір, токсоплазмоз.

Інфікуюча доза – це найменша кількість патогена, яка може викликати розвиток інфекції в організмі, чутливому до цього патогена.

Швидкість розвитку інфекції (н. п., час інкубаційного періоду та продромальної стадії) та її важкість залежать від початкового інокулята мікроорганізму та його вірулентності. Деякі збудники достатньо вправні в проникненні в організм хазяїна, тому для інфікування потрібно лише небагато мікроорганізмів, навпаки, іншим для зараження потрібна велика кількість збудника. Інфікуючу дозу 50 (ІД50) вимірюють експериментально та визначають як кількість мікроорганізмів, що необхідна для того, щоб викликати захворювання у 50% експериментально щеплених хазяїв. Одним із прикладів цього є пероральна передача *Salmonella* spp., що виділяється з фекаліями інфікованих хазяїв і часто забруднює руки. ІД50 для *Salmonella* spp. в зараженій їжі становить приблизно 1×10^5 бактерій. Загалом, чим нижча інфекційна доза (тобто чим менше мікроорганізмів необхідно для інфікування), тим вищий ризик інфікування.

Іншим показником інфекційності та, отже, й вірулентності є експериментальне визначення кількості мікроорганізмів, необхідних для того, щоб бути летальними для хазяїна – летальна доза 50 (ЛД50) – доза або кількість патогенів, які вбивають 50% експериментальної групи хазяїв протягом визначеного періоду. Важливо відзначити, що рівень ІД50 і ЛД50 для деяких мікроорганізмів також може залежати від чутливості хазяїна та його імунної системи.

Після того, як збудник був перенесений із резервуару або джерела сприйнятливому хазяїну в достатній кількості, доступ до хазяїна отримується через відповідні входи: шкіра, дихальна система, шлунково-кишкова система, сечостатева система або кон'юнктива ока.

19.3. Фактори патогенності бактерій та їх характеристика

До факторів патогенності мікроорганізмів належить комплекс ознак, за допомогою яких бактерії реалізують свій генотип в організмі хазяїна: адгезивність (здатність прикріплюватися до клітин хазяїна), інвазивність (здатність проникати в організм і там розмножуватися), токсигенність (здатність продукувати токсини) та резистентність (здатність чинити опір імунній системі хазяїна).

Адгезія. Спочатку процесу інфекційного захворювання після проникнення мікроорганізм прикріплюється до клітини-мішені. Необхідність прикріпитися (адгезія) до клітини-хазяїна, вторгнутися в підлеглі тканини та колонізувати їх є основною умовою, яку має виконати потенційний патоген. Для цього поверхня клітини збудника часто містить молекули-адгезини, як правило це білки (або глікопротеїни), що зв'язані з пептидогліканом. Їх унікальна будова, властива певним видам збудників, обумовлює високу специфічність адгезії. Цим пояснюється здатність одних мікроорганізмів прикріплюватися та колонізувати переважно епітелій дихальних шляхів, інших – кишкового тракту, третіх – сечовидільної системи тощо.

Адгезини багатьох грамнегативних бактерій пов'язані з пілями різних типів (рис. 19.2). Їх позначають номерами, символами пілей або колонізуючих факторів, які вони містять. Наприклад, пілі I типу виявлені у багатьох бактерій, пілі IV типу – у протея, P-пілі – у деяких ентеробактерій (табл. 19.1).

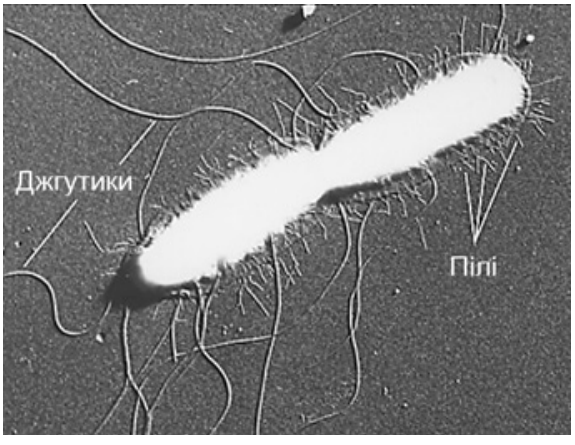


Рис. 19.2. Електронна мікрофотографія клітин *Salmonella enterica* (typhi) з численними пілями

Таблиця 19.1

Приклади адгезинів і рецепторів

Мікроорганізм	Хвороба	Адгезин збудника	Рецептор хазяїна
Neisseria gonorrheae	Гонорея	Пілі IV типу	Маноза на епітелії уретри
Escherichia coli	Діарея	Пілі I типу	Залишки цукру на кишковому епітелії
Escherichia coli	Гемолітико-уремічний синдром	P-пілі	Залишок цукру на ниркових клітинах
Escherichia coli	Інфекція сечовивідних шляхів	P-пілі	Залишки цукру на епітелії уретри
Treponema pallidum	Сифіліс	Мембранні білки	Фібронектин на клітинах слизової оболонки
Mycoplasma pneumoniae	Пневмонія	Мембранні білки	Сіалова кислота на клітинах легень
Streptococcus pyogenes	Біль у горлі	Білок F	Фібронектин на клітинах верхніх дихальних шляхів
Streptococcus mutans	Зубний карієс	Залишки цукру	Глікопротеїн слини на зубі
Вірус грипу	Грип	Гемаглютинін	Білковий залишок на клітинах верхніх дихальних шляхів
HIV-1	СНІД	Білок gp120	Рецептор CD4 на Т-клітинах
Вірус поліомієліту	Поліомієліт	Білок капсиду VP1	Білок CD 155 на кишкових і нервових клітинах

Адгезивну функцію у грамнегативних бактерій виконує капсула та слизова оболонка (рис. 19.3), білки зовнішньої мембрани клітинної стінки. У грампозитивних бактерій ця функція пов'язана з тейхоєвими і ліпотейхоєвими кислотами клітинної стінки, капсулою та слизовою оболонкою. Утворені з екзополісахаридів глікани та левани забезпечують здатність оральних стрептококів прилипати до гладких поверхонь, наприклад, зубної емалі та до ендопротезів.

Рецептори клітин людини також неоднорідні за своїм складом. Їх поділяють на нативні, індуковані та набуті. Нативні рецептори розташовуються на епітеліальних клітинах та беруть участь у адгезії відповідних бактерій. Індуковані рецептори утворюються лише після адсорбції вірусів (наприклад, вірусу грипу) на чутливих клітинах, після чого на них можуть адгезуватися стафілококи та інші бактерії. Це пояснюється тим, що рецеп-

тором для цих бактерій служить вірусний гемагглютинін, який вбудовується у цитоплазматичні мембрани епітеліальних клітин.

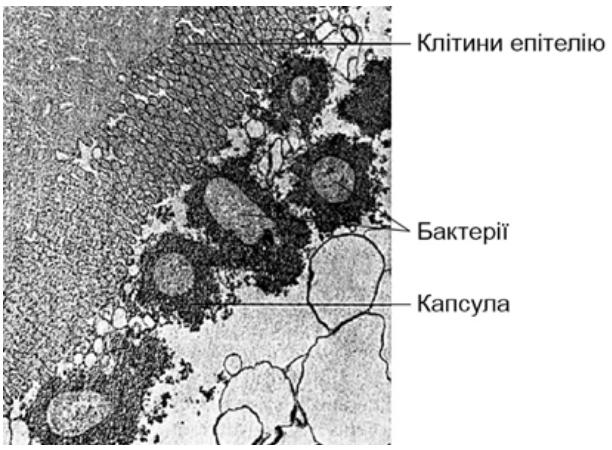


Рис. 19.3. Клітини ентеропатогенної *Escherichia coli,* прикріплені до клітин епітелію тонкої кишки

Після адгезії до клітин або тканин хазяїна збудник повинен мати можливість колонізувати їх. *Колонізація* – це розмноження збудника у місці адгезії, завдяки чому мікроорганізми накопичуються до такої кількості, що можуть спричинити розвиток патологічного процесу. Це не обов'язково призводить до інвазії або пошкодження тканин.

Інвазія. Патогенність мікроорганізмів може проявитися в інвазії, тобто проникненні через слизові та сполучнотканинні бар'єри в тканини та поширенні патогена. Потрапляючи під слизову оболонку або інший покрив, збудник може проникати в більш глибокі тканини і продовжувати поширюватися по всьому тілу хазяїна (рис. 19.4). Ця здатність повязана з продукцією мікроорганізмами ферментів, що сприяють поширенню збудника (табл. 19.2).

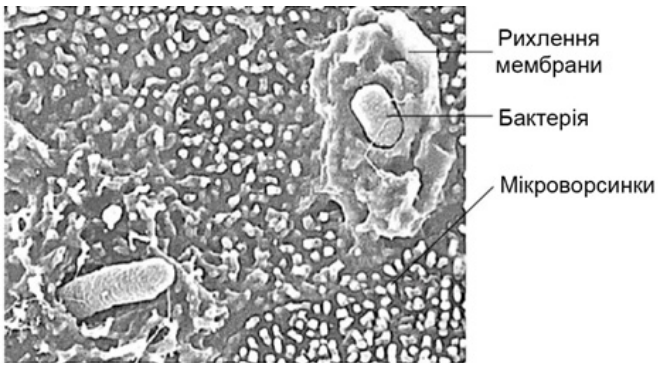


Рис. 19.4. Проникнення бактерій *Salmonella enterica ser. typhimurium*

Таблиця 19.2

Фактори патогенності бактерій, залучені до інвазії та поширення патогена

Фактор патогенності	Мікроорганізм	Механізм дії
1	2	3
Коагулаза	*Staphylococcus aureus*	Коагулює фібриноген у плазмі. Згусток захищає збудника від фагоцитозу та інших захисних механізмів хазяїна
Колагеназа	*Clostridium* spp.	Розщеплює колаген, який формує каркас сполучної тканини; дозволяє збуднику поширюватися
Дезоксирибонуклеаза	Стрептококи групи А, *Clostridium perfringens,* стафілококи	Знижує в'язкість ексудату, надаючи патогену більшу рухливість
Еластаза і лужна протеаза	*Pseudomonas aeruginosa*	Розщеплює ламінін, пов'язаний з базальними мембранами
Гемолізини	Стафілококи, стрептококи, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*	Лізують еритроцити та роблять залізо доступним для росту збудників
Гіалуронідаза	Стрептококи груп А, В, С та G, стафілококи, *Clostridium* spp.	Гідролізує гіалуронову кислоту, яка цементує клітини, та полегшує поширення збудника
Перекис водню (H_2O_2) та аміак (NH_3)	*Mycoplasma* spp. *Ureaplasma* spp.	Відходи метаболізму є токсичними та пошкоджують епітелій дихальної та сечостатевої систем
Протеаза, що діє на імуноглобулін А	*Streptococcus pneumoniae*	Розщеплює імуноглобулін А на фрагменти Fab і Fc
Лецитиназа або фосфоліпаза	*Clostridium* spp.	Гідролізує лецитин – компонент плазматичних мембран, що дозволяє патогену поширюватися
Лейкоцидини	Стафілококи, пневмококи, та інші стрептококи	Пороутворюючі екзотоксини, що вбивають лейкоцити, викликають дегрануляцію лізосом у лейкоцитах та знижують резистентність організму
Порини	*Salmonella enterica* serovar typhimurium	Пригнічують фагоцитоз лейкоцитів шляхом активації системи аденілатциклази

Продовження таблиці 19.2

1	2	3
Білок А Білок G	*Staphylococcus aureus* *Streptococcus pyogenes*	Розташовані на клітинній стінці. IgG зв'язується або з білками А, або G за допомогою свого Fc і, таким чином, запобігає взаємодії комплементу зі зв'язаним IgG
Пірогенний екзотоксин В (цистеїнова протеаза)	Стрептококи групи А (*Streptococcus pyogenes*)	Розщеплення білків
Стрептокіназа, стафілокіназа	Стрептококи групи А, С та G, *Staphylococcus aureus*	Білок, що зв'язується з плазміногеном і активує вироблення плазміну, що розщеплює фібринові згустки та дозволяє патогену переміститися з зони згустку

Ферменти інвазії також вважаються факторами вірулентності, оскільки вони сприяють розвитку інфекції. Патогени можуть проникати в малі кінцеві лімфатичні капіляри, які оточують епітеліальні клітини, а з часом у великі лімфатичні судини та кровоносну систему. Після чого мікрооганізми отримують доступ до всіх органів і систем хазяїна.

Наявність життєздатних бактерій у крові називається *бактеріємією*. Інфекційний хвороботворний процес, викликаний бактеріальними або грибковими токсинами в крові, називається *септицемією*. Зокрема, цю здатність пов’язують з продукцією такого ферменту як гіалуронідаза *Clostridium perfringens*, деяких бактерій родів *Streptococcus, Staphylococcus* та ін. Цей фермент специфічно розщеплює гіалуронову кислоту, що входить в склад клітинної речовини, тим самим підвищуючи проникність крізь слизові оболонки та сполучні тканини.

Нейрамінідазу продукують холерний вібріон та інші бактерії. За допомогою нейрамінідази збудники можуть перетинати не тільки слизову оболонку, але також проникати всередину клітин і розповсюджуватись у міжклітинному просторі.

Ступінь інвазії сильно варіює серед патогенів. Наприклад, *Clostridium tetani* (збудник правця) вважається неінвазивним, оскільки він не поширюється з однієї тканини на іншу, але його токсин потрапляє в кров, викликаючи таким чином захворювання. *Bacillus anthracis* (збудник сибірської виразки) і *Yersinia pestis* (збудник чуми) також виробляють токсини і одночасно є дуже інвазивними. Представники роду *Streptococcus* володіють спектром факторів патогенності, причому одні спричиняють запалення в горлі, а інші – серйозні інфекції шкіри та м’яких тканин («плотоїдні» інфекції).

Інший спосіб інвазії мають *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.* і *Rickettsia spp.* Ці бактерії активують формування актинового хвоста у клітини-хазяїна, який протягує бактерію через цитоплазму інфікованої клітини на її поверхню, де вона проштовхується через клітинну мембрану та утворює випячування, яке поглинається сусідньою клітиною. Таким чином бактерія потрапляє в сусідню клітину-хазяїна та поширюється по всій тканині. Гриб *Microsporidia spp.* використовує полярну трубочку для проникнення в клітину хазяїна, тоді як багато інших грибів – гідролітичні ферменти.

Пенетрація. Патогенні властивості збудників можуть проявитися в здатності деяких з них пенетрувати (проникати) в середину епітеліальних клітин, лейкоцитів або лімфоцитів (шигели, деякі ешерихії та ін.). Пенетрація починається після попадання бактерій у міжклітинний простір, де вони взаємодіють із мембранними білками клітини. Зв'язування з цими білками призводить до зміни конформації мікротрубочок і вп'ячування мембрани, в результаті чого бактерії виявляються всередині клітини.

Здатність бактерій розмножуватися всередині клітин пов'язана з їх стійкістю до лізосомальних ферментів та захисних білків, недостатнього вмісту кисню. Внутрішньоклітинні бактерії, що розмножуються, здатні проникати в сусідні клітини без виходу в навколишнє середовище. При цьому клітини руйнуються, що супроводжується порушенням цілісності епітеліального покриву відповідного органу і виникненням патологічного процесу.

19.4. Біоплівки забезпечують захист патогенних мікроорганізмів

Багато бактерій живуть у біоплівках – стабільних закріплених спільнотах, оточених гідратованою полімерною матрицею власного виробництва (рис. 19.5). Ці біоплівкові бактерії частково захищені від антимікроб-

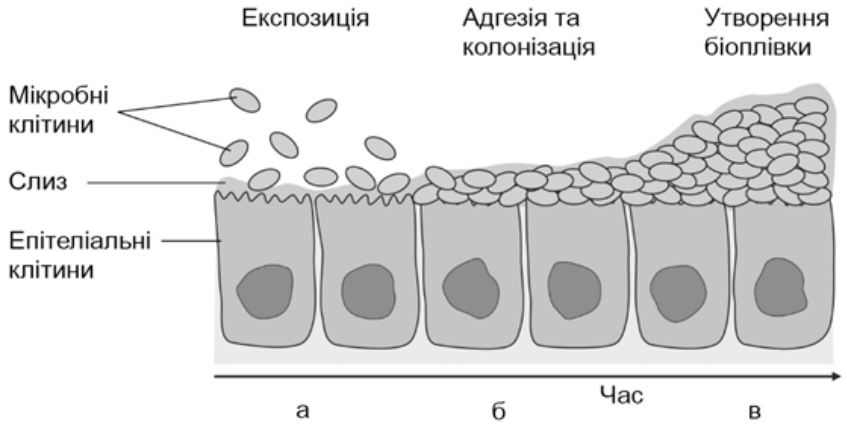


Рис. 19.5. Взаємодія бактерій зі слизовою оболонкою: (а) вільні клітини перед первинним контактом; (б) проникнення в слиз, що призводить до адгезії та колонізації; (в) подальша колонізація, що призводить до утворення біоплівки

них агентів та імунних клітин хазяїна. Біоплівкові бактерії експресують гени, які сприяють функціонуванню в прикріпленому стані. Бактерії в біоплівках обмінюються плазмідами, поживними речовинами та сигнальними молекулами, що контролюють кворум, змінюючи свою поведінку порівняно з планктонними формами.

Бактерії біоплівки координують експресію генів для посилення механізмів резистентності спільноти біоплівки до антибіотиків і захисних механізмів хазяїна. Наприклад, спільні комунікаційні сигнали бактерій *Pseudomonas aeruginosa* в біоплівці активують глобальні регуляторні механізми відповіді, які підвищують активність насосів ефлюксу (вилучення з клітини) кількох антибіотиків, посилюють реакції на голодування та стрес, стимулюють секрецію екзополісахаридів, підвищують стійкість до дії клітин хазяїна і замінюють бактерії, які чутливі до антибіотиків, на стійкі.

19.5. Резистентність до захисних механізмів хазяїна

Переважна більшість мікроорганізмів не викликають захворювання, частково тому, що їм протидіє нормальна мікробіота хазяїна або вони знищуються його імунною системою ще до початку інфекції.

Однак деякі мікроорганізми мають механізми, що дозволяють їм долати конкуренцію мікробіоти хазяїна та ухилятися від дії адаптивної імунної системи. Деякі патогени виробляють систему секреції VI типу (T6SS) – молекулярну нанозброю, яка доставляє летальні ефекторні молекули з цитоплазми до конкуруючого організму через прямий контакт. Ці системи секреції особливо ефективні у грамнегативних кишкових патогенів, для яких конкуренція за ресурси є особливо жорсткою.

Деякі мікроорганізми виживають і розмножуються в клітинах хазяїна. У деяких випадках вони живуть у тих самих клітинах, які повинні їх знищити. Інші організми протискуються між клітинами-хазяїнами, утворюють капсули, щоб уникнути фагоцитозу, занурюються в слиз і виділяють екзополісахариди, щоб сформувати спільний притулок всередині біоплівок. Деякі мікроорганізми виробляють ферменти, що інактивують вроджені механізми резистентності, а інші мають спеціалізовані системи секреції білка для вибіркового знищення клітин хазяїна. Ці фізико-хімічні характеристики сприяють виживанню патогенних мікроорганізмів та є складовою їх вірулентності.

Деякі збудники змінюють свої поверхневі білки шляхом мутації чи рекомбінації, або знижують рівень експресії білків поверхні клітини. Деякі бактерії (н. п., *Streptococcus pyogenes*) виробляють капсули, що нагадують компоненти тканин хазяїна і, таким чином, залишаються непоміченими. Капсули деяких інших бактерій (н. п., *Haemophilus influenzae*) запобігають накопиченню комплементу хазяїна, тим самим захищаючи збудника від захисних сил хазяїна. *Neisseria gonorrhoeae* шляхом фазової варіації вносить зміни в ген, який кодує білок пілін, тому специфічна імунна відповідь

хазяїна не здатна нейтралізувати нові пілі, що не перешкоджає патогену здійснювати адгезію до тканини хазяїна. Цей збудник також продукує протеази, які руйнують білки хазяїна, такі як імуноглобулін А (IgA). Інші бактерії виробляють спеціальні білки (н. п., стафілококовий білок А, G і М *S. pyogenes*), що перешкоджають здатності хазяїна виявляти їх та нейтралізовувати.

У збудників існують різноманітні способи пригнічення імунної відповіді хазяїна. Деякі бактерії, такі як *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* і *Haemophilus influenzae*, формують слизову мукоїдну капсулу, яка заважає імунним клітинам хазяїна ефективно захоплювати бактерію. Інші, такі як *N. gonorrhoeae*, елімінують ділянку О-антигену на своєму ліпополісахариді, тим самим зменшуючи імунне розпізнавання патогена.

19.6. Острови патогенності

Фактори вірулентності можуть бути закодовані в мікробній хромосомі або в нехромосомних елементах. Існує чітка взаємодія між факторами, що дозволяють мікроорганізму занести інфекцію (фактори адгезії та колонізації), поширитися на інші тканини (фактори інвазії), уникнути захисних механізмів хазяїна, та факторами, які завдають шкоди хазяїну.

Таблиця 19.3

Приклади островів патогенності та продуктів, що вони кодують

Мікроорганізм	Острів патогенності	Продукт генів	Функція
Helicobacter pylori	PAI-III	Пілі I типу Секреція білка	Адгезія, гемоліз, цитотоксичний, некротизуючий фактор, уропатогенний білок
Escherichia coli	cagPI	IV тип секреції білків	Цитотоксин
Legionella pneumophila	icm/dot	IV тип секреції білків	Внутрішньоклітинне виживання
Rhodococcus equi	PAI-vap	Секреція білків	Внутрішньоклітинне виживання
Salmonella enterica	SPI-1, SPI-2	III тип секреції білків	Цитотоксин
Shigella flexneri	SHI-1, SHI-2	III тип секреції білків	Цитотоксин
Staphylococcus aureus	SaPI	Секреція білків	Суперантигени
Vibrio cholerae	VPI	Секреція білків	Токсин
Yersinia pestis	HPI-1	Синтез сидерофорів	Поглинання та зберігання заліза

Острови патогенності – це великі сегменти (від 10 до 200 т.п.н.) бактеріальних хромосом або плазмід, що кодують фактори патогенності. Багато бактерій (н. п., *Yersinia spp., P. aeruginosa, Shigella flexneri, Salmonella spp.,* ентеропатогенна *Escherichia coli*) несуть принаймні один острів патогенності (табл. 19.3). Острови патогенності зазвичай підвищують вірулентність бактерій і відсутні у непатогенних представників того ж роду або виду. Наприклад, острів патогенності *Staphylococcus aureus* кодує кілька генів суперантигена, включаючи ген токсину, який викликає токсичний шоковий синдром.

19.7. Токсини

Токсин – це речовина, яка порушує нормальний метаболізм клітин хазяїна та згубно впливає на нього. Токсигенність – це здатність збудника виробляти токсини, а інтоксикація – це захворювання, яке є наслідком дії специфічного токсину, що виробляє збудник. Інтоксикаційні захворювання не вимагають присутності збудника, що активно розвивається, а лише його токсину, як у випадку з ботулізмом.

Бактерії виробляють два структурно різні типи токсинів – екзотоксини (білки) та ендотоксини (ліпополісахариди), а гриби – сильнодіючі мікотоксини.

Екзотоксини. Екзотоксини – це розчинні термолабільні білки (інактивуються при 60–80 °С), які зазвичай вивільняються в тканини хазяїна бактеріальним збудником (табл. 19.5). Часто екзотоксини переміщуються з вогнища інфекції до інших тканин організму або клітин-мішеней, де вони проявляють свою дію. Екзотоксини часто кодуються генами, що містяться в плазмідах або профагах певних бактерій (н. п., дифтерійний токсин). Деякі з них належать до найбільш смертоносних відомих речовин, які токсичні в нанограммах на кілограм маси тіла (н. п., ботулінічний токсин).

Екзотоксини поділяють на групи або за механізмом дії (н. п., цитотоксин вбиває клітини), або за структурою молекули білка. Поширеним є тип АБ, який отримав свою назву через те, що токсини цього типу мають дві різні субодиниці: «А» (активний) компонент і «Б» (транспортний) компонент (рис. 19.6). Частина Б токсину зв'язується з рецептором клітини-хазяїна та запускає ендоцитоз (проникнення) токсину. Компонент А має ферментативну активність, яка викликає токсичну дію. Таким чином, компонент Б визначає тип клітини, на яку діє токсин, тоді як компонент А здійснює шкодочинну дію.

АБ токсини діють на клітини різними механізми. Багато субодиниць А токсинів мають активність рибозилювання АДФ, яка каталізує перенесення фрагментів аденозиндифосфату та рибози $НАД^+$ хазяїна до цільових молекул хазяїна.

Екзотоксини іншого типу руйнують мембрани. Вони порушують цілісність мембрани так, що клітина-хазяїн лізує. Будучи білками, токси-

Таблиця 19.4

Екзотоксини, що продукують бактеріальні патогени

Токсин	Мікроорганізм	Розташування гена	Тип токсину	Механізм дії
1	2	3	4	5
Фактор набряку (ФН) Летальний фактор (ЛФ) Захисний антиген (ЗА)	*Bacillus anthracis*	Плазміда	Тристоронній АБ	ФН викликає набряк, ЛФ – цитотоксин, ЗА – компонент Б
Токсин кашлюку	*Bordetella pertussis*	Хромосома	АБ	↓АТФ, ↑цАМФ змінює функцію клітин, що призводить до їх загибелі
Ботулотоксин	*Clostridium botulinum*	Профаг	АБ	Блокує виділення ацетилхоліну, що призводить до паралічу
CPE ентеротоксин	*Clostridium perfingens*	Хромосома	Цитотоксин	Гемоліз
Тетаноспазмін	*Clostridium tetani*	Плазміда	АБ	Блокує вивільнення гальмівного нейромедіатора, що призводить до спастичного паралічу
Дифтерійний токсин	*Corynebacterium dephteriae*	Геном фага	АБ	Змінює трансляцію, що призводить до пригнічення синтезу білка
Ентеротоксин Шига-подібний токсин	*Escherichia coli* O157:H7	Плазміда, Геном фага, інтегрований у хромосому	АБ	↑цАМФ, що призводить до виділення води з клітини та пригнічує синтез білка.
Цитолізин	*Salmonella* spp.	Хромосома	Цитотоксин	↑цАМФ, що призводить до виділення води з клітини

Продовження таблиці 19.4

1	2	3	4	5
Токсин Шига	*Shigella dysenteriae*	Хромосома	АБ	Гальмує синтез білка, що призводить до смерті
Ексфоліативний токсин	*Staphylococcus aureus*	Хромосома	Протеаза	Лущення шкіри
Токсин синдрому токсичного шоку-1		Хромосома	Суперантиген	Цитокініндукований шок
Лейкоцидин Пантона-Валентина		Геном фага	Цитотоксин	Лізує лейкоцити
Стрепто-лізин О	*Staphylococcus pyogenes*	Хромосома	Цитолізин	Гемоліз
Еритрогенний токсин		Геном фага	Суперантиген	Цитокін-індукований шок
Холерний токсин	*Vibrio cholerae*	Геном фага	АБ	↑цАМФ, що призводить до виділення води з клітини

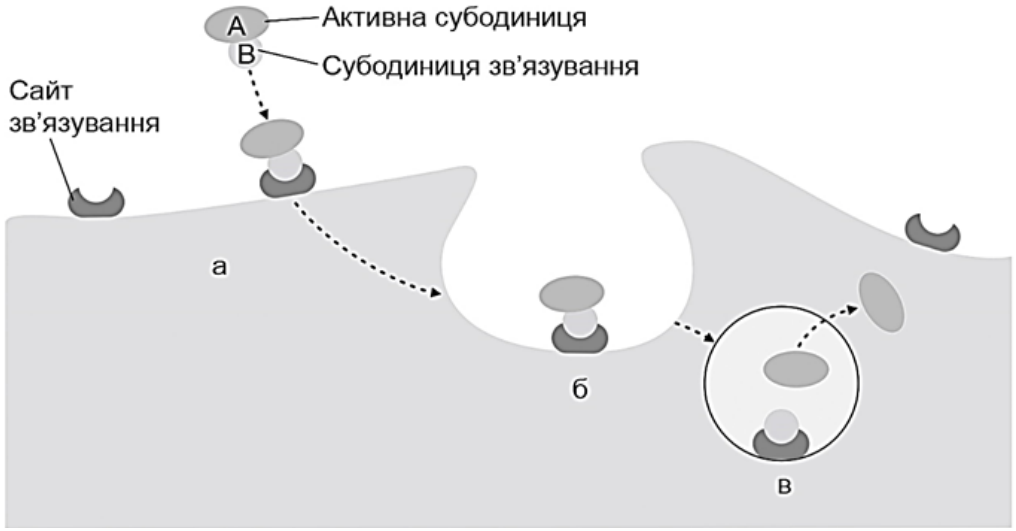


Рис. 19.6. Механізм дії АБ-екзотоксину: (а) Б-субодиниця зв'язується зі специфічною молекулою клітини-хазяїна; (б) токсин поглинається шляхом ендоцитозу; (в) субодиниця токсину відокремлюється, дозволяючи субодиниці А проникнути в цитоплазму, де вона виявляє свою токсичну дію

ни легко розпізнаються імунною системою хазяїна, яка виробляє антитоксин-антитіла, що розпізнають цільові токсини та зв'язуються з ними, щоб інактивувати та видалити їх.

Екзотоксини, які називаються суперантигенами, стимулюють біля третини Т-клітин хазяїна до надмірної експресії та вивільнення великої кількості прозапальних цитокінів з імунних клітин хазяїна за відсутності специфічного антигена.

Надмірна концентрація цитокінів призводить до відмови багатьох органів хазяїна, що дає патогену можливість для поширення. Запускаючи цю «цитокінову бурю», суперантигени викликають небезпечне для життя захворювання – лихоманку, яка з втратою рідини та низьким артеріальним тиском може спричинити шок та смерть.

Ендотоксини. Ліпополісахариди (ЛПС) зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій токсичні для людини. ЛПС називають ендотоксином тому, що він входить в склад зовнішньої мембрани та вивільняється, коли мікроорганізм лізує, хоча деякі можуть також вивільнятись в процесі поділу клітини. Токсичним компонентом ЛПС є ліпідна частина, яка називається ліпідом А (див. рис. 4.8). Ліпід А – термостабільний і токсичний у наногрампових кількостях та має низьку імуногенність.

На відміну від структурної та функціональної різноманітності екзотоксинів, ліпід А різних грамнегативних бактерій призводить до лихоманки (тобто ендотоксин є пірогенним), шоку, пошкодження оболонки кровоносних судин, слабкості, діареї, запалення, кишкової кровотечі та фібринолізу.

Ліпід А є основним ініціатором септичного шоку, кульмінацією системної відповіді на токсин, стимулює вивільнення ендогенних медіаторів сепсису (н. п., цитокінів) з пошкоджених ендотеліальних клітин, моноцитів, макрофагів, нейтрофілів і попередників плазматичних клітин. Наступний за цим «цитокіновий шторм» викликає швидке розширення кровоносних судин, що супроводжується різким падінням артеріального тиску, сильним фізіологічним впливом на серце, судинну систему та інші органи тіла. Ендотоксин також активує білок під назвою фактор Хагемана (фактор згортання крові XII), що, у свою чергу, призводить до нерегульованого згортання крові в капілярах (дисеміноване внутрішньосудинне згортання крові) і поліорганної недостатності.

Ендотоксини також стимулюють макрофагів вивільняти ендогенні пірогени, що викликає лихоманку. Одним з важливих ендогенних пірогенів є цитокін інтерлейкін-1 (IL-1). Інші цитокіни, що виділяють макрофаги, такі як фактор некрозу пухлини, також викликають лихоманку.

Мікотоксини – це токсини, що виробляють гриби. Наприклад, *Aspergillus flavus* і *A. parasiticus* виробляють афлатоксини, а *Stachybotrys* spp. виробляють сатратоксини. Ці гриби зазвичай забруднюють продукти

харчування та корм тварин. Афлатоксини викликають як хронічні, так і гострі захворювання та рак печінки. Афлатоксини надзвичайно канцерогенні, мутагенні та імуносупресивні. Існує приблизно 18 різних типів афлатоксинів. Вони поділяються на дві великі групи відповідно до їх хімічної структури. Мікотоксини *Stachybotrys trichothecene* є потужними інгібіторами синтезу ДНК, РНК і білка. Вони викликають запалення, руйнують поверхнево-активні фосфоліпіди в легенях і можуть призводити до патологічних змін в тканинах.

Гриб *Claviceps purpurea* виділяє алкалоїди, які мають різну фізіологічну дію на людину. Одним із таких алкалоїдів є лізергінова кислота, психотропний галюциноген ЛСД.

19.8. Епідеміологія

Епідеміологія – це наука, яка досліджує захворювання, щоб виявити їхнє походження, оцінює їхній ризик, і контролює захворювання, щоб запобігти майбутнім спалахам (рис. 19.7). Головним завданням епідеміолога є виявлення факторів, важливих для виникнення та розвитку захворювання, методи профілактики захворювання. Міжнародним Центром з контролю та профілактики захворювань є Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ), розташована в Женеві, Швейцарія.

Рис. 19.7. Епідеміологія

Епідеміологія виникла та розвивалась у відповідь на великі епідемії, такі як холера, черевний тиф, віспа, грип і жовта лихоманка. Останні епідемії Ебола, ВІЛ/СНІД, COVID-19, криптоспоридіозу, ентеропатогенної кишкової палички, важкого гострого респіраторного синдрому, сальмонельозу та грипу підкреслюють важливість епідеміології для запобігання глобальним катастрофам, спричиненим інфекційними захворюваннями.

Епідеміологія вивчає фактори, що визначають і впливають на частоту та поширення подій, пов'язаних зі здоров'ям. Грип є прикладом захворювання, яке може виникнути раптово і несподівано в родині, а потім досягає епідемічного статусу в суспільстві. Пандемія – це збільшення захворюваності серед великої кількості населення принаймні у двох країнах світу. Зазвичай пандемічні захворювання поширюються між континентами (н. п., глобальні спалахи грипу H1N1 та COVID-19).

Лише кілька десятиліть тому завдяки антибіотикам, вакцинам та агресивній кампанії охорони здоров'я було отримано перемогу над такими хворобами як кашлюк, пневмонія, поліомієліт та натуральна віспа.

На жаль, незважаючи на загальну тенденцію до зниження інфекційних захворювань, світ став свідком глобального поширення ВІЛ/СНІДу, відродження туберкульозу, вірусу грипу H1N1, а також появи нових збудників, таких як вірус Зіка, пандемії SARS і MERS, вірусу Ебола, *Cryptosporidium* spp..

19.9. Біотероризм

Біотероризм визначається як «навмисне або загрозливе використання вірусів, бактерій, грибків або токсинів з живих організмів для спричинення смерті або захворювання людей, тварин і рослин». Використання біологічних агентів для досягнення особистих чи політичних результатів не є новим, і сучасне використання біологічних агентів є реальністю. Найпомітнішим навмисним використанням біологічних агентів із злочинною чи терористичною метою є використання спор *Bacillus anthracis*, які доставлялись поштовою системою США.

Перелік біологічних агентів, що можуть становити найбільший ризик для здоров'я людей у разі біотерористичного нападу, є відносно коротким. Він включає віруси, бактерії та токсини. Якщо їх придбати та розповсюдити, можуть стати складною проблемою для системи охорони здоров'я з точки зору обмеження кількості жертв (табл. 19.5).

Серед зброї масового знищення біологічна зброя може бути настільки ж руйнівною, як хімічна та ядерна. Кілька кілограмів спор сибірської виразки можуть вбити стільки ж людей, скільки ядерна бомба, скинута на Хіросіму. Біологічні агенти, швидше за все, можуть бути обрані як засоби локалізованої атаки (біозлочин) або масових жертв (біотероризм) з кількох причин. Здебільшого вони невидимі, не мають запаху, смаку та їх важко виявити. Крім того, терористи можуть залишитися непоміченими, оскільки може пройти кілька годин або днів, перш ніж ознаки та симптоми їх використання стануть очевидними.

У звязку з цим виникла відносно нова сфера наукових знань – біобезпека та біозахист, які в основному використовуються для того, щоб убезпечити працівників та середовище навколо них від поширення біологічного матеріалу, що використовується під час наукових та інших досліджень.

Таблиця 19.5

Деякі біологічні агенти та токсини біологічної зброї

Бактерія	Вірус	Токсин
Bacillus anthracis *Yersinia pestis* *Francisella tularensis* *Brucella* spp. *Salmonella* spp. *Escherichia coli* 0157:H7 *Shigella* spp. *Burkholderia mallei* *Chlamydia psittaci* *Coxiella burnetiid* *Rickettsia prowazekii* *Vibrio cholerae*	Вірус натуральної віспи Вірус Ебола Вірус Марбург Вірус Ласса Вірус Мачупо Вірус енцефаліту коней Ніпа вірус Ортохантавірус	Токсин *Clostridium botulinum* Токсин *Clostridium perfringens* Стафілококовий ентеротоксин В

Біобезпека – це попередження, зменшення та елімінація впливу небезпечних біологічних чинників (агентів) на людей, тварин, рослин та на навколишнє середовище.

Біозахист – заходи, спрямовані на попередження втрати, викрадання або використання з небезпечною метою (біотероризм) мікроорганізмів, біологічних матеріалів (біоагентів) або інформації.

Питання для самостійного контролю

1. Охарактеризуйте фактори патогенності.
2. Як визначити ІД50 та ЛД50 підозрюваного збудника?
3. Що таке острови патогенності та чому вони важливі?
4. Як капсула посилює патогенність?
5. Як здатність утворювати біоплівку підвищує резистентність збудника?
6. У чому полягають відмінності між екзо- та ендотоксинами?
7. Опишіть загальні характеристики екзотоксинів.
8. Охарактеризуйте основні типи шляхів передачі інфекційних хвороб і наведіть приклади кожного з них.
9. Опишіть особливості, які дозволяють мікроорганізмам долати опір хазяїна та імунітет.
10. Перерахуйте та опишіть засоби, за допомогою яких мікроорганізми проникають у клітини та тканини людини.
11. Чому психрофіли не можуть заражати людину?
12. Що таке облігатний внутрішньоклітинний збудник?

РОЗДІЛ 20
БАКТЕРІЇ-ЗБУДНИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛЮДИНИ

20.1. Бактерії, що передаються повітряно-крапельним шляхом

Більшість бактеріальних захворювань, що передаються повітряно-крапельним шляхом, вражають органи дихання. Вдихання збудника або самоінокуляція може спричинити захворювання пазух носа, горла, бронхів або легенів. З легенів деякі бактерії можуть поширюватися в кров. Далі наведено деякі з самих поширених із цих захворювань.

Corynebacterium diphtheriae – збудник дифтерії. Дифтерія – це хвороба, яку спричиняє грампозитивна бактерія *Corynebacterium diphtheriae* (рис. 20.1*)*. Цей збудник добре пристосований до повітряно-крапельної передачі через виділення з носоглотки, оскільки стійкий до висихання.

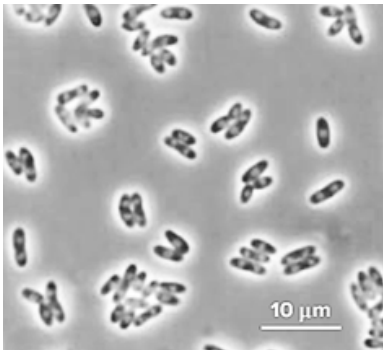


Рис. 20.1. Бактерії *Corynebacterium diphtheriae* за рахунок специфічного механізму поділу розташовуються у формі частоколу

Збудник секретує дифтерійний АБ-токсин, що складається з двох доменів – А (токсичного поліпептиду) та Б (транспортного поліпептиду), відповідального за доставку токсичного компонента в клітину-мішень. Утворення першого домену контролюється бактеріальними генами, другого – генами фага, що лізогенізує бактеріальну клітину. Це свідчить про те, що тільки лізогенні клітини *C. diphtheriae* можуть секретувати токсин.

Б-домен зв’язується з рецептором епідермального фактора росту еукаріотичних клітин. Після зв’язування токсин проникає в цитоплазму шляхом ендоцитозу. При цьому розривається дисульфідний зв’язок, що утримує разом домени А і Б. Домен А вивільняється в цитоплазму, каталізує приєднання АДФ-рибози (від $НАД^+$) до фактора елонгації трансляції-2, що призводить до пригнічення синтезу білка та загибелі клітини.

У довкіллі бактерії дифтерії зберігають життєздатність протягом кількох днів, оскільки вони стійкі до висушування. Типові ознаки та симптоми дифтерії включають густі виділення з носа, фарингіт, лихоманку, кашель, параліч горла та дихальних м’язів. Основною ознакою дифтерії є товста,

сірувата псевдомембрана на глотці та слизовій оболонці дихальних шляхів, що складається з мертвих клітин хазяїна та бактерій *C. diphtheriae*. У всьому світі щорічно реєструється від 10 000 до 20 000 випадків дифтерії. Вакциною є інактивований токсин.

Chlamydophila pneumoniae – збудник хламідійної пневмонії**.** Бактерії *Chlamydophila pneumoniae* є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, тому вони повинні рости та розмножуватися в клітинах хазяїна. Багато видів мешкають в протистах і клітинах тварин, які є їхнім природним резервуаром. Зараження починається при вдиханні елементарних тіл (ЕТ) бактерій, які еволюціонували виключно для передачі та інфікування. Клітини-хазяїни фагоцитують ЕТ, які перетворюються в сітчасті тіла (СТ). Приблизно через 8–10 годин після зараження СТ починають ділитися і реплікуватися протягом 20–25 год. Потім вони диференціюються в інфекційні ЕТ. Клітина-хазяїн лізує та вивільняє ЕТ через 48–72 години після інфікування.

Симптоми включають лихоманку, кашель, біль у горлі, хрипоту та біль під час ковтання. Інфекції *C. pneumoniae* поширені, але спорадичні. Приблизно від 5 до 10% усіх випадків пневмонії та бронхіту у дорослих спричинені *C. pneumoniae.* Схоже, що *C. pneumoniae* передається від людини до людини повітряно-крапельним шляхом. Діагностика хламідійної пневмонії базується на симптомах і серології для виявлення антитіл класу IgM або ампліфікації ДНК. Збудник чутливий до макролідів, тетрациклінів і фторхінолонів.

Legionella pneumophila – збудник легіонельозу. Спалах пневмонії, яку назвали легіонельозом, стався вперше в американському легіоні в Філадельфії. Було встановлено, що відповідальним збудником є бактерія *Legionella pneumophila* – вибаглива, аеробна, грамнегативна паличка (рис. 20.2). Рід *Legionella* включає 9 видів грамнегативних бактерій. Для людини патогенним є бактерії виду *L. pneumophilia.* Фактори патогенності пов’язані з капсульною речовиною – білком зовнішньої мембрани, а токсичність – з ліпополісахаридом зовнішньої мембрани. Природним резервуаром *L. pneumophila* є різноманітні амеби та війчасті найпростіші.

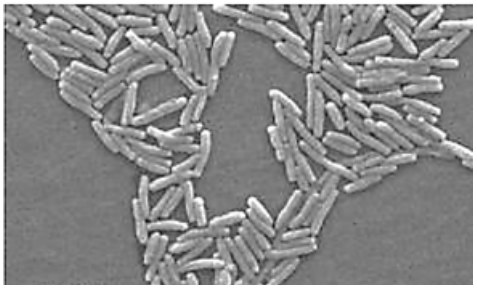


Рис. 20.2. Збудник хвороби легіонерів *Legionella pneumophila*

Окрім проживання в прісноводних екосистемах, ці протисти живуть в охолоджувальній воді систем кондиціонування повітря. Насправді більшість спалахів пов'язані з забрудненням систем охолодження.

Легіонели розмножуються внутрішньоклітинно в найпростіших, так само як і в макрофагах людини. Збудник не передається від людини до людини. Після інфікування легенів хазяїна бактерії перебувають у фагосомах альвеолярних макрофагів, де вони розмножуються та викликають локалізовану деструкцію тканин шляхом виділення цитотоксичної екзопротеази. Симптоми включають високу температуру, сухий кашель, головний біль, неврологічні прояви, важку бронхопневмонію та діарею. Збудник чутливий до азитроміцину та фторхінолонів. До 30% симптоматичних випадків захворювання завершується смертю.

Менінгококи. Грамнегативні коки, диплококи, кокобактерії відносяться до чотирьох родів. Основне значення в патології людини мають види *Neisseria meningitidis* і *N. gonorrhoeae*, що викликають відповідно менінгококову інфекцію та гонорею. Менінгококи (*Neisseria meningitidis*) викликають у людей запалення оболонок головного або спинного мозку.

Клітини менінгокока мають сферичну або злегка овоїдну форму, розташовуються попарно (рис. 20.3). Менінгококи – хемоорганотрофні, вимогливі до умов культивування, аероби, володіють цитохромоксидазою та каталазою. Культивують менінгококи на середовищах, що містять нормальну сироватку або дефібриновану кров барана або коня.

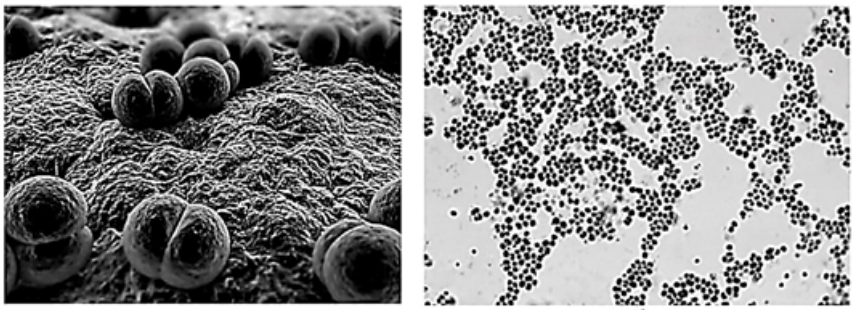


Рис. 20.3. Бактерії *Neisseria meningitidis* – збудники менінгіту: а – *е*лектронна мікроскопія, б – світлова мікроскопія (забарвлення за Грамом)

Після колонізації носоглотки бактерії проникають через епітелій та гематоенцефалічний бар'єр у центральну нервову систему або в кров. Звичайні симптоми менінгіту включають менінгеальні синдроми: блювоту, головний біль, млявість, сплутаність свідомості, світлобоязнь і ригідність шиї.

Факторами вірулентності менінгококів є капсульні полісахариди, що забезпечують резистентність до фагоцитозу, пілі та білки зовнішньої мемб-

рани, за допомогою яких бактерії прикріплюються до рецепторів епітеліальних клітин. Менінгококи продукують нейрамінідазу та гіалуронідазу, що сприяють їхній інвазії в тканини, утворюють ендотоксин (ліпополісахарид).

На підставі імунохімічних відмінностей капсульних антигенів менінгококи ділять на 10 сероварів. Захворювання найчастіше викликають менінгококи сероварів A, B і C.

N. meningitidis є нормальним мешканцем носоглотки людини (від 5 до 10% людей є носіями непатогенних серотипів). Від людини до людини менінгококи передаються повітряно-крапельним шляхом.

Залежно від клінічної форми менінгококової інфекції матеріалом для дослідження служить спинномозкова рідина та кров. Матеріал із носоглотки та осад спинномозкової рідини засівають на сироватковий або кров'яний агар.

Специфічна профілактика менінгококової інфекції проводиться за допомогою менінгококової полісахаридної вакцини та менінгококової кон'югованої вакцини. Бактерії чутливі до цефтріаксону та пеніциліну.

Мікобактерії збудники туберкульозу – це грампозитивні бактерії з високим вмістом Г+Ц, які зазвичай мешкають у ґрунті, воді та домашньому пилу (рис. 20.4). Вони викликають у людини ряд інфекцій, що важко піддаються лікуванню.

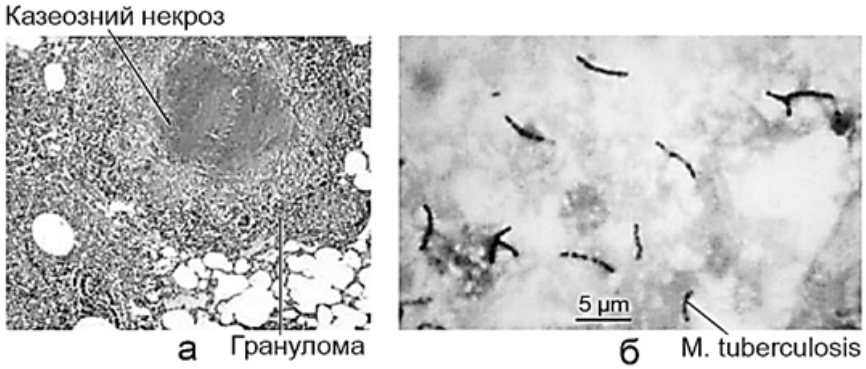


Рис. 20.4. Туберкулома (а) та клітини *Mycobacterium tuberculosis,* що знаходиться в грануломах. У центрі туберкуломи міститься казеозний (сирний) гній і бактерії

Рід *Mycobacterium* включає понад 50 видів та підвидів мікобактерій – патогенних, умовно-патогенних та сапрофітів, поширених у природі. Не менше 25 з них відіграють важливу роль у патології людини, будучи збудниками туберкульозу, мікобактеріозів та прокази.

Збудниками туберкульозу у людини є *M. tuberculosis* (більше 90%), *M. bovis* (5%) та *M. africanum* (близько 3%) усіх випадків туберкульозної

інфекції. За оцінками, одна третина населення світу інфікована цим збудником.

Мікобактерії туберкульозу (МБТ) – грампозитивні прямі або злегка вигнуті палички, нерухливі (рис. 19.11). Структурний скелет клітинної стінки мікобактерій являє собою два ковалентно пов'язані полімери – міколат арабіногалактозану та пептидоглікан, до якого приєднані білки, полісахариди, ліпіди. Такий складний хімічний комплекс з високим вмістом ліпідів надає клітинам МБТ стійкість до антимікробних агентів, кислот, лугів і спирту, а також гідрофобність.

Для забарвлення туберкульозних бактерій застосовують метод Ціля-Нільсена. В оптимальних умовах час генерації мікобактерії становить близько 15 годин. У *M. tuberculosis, M. bovis* та інших мікобактерій є загальні та специфічні антигени.

Патогенність туберкульозних мікобактерій пов'язана з прямою або імунологічно опосередкованою шкідливою дією ліпідів. Для вірулентних штамів характерна наявність так званого корд-фактора – гліколіпіду, що складається з трегалози та диміколату, який руйнує мітохондрії клітин інфікованого організму.

Заразна доза досить низька, близько 10 бактеріальних клітин. Інкубаційний період становить від 4 до 12 тижнів і хвороба розвивається повільно. Симптомами туберкульозу є лихоманка, втома, нічна пітливість і втрата ваги.

Найчастіше зустрічається туберкульоз легень. Патогенетично важливою є дія туберкуліну (білковий лізат з мікобактерій туберкульозу) на організм інфікованої людини. Внутрішньошкірне введення туберкуліну викликає у інфікованих мікобактеріями людей місцеву запальну реакцію у вигляді інфільтрату та почервоніння (реакція Манту). Цю пробу застосовують для виявлення інфікованих людей.

При туберкульозі імунітет формується на тлі первинного інфікування організму мікобактеріями, які тривалий час зберігаються в ньому. При туберкульозі виявляються антитіла, що належать до різних класів імуноглобулінів. Велике значення має клітинний імунітет. Фагоцитоз при туберкульозі має незавершений характер, оскільки мікобактерії можуть розмножуватися в макрофагах і частково їх руйнувати. Джерелом інфекції є хворі люди та тварини. Найбільш поширений повітряно-крапельий шлях зараження. У воді мікобактерії виживають понад рік.

Основним у лабораторній діагностиці туберкульозу є бактеріологічний метод. Шкірно-алергічну туберкулінову пробу (реакція Манту) ставлять з метою виявлення осіб, інфікованих МБТ.

Для специфічної профілактики використовують живу вакцину БЦЖ (від **B**acille **C**almette-**G**uerin). Для лікування туберкульозу застосовують комбінацію антибіотиків: ізоніазид, рифампіцин, етамбутол та ін.

Mycoplasma pneumoniae – збудник пневмонії, входить до групи прокаріотів, позбавлених клітинної стінки, які стійкі до пеніциліну та інших антибіотиків, що блокують синтез клітинної стінки. Рід *Mycoplasma* включає кілька десятків різних видів, з яких патогенним для людини є *M. pneumoniae*, а представники видів *M. hominis, M. fermentans, M. orale, M. arthritidis* є умовнопатогенними або сапрофітними.

Збудник пневмонії *Mycoplasma pneumoniae* для свого росту потребує стеролів, хемоорганотроф, як джерело енергії використовує глюкозу та аргінін, факультативний аероб. Мембрана клітини містить видоспецифічний антиген.

Збудник, зазвичай, колонізує верхні дихальні шляхи та згодом переходить у нижні дихальні шляхи, де прикріплюється до клітин слизової оболонки. При цьому ліпідні компоненти мембрани мікоплазми дифундують у клітинну мембрану хазяїна, а стероли клітини-хазяїна надходять до мембрани мікоплазми. У фагоцитуючих клітинах мікоплазма може довго персистувати і переноситись до різних органів. *M. pneumoniae* виділяє токсин, який викликає утворення вакуолей у клітинах хазяїна, а також вивільнення високих рівнів цитокінів. Симптоми включають головний біль, слабкість, субфібрильну температуру та характерний кашель.

При мікоплазмово-пневмонійній інфекції формується клітинна та гуморальна імунна відповідь. При цьому утворюються сироваткові антитіла (SIgA), які забезпечують місцевий імунітет.

Основним методом діагностики є серодіагностика, імунофлюоресцентний та ПЛР-аналіз. При ізоляції з респіраторних виділень деякі мікоплазми утворюють на агарі чіткі колонії на вигляд «смаженого яйця». Вакцинопрофілактика не розроблена. Для лікування ефективними є антибіотики тетрациклінового ряду та макроліди.

Bordetella pertusis – збудник кашлюку. До роду *Bordetella* належать грамнегативні бактерії, які є збудниками кашлюку (*B. pertussis*), паракашлюку (*B. parapertussis*), бронхосептикозу (*B. bronchiseptica*), які відрізняються один від одного рядом морфологічних, біохімічних та антигенних ознак.

Збудник кашлюку – це невеликі коккобактерії, що розташовуються поодинці або попарно. (рис. 20.5). Нерухливі, мають капсулу та пілі, грамнегативні, хемоорганотрофи, метаболізм окисний, суворі аероби. Колонії кашлюкових бактерій дрібні, круглі, з рівними краями, блискучі, що нагадують краплинки ртуті або зерна перлів. На кров'яних середовищах утворюють зону гемолізу. Бактерії *B. pertussis* ферментативно малоактивні, цукрів не розщеплюють, не мають протеолітичної активності, не відновлюють нітрати.

Антигенна структура бактерій роду *Bordetella* досить складна. У них виявлено 14 антигенних компонентів або аглютиногенів.

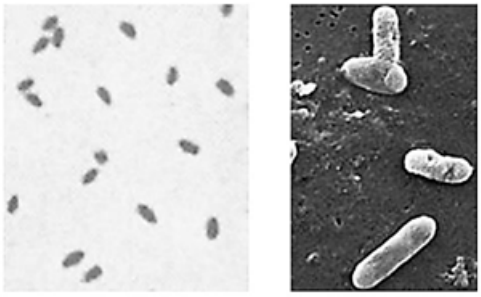


Рис. 20.5. Бактерії *Bordetella pertusis* збудника кашлюку: (а) світлова мікроскопія; (б) електронна мікроскопія

До факторів вірулентності відноситься здатність збудника до адгезії за рахунок пілей на епітеліоцитах респіраторного тракту. З пілями пов'язаний філаментозний гемаглютинін, що склеює *B. pertussis* з іншими бактеріями з утворенням біоплівок. *B. pertussis* виробляє кілька токсинів, з яких самим важливим є пертузис-токсин. Це – АБ екзотоксин, що виділяється системою секреції IV типу. Субодиниця А (АДФ-рибозилтрансфераза) подібна до дифтерійного токсину. Капсульний полісахарид захищає бактерії від фагоцитозу. Усі гени, що контролюють патогенність, містяться в одному опероні.

Бактерії кашлюку є мешканцями верхніх відділів респіраторного тракту. Зараження відбувається повітряно-крапельним шляхом при безпосередньому спілкуванні з хворою людиною або носієм. Бактерії швидко гинуть у повітрі. Інкубаційний період становить 7–14 днів. Основним методом діагностики є бактеріологічне дослідження, необхідне для диференціювання кашлюку від паракашлюку та бронхосептикозу.

При кашлюку має місце гуморальна імунна відповідь, що супроводжується формуванням напруженого гуморального імунітету. Для вакцинопрофілактики використовують адсорбовану кашлюково-дифтерійно-правцеву тривакцину, що містить убиті кашлюкові бактерії. Для лікування використовують протикашлюковий імуноглобулін та антибіотики макроліди.

Стрептококи групи А. Стрептококи групи А (СГА) – це всюдисущі грампозитивні коки, які потенційно можуть викликати широкий спектр інфекцій людини. Їх можна розділити на понад 100 різних підтипів на основі поверхневого «М-білка». Інфекції, спричинені СГА, призводять до гострого фарингіту, імпетиго, бешихи (рожа) та целюліту.

Патогенні стрептококи є гетерогенною групою грампозитивних бактерій, до яких належить *Streptococcus pyogenes* (рис. 20.6). Ці β-гемолітичні стрептококи за важливістю відносять до групи А. Різні серотипи стрептококів групи А виробляють низку факторів вірулентності: позаклітинні

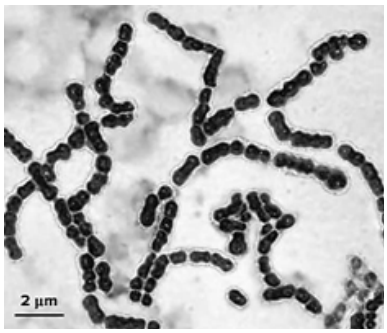


Рис. 20.6. Стрептокок групи А *Streptococcus pyogenes*. Скануюча електронна мікрофотографія

ферменти, що руйнують молекули хазяїна; стрептокінази – ферменти, що активують в крові хазяїна фактор, який розчиняє тромби; стрептолізин О та стрептолізин S, що вбивають лейкоцити хазяїна; капсули та білок М, що обмежують фагоцитоз. М-білок – альфа-спіральний білок зі згорнутою спіраллю, закріплений у плазматичній мембрані СГА (сприяє прикріпленню до клітин-хазяїна). Амінокислотна послідовність М-білків різна для різних серотипів *S. pyogenes* і різні М-білки опосередковують взаємодію з різними рецепторами хазяїна.

S. pyogenes вкритий капсулою з гіалуронової кислоти – молекули, що також зустрічаються у людей. Вакцини проти *S. pyogenes* не існує. Найкращим антигеном для вакцини проти інших стрептококів є капсула, як і у випадку з *S. pneumoniae*. Однак, оскільки гіалуронова кислота також міститься в хазяїні, вона не є імуногенною.

Стрептококовий фарингіт є одним з найпоширеніших бактеріальних інфекції людей і зазвичай називається стрептококовою ангіною. СГА поширюються з краплями слини або виділеннями з носа. Інкубаційний період у людини становить 2–4 дні.

Дія стрептококових бактерій у горлі (фарингіт) або на мигдалинах (тонзиліт) стимулює запальну реакцію та лізис лімфоцитів і еритроцитів. Запальний ексудат, що складається з клітин і рідини, виділяється з кровоносних судин і може відкладатися в навколишніх тканинах приблизно у 50% пацієнтів зі стрептококовим фарингітом. Це супроводжується загальним відчуттям дискомфорту або нездужання, лихоманкою та головним болем. Виразні фізичні прояви включають почервоніння, набряк і збільшення лімфатичних вузлів у горлі.

Для діагностики стрептококкової ангіни зазвичай використовуються набори експрес-тестів. За відсутності ускладнень хвороба може пройти самостійно і зникнути протягом тижня. Однак лікування антибіотиками (пеніциліни, цефалоспорини або макролідний антибіотик) може скоротити інфекцію та полегшити клінічні синдроми.

20.2. Бактерії-збудники, що переносяться членистоногими

Yersinia pestis – збудник чуми. До роду *Yersinia* відносяться кілька видів, з яких для людини патогенними є *Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis*. Це грамнегативні неспоротвірні палички, що відрізняються за біохімічними, антигенними та іншими ознаками. Чуму викликає грамнегативна бактерія *Yersinia pestis*. Щороку ВООЗ повідомляє про до 2000 випадків чуми.

Yersinia pestis – це короткі з закругленими кінцями палички, утворюють капсулу, невибагливі до поживних середовищ (рис. 20.7). Збудник чуми ферментує ряд цукрів з утворенням кислоти, продукує гіалуронідазу, фібринолізин, коагулазу, протеїнкіназу.

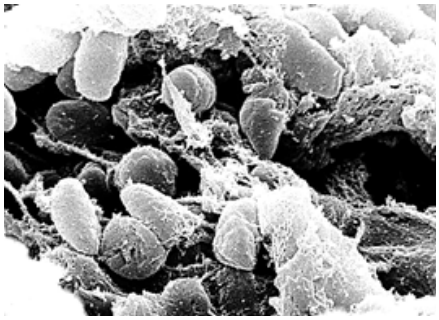


Рис. 20.7. Електронна мікрофотографія бактерій *Yersinia pestis* збудника чуми

Y. pestis має кілька антигенів: F1 антиген білкової природи, V-антиген також є білком, W-антиген – ліпопротеїдний комплекс, що пов'язаний з клітинною стінкою. *Y. pestis* має перехресні антигени з іншими єрсиніями, ентеробактеріями та еритроцитами людини О-групи.

Вірулентність збудника чуми пов'язана насамперед з його адгезією на епітеліальних клітинах, в якій бере участь капсула та поверхневі структури клітинної стінки. В інвазії та пригніченні фагоцитарної активності макрофагів беруть участь різні ферменти та токсини, що продукують ці бактерії. *Y. pestis* використовує систему секреції III типу для доставки ефекторних білків в клітини-хазяїна, у фагоцитарні клітини виділяє кодовані плазмідами білки зовнішньої мембрани, що протидіють природним захисним механізмам хазяїна.

Важливу роль в патогенності *Y. pestis* має «мишачий» токсин, який блокує функції клітинних мітохондрій печінки та серця, а також викликає утворення тромбів. Як і інші білкові токсини, він складається з двох доменів (АБ). Токсичність та алергізація пов'язані також з ЛПС (ендотоксин).

Важливу роль у вірулентності чумних бактерій відіграють плазмокоагулаза та фібринолізин, локалізовані в зовнішній мембрані бактеріальної клітини. Фактори патогенності закодовані в хромосомі та плазмідах.

Патогенез та клінічні форми чуми залежать від вхідних воріт інфекції. Розрізняють шкірну, бубонну, легеневу та інші клінічні форми чуми. Симптоми включають підшкірні крововиливи, лихоманку, озноб, головний біль, сильне виснаження та різке збільшення лімфатичних вузлів, що називаються бубонами (звідси назва бубонна чума). Бубонна чума може спричинити більш небезпечну легеневу чуму, потрапивши через кровотік у легені.

При зниженій опірності організму та великій дозі збудника може виникнути первинна септична форма хвороби. Вторинний сепсис виникає за будь-якої клінічної форми чуми. Легенева чума призвела до поширеної епідемії в Європі, оскільки вона передається від людини до людини повітряно-крапельним шляхом. Без лікування рівень смертності від легеневої чуми становить майже 100%. Постінфекційний імунітет характеризується низькою напруженістю, пов'язаною з гуморальними (антитілами) та клітинними (фагоцитоз) факторами.

Чума відноситься до зоонозних інфекцій з природним осередком. Резервуар інфекції – гризуни (суслики, тарабагани, бабаки, піщанки та ін.). Переносниками є блохи. Захворювання спочатку передається людям при контакті з ураженими блохами тваринами, такими як щури, миші та лугові собачки. Коли людину кусає інфікована блоха, бактерії потрапляють у лімфатичні вузли, де розмножуються та вимикають ефективну імунну відповідь. Від людини до людини чума передається повітряно-крапельним шляхом лише від хворих на легеневу форму чуми.

Лабораторна діагностика проводиться в режимних лабораторіях шляхом бактеріоскопічного дослідження матеріалу та обов'язкового виділення чистої культури збудника. Її ідентифікують за морфологічними, біохімічними та антигенними властивостями, а також із застосуванням імуно-флюоресцентного та молекулярно-біологічних методів діагногіки.

Оскільки *Y. pestis* внесено в список потенційних агентів біотероризму, ідентифікація в контрольній лабораторії обмежується мікроскопією та культуральними тестами. Підтвердження ідентифікації *Y. pestis* за допомогою ПЛР, серологічних досліджень та інших методів обмежено національними референс-лабораторіями.

Специфічна профілактика проводиться шляхом вакцинації живою чи молекулярною вакцинами. Для лікування застосовують стрептоміцин та інші антибіотики. Профілактика передбачає боротьбу з блохами та гризунами, ізоляцію хворої людини, профілактичне лікування постраждалих та вакцинацію осіб із високим ризиком.

20.3. Бактеріальні збудники прямого контакту

Деякі патогени передаються переважно при прямому контакті від інфікованої людини або при прямому контакті з кров'ю чи виділеннями від зараженої людини. Більшість бактеріальних захворювань прямого контак-

ту вражають шкіру, підлеглі тканини або слизові оболонки. Іноді бактерії проникають за межі цих ділянок, викликаючи дисеміновану хворобу. Далі наведено деякі з відомих бактеріальних хвороб, що передаються шляхом прямого контакту.

Clostridium perfringens – збудник газової гангрени. *Clostridium perfringens, C. novyi* та *C. septicum* є грампозитивними паличками, які утворюють ендоспори, можуть спричиняти некротизовану інфекцію скелетних м'язів, що називається газовою гангреною або клостридіальним міонекрозом. *C. perfringens* є найбільш поширенішою причиною цього захворювання.

C. perfringens – грампозитивні палички, утворюють ендоспори (рис. 20.8 а), як правило рухливі, утворюють капсулу. На кров'яному агарі оточені зоною гемолізу, на жовтковому агарі – зоною помутніння, що свідчить про наявність ферменту лецитинази. *C. perfringens* має надзвичайно короткий час генерації – від 8 до 10 хв в організмі людини, що робить критично необхідною швидку діагностику та лікування. Представники *C. perfringens* розрізняються за антигенною специфічністю секретованих ними мембранних токсинів.

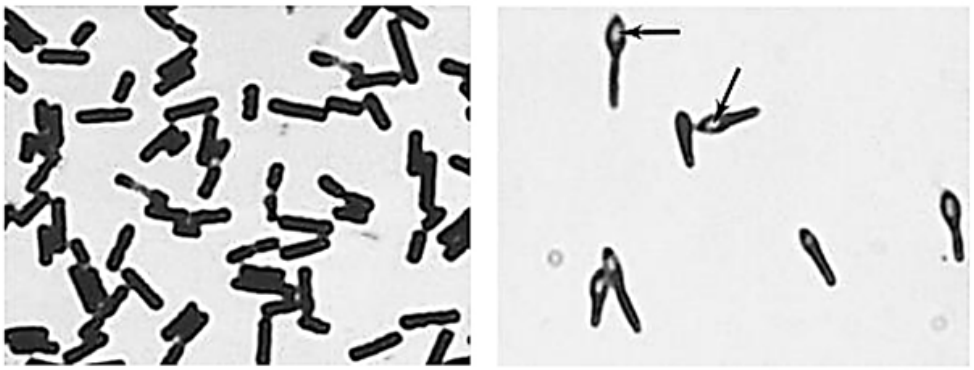


Рис. 20.8. *Clostridium perfringens* – збудник газової гангрени (а) та *Clostridium botulinum* – збудник ботулізму (б)

В основі патогенної дії всіх збудників анаеробної раневої інфекції лежить висока швидкість розмноження та здатність продукувати токсини. Альфа-токсин відноситься до типу мембрано-токсинів, який гідролізує фосфоліпіди, що входять в склад клітинних мембран, внаслідок чого настає гемоліз еритроцитів та розпад клітин. Тета-токсин має пряму та опосередковану дію на клітини-мішені. Токсини руйнують еритроцити, лейкоцити, впливають на клітини міокарда та порушують серцеву діяльність.

Для патогенних клостридій характерно утворення багатьох ферментів, що викликають деструкцію тканин: гіалуронідазу, колагеназу, ДНК-азу та ін. *C. perfringens* виділяє фермент, який дозволяє використовувати сіало-

ву кислоту, що міститься на поверхні багатьох клітин хазяїна, як джерело вуглецю та азоту. Всмоктування мікробних токсинів поряд з токсичними продуктами розпаду м'язової тканини викликає токсинемію. Клінічні прояви газової гангрени включають сильний біль, набряк, дренування та некроз м'язів.

Середовище проживання *C. perfringens* – кишківник людини, з якого клостридії потрапляють у ґрунт, де зберігаються у вигляді спор протягом тривалого часу. З ґрунтом або інфікованим матеріалом збудник попадає на раневу поверхню та за сприятливих анаеробних умов розмножується.

Для бактеріоскопічного дослідження використовують імунофлюоресцентний метод. Бактеріологічне дослідження здійснюють шляхом виділення чистої культури на кров'яному агарі, середовищі Вільсон-Блера. Як експрес-метод застосовують газорідинну хроматографію для визначення клостридій в раневих виділеннях. Для профілактики та терапії застосовують антитоксичну полівалентну сироватку або імуноглобулін, з цієї сироватки. Бактерії чутливі до β-лактамних та аміноглікозидних антибіотиків.

Clostridium botulinum – збудник ботулізму. Бактерії різного розміру з перитрихіально розташованими джгутиками. Утворюють спори, що надають бактеріальній клітині вигляду тенісної ракетки (рис. 20.8 б). Культивується на глюкозо-кров'яному агарі, утворюючи невеликі прозорі колонії, оточені зоною гемолізу. Здатність до ферментації цукрів є нестабільною характеристикою та не використовуються для ідентифікації цих бактерій.

Вид *C. botulinum* неоднорідний за антигенною специфічністю токсинів. Останні поділяються на 7 сероварів: A, B, C та ін. Патогенність клостридій ботулізму пов'язана з його токсином, який є найсильнішою отрутою. Один мікрограм його може вбити дорослу людину. Екзотоксин відноситься до є нейротоксинів і складається з двох АБ субодиниць. Одна з яких відповідає за адсорбцію на рецепторах чутливих нейронів, інша – за проникнення в них шляхом ендоцитозу та розвиток наступних подій. Останні полягають в інгібуванні Са-залежного звільнення ацетилхоліну, внаслідок чого блокується передача нервового імпульсу через синапси. Це призводить до ураження бульбарних нервових центрів, порушення ходи, зору, асфіксії та інших явищ. Летальні наслідки складають до 60%.

Виробництво ботулотоксину контролюється профагом при лізогенії бактерій та генами *C. botulinum*. Через слабкі імуногенні властивості ботуліністичного екзотоксину постінфекційний імунітет відсутній.

Природним середовищем проживання *C. botulinum* є кишківник багатьох переважно травоїдних тварин, а також риб, ракоподібних, молюсків, у якому вони розмножуються та виділяються з фекаліями у навколишнє середовище. Причиною отруєння є вживання рибних, овочевих, м'ясних консервів та інших продуктів харчування.

Діагностика проводиться шляхом одночасного виділення збудника та визначення наявності токсину в досліджуваному матеріалі, у якому

обов'язково визначають серовар токсину. Виявлення токсину проводять шляхом внутрішньосудинного зараження білих мишей.

Вакцинопрофілактика не проводиться. Для лікування використовують протиботулінічну полівалентну сироватку, оскільки антитіла до одного серовару токсину не нейтралізують інші серовари.

Clostridium tetani – збудник правця. Клітини *C. tetani* – прямі, перитрихи, капсулу не утворюють. Спори круглі, більші за діаметр клітини, розташовані термінально (рис. 20.9). Колонії оточені зоною гемолізу. Містять видоспецифічний О-антиген і близько 10 сероварів типоспецифічних Н-антигенів.

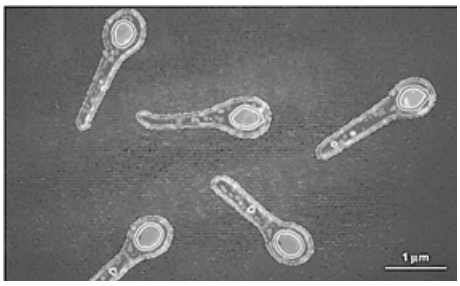


Рис. 20.9. Вегетативні клітини *Clostridium tetani* з ендоспорами

Патогенність *C. tetani* визначається секрецією сильнодіючих білкових токсинів – тетаноспазміна і тетанолізина. Тетаноспазмін пов'язаний з клітиною, функціональний блокатор, здатний з'єднуватися з рецепторами нейронів. Його токсичність полягає в прямому впливі на процес передачі нервових імпульсів у головному та спинному мозку. Тетанолізин – секретований білок, антигенно подібний з О-стрептолізином і тета-токсином *C. perfringens*. Він відноситься до мембранного токсину, викликає гемоліз еритроцитів.

Захворювання починається після проростання в рані спор збудника та продукування клітинами описаних токсинів, що гематогенним шляхом розносяться організмом. Незалежно від місця проникнення збудника в організм першими симптомами є тонічні скорочення жувальних та мімічних м'язів, потім тонічне скорочення та спазм м'язів потилиці та спини. Тіло набуває вигляду дуги. Смерть настає від асфіксії та поразки життєво важливих нервових центрів. Після перенесення захворювання імунітет відсутній, хоча тетаноспазмін має виражену імуногенну активність.

Середовищем проживання є кишківник тварин та людини. З фекаліями збудник потрапляє в ґрунт, в якому утворює спори, що зберігаються багато років. Зараження відбувається тільки при проникненні спор в організм через раневу поверхню.

Лабораторна діагностика хворих практично не проводиться через чітку клінічну картину. Вакцинопрофілактика правця проводиться шляхом

імунізації комплексними препаратами, до яких входить правцевий анатоксин. Для лікування застосовується антитоксична сироватка та протиправцевий імуноглобулін.

Bacillus anthracis – збудник сибірської виразки. Збудник сибірки *Bacillus anthracis* – грампозитивні палички з «обрубаними» кінцями, що розташовані довгими ланцюжками (рис. 20.10). У зовнішньому середовищі утворюють спори, які зберігаються в ґрунті протягом багатьох десятиліть. В організмі людей та тварин утворюють білкову капсулу. На щільних середовищах формують R-форми колоній. Мають сахаролітичні та протеолітичні властивості, розріджують желатин, що використовують для їх ідентифікації. *B. anthracis* містить два види антигенів: групоспецифічний соматичний полісахаридний та видоспецифічний капсульний.

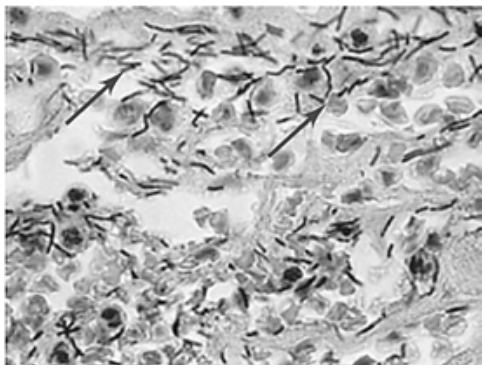


Рис. 20.10. Бактерії *Bacillus anthracis* (стрілки вказують на клітини збудника сибірки)

До факторів вірулентності *B. anthracis* відносять насамперед капсульний поліпептид, який бере участь в адгезії бактерій до клітин макроорганізму та має виражену антифагоцитарну дію. Протеази широкого спектра забезпечують інвазію. Істотну роль у патогенезі всіх форм сибірки відіграє білковий токсин, який характеризується як захиснтй антиген, летальний фактор та набряковий фактор. Летальний та набряковий фактори за механізмом дії можна віднести до цитотоксинів та функціональних блокаторів.

Залежно від вхідних воріт інфекції розрізняють шкірну, легеневу та кишкову форми сибірки. Збудник з місця проникнення заноситься макрофагами в регіонарні лімфатичні вузли, в яких розвивається запалення.

Після хвороби формується напружений гуморальний антитоксичний імунітет, у якому істотну роль відіграють антитіла – антитоксин до білкового токсину.

Сибірка – це гостра особливо небезпечна інфекція переважно тварин і людей. Вважається, що природним середовищем проживання для бактерій сибірки є грунт, в якому збудник розмножується та тривалий час збе-

рігається у вигляді спор. Інфікування ґрунту відбувається через виділення хворих тварин та поховання їх трупів. Збудник передається людям через продукти, виготовлені з інфікованого матеріалу, особливо м'яса при догляді за хворими тваринами та обробці тваринної сировини. У ряді випадків зараження відбувається через кровосисних комах, аерозольним шляхом, а також при контактах зі шкірками та шкірою від хворих тварин.

Найбільш достовірним є бактеріологічне дослідження з виділенням чистої культури збудника та його ідентифікацією з використанням тесту «перлинного намиста», яке з'являється на агарі з пеніциліном внаслідок утворення протопластів.

Для специфічної профілактики сибірки використовують живу вакцину. Специфічний протисибірковий імуноглобулін застосовують для пізньої профілактики та лікування цього захворювання. З антибіотиків використовують беталактамні, аміноглікозидні, тетрациклінові антибіотики та інші препарати.

Хелікобактер – збудник виразкової хвороби та гастриту. Нелікована інфекція *Helicobacter pylori* може призводити до рака шлунка. ВООЗ класифікувала цей збудник як канцероген. Приблизно 50% людей у світі можуть бути інфіковані хелікобактером. *H. pylori* – дрібні грамнегативні палички, лофотрихи, мікроаерофіли, продукують каталазу та оксидазу (рис. 20.11). Ростуть на складних поживних середовищах.

Рис. 20.11. *Helicobacter pylori* – збудник виразкової хвороба. Електронна мікрофотографія адгезованих *H. pylori* до клітин шлунка.

H. pylori колонізує епітеліальні клітини під слизовою оболонкою шлунка, використовуючи пілі як адгезини. *H. pylori* виробляє уреазу, що створює локалізоване лужне середовище шляхом утворення амонію при гідролізі сечовини. Лужне середовище захищає бактерію від кислоти шлунка під шаром слизу.

Токсичність хелікобактера пов'язана з цитотоксином, що діє на епітеліальні клітини, порушуючи міжклітинні контакти, та з ЛПС. З іншого боку, на поверхні клітин утворюються білки теплового шоку, що призводять до аутоімунного запалення та утворення виразок у шлунку та дванадцятипалій кишці. *H. pylori* виділяють у 80% випадків виразкових гастритів. *H. pylori* є представником нормальної мікробіоти тварин. Шляхи передачі людині остаточно не з'ясовані. Очевидно, люди заражаються аліментарним шляхом.

Для діагностики використовують тести на виявлення продуктів розпаду сечовини у повітрі, що видихає людина, визначають уреазну активність біоптату, проводять бактеріоскопічне та бактеріологічне дослідження біоптату та ПЛР. Для лікування використовують напівсинтетичні пеніциліни, аміноглікозиди, фторхінолони.

Золотистий стафілокок *Staphylococcus aureus*. Стафілококи зазвичай інфікують шкіру та рани, а також можуть викликати пневмонію. Більшість стафілококових інфекцій виникає внаслідок перенесення стафілококів у нормальну мікробіоту інфікованого від безсимптомної особи до сприйнятливої особи або через харчове отруєння.

Стафілококи – це грампозитивні коки, які діляться в кількох площинах, утворюючи зібрання клітин у вигляді грона винограду (рис. 20.12). Вони стійкі до висихання та при вирощуванні переносять високі концентрації солі (до 10% NaCl). Стафілококи легко розповсюджуються з частинками пилу в повітрі та на поверхнях. Для людини важливі два види: *Staphylococcus epidermidis* (непігментовані колонії), який зазвичай зустрічається на шкірі та слизових оболонках, і *Staphylococcus aureus* (жовто-пігментовані колонії). Обидва види є потенційними патогенами, але *S. aureus* частіше асоціюється із захворюваннями людини. Обидва види

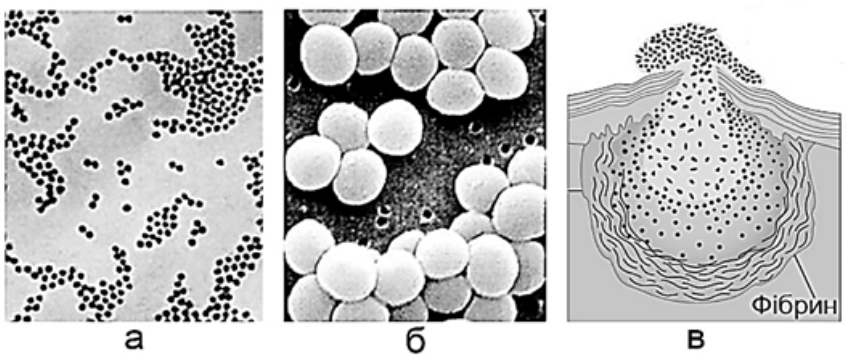


Рис. 20.12. *Staphylococcus aureus*: (а) забарвлення за Грамом, клітина має діаметр близько 1 мкм; (б) скануюча електронна мікрофотографія стафілококків; (в) схема структури фурункула, гній складається з мертвих клітин хазяїна та бактерій

часто присутні в нормальній мікробіоті верхніх дихальних шляхів і шкіри, що робить багатьох людей потенційними носіями.

Стафілококові захворювання включають акне, фурункули, прищі, імпетиго, пневмонію, остеомієліт, кардит, менінгіт і артрит. Багато з цих захворювань є гноєтвірними. Стафілококи, що викликають локалізовану шкірну інфекцію, відгороджуються згорнутою кров'ю та фібрином завдяки активності ферменту коагулази, основного фактора вірулентності.

Ключовим фактором вірулентності, що виробляється *S. aureus*, є коагулаза – фермент, який перетворює розчинний глікопротеїн крові фібриноген на нерозчинний білок фібрин, утворюючи локалізований згусток. Згортання, викликане коагулазою, призводить до накопичення фібрину навколо бактеріальних клітин, що ускладнює їх звязування імунними клітинами хазяїна та фагоцитоз. Більшість штамів *S. aureus* також виробляють лейкоцидин – білок, який руйнує лейкоцити. Вироблення лейкоцидину в ушкодженнях шкіри, таких як фурункули та прищі, призводить до руйнування клітин-хазяїна та є одним із факторів, відповідальних за накопичення гною (рис. 19.19). Деякі штами *S. aureus* продукують також інші білки вірулентності, включаючи гіалуронідазу, фібринолізин, ліпазу, рибонуклеазу та дезоксирибонуклеазу.

S. aureus може спричинити синдром токсичного шоку (СТШ), який характеризується високою лихоманкою, висипанням, блювотою, діареєю та в деяких випадках приводить до смерті.

Симптоми СТШ виникають через токсин-1 синдрому токсичного шоку, який є дуже потужним суперантигеном, що виділяється під час росту бактерій і притягує велику кількість Т-клітин до місця інфекції. Це викликає серйозну запальну реакцію, яка є летальною для близько 70% випадків.

Інфекцію *S. aureus* діагностують шляхом лабораторного посіву зразка з рани на диференціально-діагностичне середовище манітно-сольовий агар, що містить маніт та феноловий червоний індикатор pH. Оскільки *S. aureus* на відміну від інших стафілококів ферментує маніт з утворенням кислоти, колір індикатора змінюється з червоного на жовтий.

Полімеразна ланцюгова реакція використовується для ампліфікації унікальних для *S. aureus* генів з ДНК, виділеної безпосередньо з клінічного зразка, що дозволяє поставити діагноз за 24 год.

Через набуту високу резистентність MRSA до традиційних антибіотиків пеніцилінового і цефалоспоринового ряду в даний час для лікування стафілококових інфекцій використовуються кліндаміцин і різні тетрациклінові препарати. Профілактика стафілококової інфекції практично неможлива оскільки багато людей також є безсимптомними носіями *S. aureus* на шкірі або у верхніх дихальних шляхах.

20.4. Збудники, що передаються статевим шляхом

Гонококи *Neisseria gonorrhoeae* збудники гострого інфекційного захворювання слизових оболонок сечостатевих шляхів, очей, прямої кишки, горла, які передаються контактним шляхом.

Гонококи мають бобоподібну форму, розташовуються у вигляді диплококів, оточені мікрокапсулою, грамнегативні, джгутиків не мають, спори не утворюють (рис. 20.13). Для гонококів характерна наявність пілей, які відрізняються один від одного за своїми антигенними властивостями. Гонококи культивують на поживних середовищах, що містять нативний білок (сироватка крові, асцитна рідина). З вуглеводів ферментують лише глюкозу, утворюють типові для нейсерій ферменти: каталазу та цитохромоксидазу. Антигенна структура гонококів мінлива, що повязано з наявністю численних антигенних варіантів пілів.

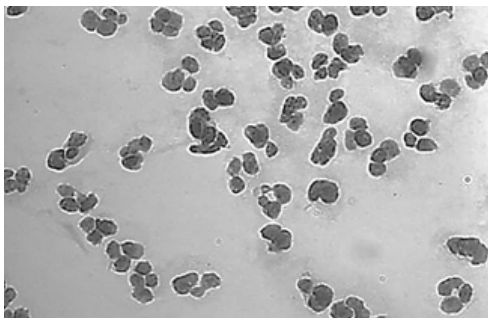


Рис. 20.13. *Neisseria gonorrhoeae* – збудник гострого запалення слизових оболонок сечостатевих шляхів

Збудник гонореї може передаватися тільки через інтимний особистий контакт. Потрапляючи в організм, гонококи використовують пілі IV типу і поверхневу молекулу під назвою протеїн II як адгезини для прикріплення до мікроворсинок клітин епітелію. *N. gonorrhoeae* є облігатно аеробним диплококом, біохімічно та філогенетично спорідненим з *N. meningitidis*. У жінок гонорея може протікати безсимптомно або в легкій формі вагініту. У чоловіків *N. gonorrhoeae* викликає інфекцію уретрального каналу з виділенням гною з уретри.

Гонококи прикріплюються до циліндричного епітелію уретри, вагінальної частини шийки матки, прямої кишки, кон'юнктиви ока, а також сперматозоїдів та найпростіших (трихомонади, амеби). Адгезія відбувається за рахунок пілей та білка зовнішньої мембрани. Здатні проникати в лейкоцити і розмножуватися в них. Токсичність гонококів обумовлена наявністю у них ЛПС, які мають пірогенну, некротичну та летальну дію.

З'єднуючись з ворсинками циліндричного епітелію уретри, а у жінок ендоцервікального каналу, гонококи проникають усередину клітин. Це

призводить до розвитку гострого уретриту, цервіциту та ураження в жінок шийки матки, придатків, у чоловіків тестикул, передміхурової залози. При екстрагенітальній локалізації гонококи можуть пошкоджувати пряму кишку та мигдалики, а також викликати бленорею (кон'юнктивіт) у новонароджених.

Протягом захворювання утворюються IgA, що пригнічують прикріплення пілей збудника до клітин слизової оболонки уретри, однак вони не здатні захистити слизову оболонку від подальшого зараження іншими генераціями гонококів зі зміненою антигенною структурою. Це призводить до повторних інфекцій та рецидивів, а також переходу захворювання в хронічну форму.

Поширеним методом діагностики є бактеріоскопічне, імунофлюоресцентне дослідження та ПЛР. Для хіміотерапії гонореї використовують бета-лактамні (пеніциліни, цефалоспорини) та інші антибіотики.

Treponema pallidum – збудник сифілісу. До групи спірохет відносяться сім родів, з яких три грають істотну роль в інфекційній патології людини. Це роди *Treponema, Borrelia* та *Leptospira*. Бактерії рухливі, спіральної форми, грамнегативні. Спірохети забарвлюють методом імпрегнації сріблом або використанням барвника Романовського-Гімза. Периплазматичні джгутики є локомоторними органелами спірохет, які повністю локалізовані всередині клітини (рис. 20.14). Спірохети – аероби або факультативні аероби, хемоорганотрофи.

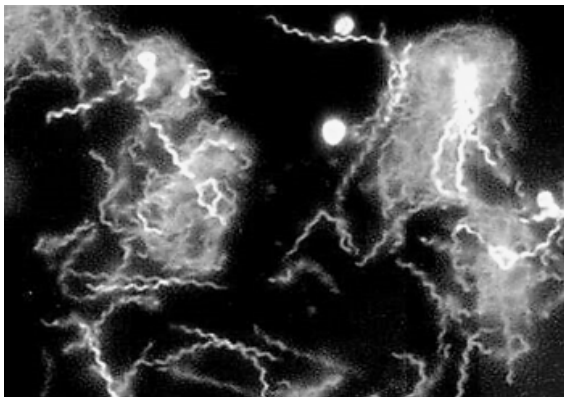


Рис. 20.14. Клітини спірохет *Treponema pallidum,* забарвлені флуоресцентними антитілами

Рід *Treponema* включає численні види, з яких *Treponema pallidum* є збудником сифілісу у людини, *T. pertenue* – збудник фрамбезії, *T. carateum* – збудник пінти.

Культивують бактерії *T. pallidum* у тканині яєчка кролика, де вони добре розмножуються та повністю зберігають свої властивості. Антигенна

структура *T. pallidum* пов'язана з білками зовнішньої мембрани, ліпопротеїдами, що використовуються як антигени у реакції Вассермана для сероді-агностики сифілісу.

До факторів вірулентності блідої трепонеми відносять білки зовнішньої мембрани та ЛПС, що виявляють свої токсичні властивості після звільнення з клітини. У патогенезі сифілісу розрізняють три стадії. При первинному сифілісі спостерігається утворення первинного вогнища – твердого шанкру в місці вхідних воріт інфекції. Друга стадія характеризується проникненням та циркуляцією збудника в крові, що супроводжується шкірними висипаннями. У третій стадії виявляються інфекційні гранульоми, локалізовані у внутрішніх органах та тканинах і враження ЦНС чи спинного мозку.

При сифілісі має місце гуморальна та клітинна імунна відповідь, але антитіла не мають протективних властивостей. Клітинна імунна відповідь пов'язана з фіксацією збудника та утворенням гранульом. Трепонеми утворюють цисти, які локалізуються у стінці кровоносних судин, та L-форми.

Сифіліс – типово антропонозна інфекція. Хворіють лише люди, які є резервуаром інфекції. Передача інфекції відбувається переважно статевим шляхом. У навколишньому середовищі трепонеми швидко гинуть.

При первинному сифілісі матеріалом для дослідження є виділення з твердого шанкру, яке піддається темнопольній мікроскопії. Проводять серодіагностику, реакцію преципітації з неспецифічними антигенами, реакції іммобілізації трепонем, імунофлюоресценції.

Вакцинопрофілактика не розроблена. Лікування на ранніх стадіях захворювання легко досягається пеніциліном G або доксицикліном.

20.5. Збудники, що передаються фекально-оральним шляхом

Vibrio cholerae є збудником холери – гострої діарейної інфекції, що передається фекально-оральним шляхом від людини до людини при вживанні забрудненої води, продуктів харчування та при побутових контактах. Без належного лікування може призвести до смерті.

Vibrio cholerae – вигнута грамнегативна поліморфна паличка, монотрих (рис. 20.15). Вібріони відносяться до хемоорганотрофів з окиснювальним та бродильним типами метаболізму, факультативні аероби. Продукують такі ферменти як лецитиназа, лізиндекарбоксилаза, орнітиндекарбоксилаза, нейрамінідаза.

Холерні вібріони мають два антигени: О-антиген типоспецифічний термолабільний та Н-антиген джгутиковий видоспецифічний термостабільний. Вібріони, що відносяться до серогруп 02, 03, 04 можуть викликати ентерити та гастроентерити. Часто виділяють вібріони, що не аглютинуються 01-антисироваткою, які називають НАГ-вібріонами.

Холерний вібріон за допомогою джгутика та ферменту муцинази проникає в слизову оболонку тонкої кишки, прикріплюється до ентероцитів

Рис. 20.15. Електронна фотографії клітин *Vibrio cholera* збудника холери

та колонізує слизову оболонку кишки. Основним фактором патогенності вібріона є секреція білкового токсину холерогена, який, як і багато інших екзотоксинів, складається з двох субодиниць – А і Б. Субодиниця Б забезпечує прикріплення до клітин кишкового епітелію, що сприяє перенесенню субодиниці А через мембрану в цитоплазму, яка забезпечує токсичність шляхом активації аденілатциклази.

Це призводить до збільшення кількості цАМФ (циклічний аденозинмонофосфат) і, відповідно, – до порушення водно-сольового обміну, обумовленого виділенням іонів натрію та хлору та зневоднення організму (організм втрачає до 30 л рідини на добу). Одночасно блокується АТФ-аза, що призводить до порушення внутрішньоклітинного транспорту та втрати води, а також порушення міжклітинних контактів. Крім того холерний вібріон, так само як інші грамнегативні бактерії, утворює ендотоксин (ЛПС), який захищає збудника від фагоцитозу.

При холері спостерігається гуморальна імунна відповідь, що характеризується появою антитоксичних та антибактеріальних імуноглобулінів. Секреторні імуноглобуліни (SigA) перешкоджають адгезії вібріона.

Єдиним джерелом інфекції є хвора людина та бактеріоносії. При холері El-Tor відзначається тривале бактеріоносійство та численні атипові форми хвороби. Зараження людини відбувається через воду та продукти харчування. Можливе зараження контактним шляхом.

Холера є найдавнішою інфекцією, яка періодично поширювалася на багато країн і континентів, забираючи мільйони життів. Зокрема, спалах холери в Одесі відбувся в 1970 році, який був частиною сьомої світової холерної пандемії.

Для лабораторної діагностики використовують бактеріоскопічний та імунофлюоресцентний методи, бактеріологічне дослідження з виділенням чистої культури збудника, ДНК-зонди та ПЛР аналіз. Для вакцинопрофі-

лактики використовують корпускулярну вбиту вакцину, холероген-анатоксин та живу вакцину для перорального застосування. Для профілактики та лікування найчастіше застосовують тетрациклін.

Кишкові бактерії родини *Enterobacteriaceae.* До родини кишкових бактерій або ентеробактерій належать мікроорганізми, для значної більшості яких місцем існування є кишківник людини та хребетних тварин. Родина включає 30 родів, з яких найбільш патогенними для людини є *Shigella, Salmonella, Escherichia, Proteus, Klebsiella, Yersinia* та ін. Патогенна дія ентеробактерій пов'язана з білками зовнішньої мембрани, капсульним полісахаридом, пілями та різними токсинами. Вірулентність ентеробактерій визначається адгезивною здатністю між поверхневими структурами бактерій та рецепторами епітеліальних клітин. Як приклад, розглянемо представників родів *Escherichia, Shigella* та *Salmonella.*

Ешерихії. Рід *Escherichia* містить численні біовари та серовари, що відрізняються деякими біохімічними, антигенними та патогенними властивостями. Вони зустрічаються в кишківнику майже всіх видів савців, птахів, риб та рептилій. Вид *Escherichia coli* включає умовно-патогенні штами, які є постійними мешканцями кишківника людини. За своїми морфологічними та тинкторіальними властивостями *E. coli* нагадує інші ентеробактерії (рис. 20.16). Деякі штами мають виражену капсулу або мікрокапсулу та формують на щільному середовищі S- та R-форми колоній.

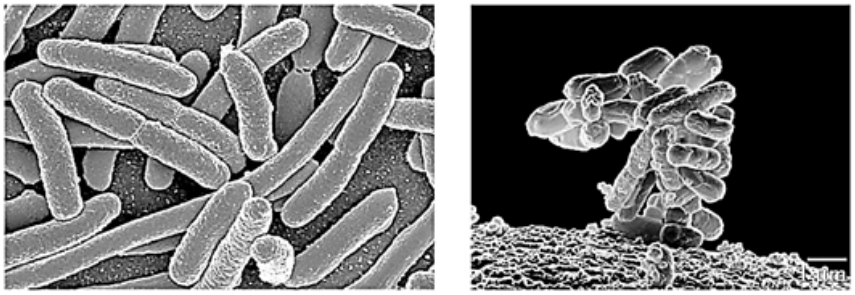


Рис. 20.16. Електронні фотографії клітин *Escherichia coli* (а), бактерії кишкової палички, що утворюють «п'єдестал» на клітинах епітелію в кишечнику (б)

E. coli – факультативний анаероб, добре росте на звичайних поживних середовищах, має високу ферментативну активність. Ферментує глюкозу та інші вуглеводи, а більшість штамів ферментують лактозу з утворенням кислоти та газу.

Кишкова паличка має складну антигенну структуру, яка містить соматичний О-антиген, капсульний К-антиген та джгутиковий Н-антиген. у бактерій роду пов'язані з ЛПС клітинної стінки. О-антигенами є ЛПС кліт-

тинної стінки. Описано близько 170 О-серогруп *E. coli,* з яких більшість мають антигенні зв'язки з іншими ентеробактеріями. Патогенність для людей пов'язана із певними серогрупами.

За патогенетичним та епідеміологічними особливостями захворювань, викликаних *E. coli,* їх можна поділити на збудників ендогенних інфекцій – гнійно-запальних процесів різної локалізації та збудників гострих кишкових захворювань (діареї). Ентеропатогенні ешерихії поділяють на ентеропатогенні кишкові палички – збудники коліентеритів (викликають сальмонелоподібні інфекції); ентеротоксигенні кишкові палички (викликають холероподібні інфекції); ентероінвазивні кишкові палички (викликають дизентерієподібні інфекції) та ентерогеморагічні (викликають геморагічний коліт).

Кишкова паличка є представником нормальної мікробіоти людей і з випорожненнями виділяється в навколишнє середовище, тому її використовують як санітарно-показовий мікроорганізм, за яким оцінюють забруднення води фекаліями (колі-титр, колі-індекс). У воді та ґрунті ешерихії виживають кілька тижнів. Джерелом інфекції є хворі люди чи бактеріоносії. Зараження відбувається інфікованою їжею або водою.

Ідентифікацію проводять за морфологічними та біохімічними ознаками та сероваром збудника. Для профілактики важливе значення має виявлення хворих та носіїв, їх ізоляція та лікування. Для лікування хворих використовують пробіотичні препарати, що містять молочнокислі бактерії, які є антагоністами *E. coli*, та антибіотики, що діють на грамнегативні бактерії – хлорамфенікол, цефалоспорини та фторхінолони.

Шигели. Бактерії роду *Shigella* є збудниками бактеріальної дизентерії або шигельозу. Дизентерія – поліетіологічне захворювання, яке викликають різні види бактерій роду *Schigella*. Рід поділяється на чотири види – *S. dysenteriae, S. flexneri, S. boydii* та *S. sonnei*.

За своїми морфологічними властивостями шигели мало відрізняються від ешерихій і сальмонел. Однак вони позбавлені джгутиків, багато штамів мають пілі. Збудники дизентерії – хемоорганотрофи, невибагливі до поживних середовищ. Шигели менш ферментативно активні, ніж інші ентеробактерії, не утилізують лактозу та сахарозу, за винятком *S. sonnei*.

Шигели як і ешерихії та сальмонели мають складну антигенну структуру. У складі їх клітинних стінок є О- антигени, а в деяких видів і К-антигени. За хімічною структурою вони аналогічні до антигенів ешерихій, мають перехресні антигенні зв'язки з іншими ентеробактеріями.

Вірулентність шигел визначається їх адгезивними властивостями. Вони адгезуються до ентероцитів товстої кишки за рахунок власної мікрокапсули, потрапляють у підслизовий шар, де фагоцитуються макрофагами. При цьому макрофаги гинуть і виділяється велика кількість цитокінів, які разом із лейкоцитами викликають запальний процес. В результаті порушу-

ються міжклітинні контакти та велика кількість шигел проникає в активовані ними ентероцити, де вони розмножуються та поширюються по сусідніх клітинах. Це призводить до руйнування епітелію слизової оболонки та розвитку виразкового коліту.

Шигели продукують ентеротоксин та цитотоксин, який вражає ентероцити, нейрони та клітини міокарда. При руйнуванні шигел звільняється ендотоксин (ЛПС) клітинної стінки, який надходить в кров і впливає на нервову та судинну системи.

Фактори патогенності шигел закодовані в гігантській плазміді, а синтез токсину Шига – у хромосомному гені. Таким чином, патогенез дизентерії визначається адгезивними властивостями збудників, їх проникненням в ентероцити товстої кишки, внутрішньоклітинним розмноженням та продукцією токсинів.

При дизентерії розвивається місцевий та загальний імунітет. При місцевому імунітеті важливе значення мають секреторні IgA (SIgA), які перешкоджають прикріпленню та пенетрації шигел в епітеліальні клітини.

Місцем, де мешкають шигели, є товста кишка людини. Джерелом інфекції є хворі та бактеріоносії. Зараження відбувається через прийом інфікованої їжі чи води. Таким чином, основний шлях передачі інфекції – аліментарний. У фекаліях шигели зберігаються до 10 год.

Для лабораторної діагностики виділяють чисту культуру збудника шляхом посіву фекалій хворого на диференціально-діагностичне поживне середовище з подальшою її ідентифікацією на середовищах строкатого ряду та за антигенними властивостями в реакції аглютинації для визначення виду та серовару. Для лікування застосовують фторхінолони та рідше – інші антибіотики.

Сальмонели. Рід *Salmonella* надзвичайно обширний і включає велику кількість видів (*S. typhi, S. paratyphi, S. enteritidis, S. typhimurium* та ін.). Сальмонели – дрібні палички, оточені мікрокапсулою, мають перитрихіально розташовані джгутики (рис. 19.2), відрізняються від *E. coli* меншою ферментативною активністю, є лактозонегативними бактеріями.

Сальмонели як і ешерихії мають О- та Н-антигени. Деякі сальмонели мають К-антиген. За своєю хімічною структурою О-антигени сальмонел аналогічні антигенам ешерихій. Вони відрізняються один від одного лише структурою кінцевих ланок полісахаридного компонента ЛПС, що визначає імунохімічну специфічність грамнегативних бактерій.

Аналіз антигенної будови є обов'язковим елементом мікробіологічної діагностики сальмонельозу. В основу схеми Кауфмана та Уайта покладено спільність О-антигенів сальмонел, об'єднаних у серологічні групи, що позначаються літерами латинського алфавіту: A, B, 3, D, E, F та ін.

До групи збудників гастроентероколітів належать сальмонели, які клінічно проявляються у людей у вигляді гастроентероколітів, що виника-

ють в результаті харчових токсикоінфекцій. До них відносяться різноманітні серовари *S. typhimurium, S. enteridіdis, S. anatum* та ін.

До факторів вірулентності відносяться мікрокапсули, білки зовнішньої мембрани клітинної стінки, що сприяють адгезії на ентероцитах тонкої кишки. Сальмонели проникають в ентероцити та фагоцитуються макрофагами. Багато з них, наприклад, *S. typhimurium*, мають плазміду ColB, яка кодує здатність відбирати Fe від гемоглобіну. При руйнуванні сальмонел звільняється ендотоксин (ЛПС). Крім того, сальмонели продукують ентеротоксин, механізм дії якого полягає в порушенні водно-сольового обміну, що призводить до діареї та зневоднення організму. Захворювання зазвичай протікає протягом 3–5 днів.

При сальмонельозах має місце гуморальна та частково клітинна імунна відповідь, що призводить до розвитку напруженого імунітету, на відміну черевного тифу та паратифів. Сальмонельози є зоонозно-антропонозними інфекціями. Зараження відбувається при вживанні інфікованого м'яса та яєць. Сальмонели можуть розмножуватися при 4–6 °С і довго зберігатись в заморожених м'ясних виробах.

Остаточний діагноз харчової токсикоінфекції встановлюють лише після виділення збудника з організму хворих людей та харчових продуктів. Бактеріологічні дослідження з визначенням серовара виділеної чистої культури сальмонели проводять для виявлення джерела інфекції. Профілактика сальмонельозів полягає в проведенні ветеринарно-санітарних та інших протиепідемічних заходів.

Питання для самостійного контролю

1. Дайте характеристику збуднику дифтерії та дифтерійному токсину.
2. Що таке туберкулін та його застосування?
3. Охарактеризуйте фактори адгезії збудника кашлюку.
4. Опишіть резервуари інфекції збудника чуми.
5. Охарактеризуйте механізм дії токсину збудника ботулізму.
6. Чому збудник сибірської виразки відносять до виду біологічної зброї?
7. Яким чином хелікобактер захищається від кислоти шлунка?
8. Які ферменти є важливим фактором вірулентності золотистого стафілокока?
9. Дайте характеристику факторам вірулентності збудника холери.
10. Охарактеризуйте захворювання, що викликає гонокок *Neisseria gonorrhoeae*?

РОЗДІЛ 21
АНТИБІОТИКИ ТА АНТИМІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ

Антибіотики – це низькомолекулярні органічні сполуки мікробного, рослинного або тваринного походження, здатні в невеликих концентраціях пригнічувати ріст або викликати загибель чутливих до них організмів та клітин. Існує також велика кількість створених напівсинтетичних сполук, що відрізняються внесеними модифікаціями функціональних груп в природні антибіотики (н. п., ампіцилін і амоксицилін). Синтетичні речовини, що виявляють протимікробну активність, називають антимікробними хіміопрепаратами (н. п., сульфаніламіди, фторхінолони).

Антибіотики відносять до вторинних метаболітів, оскільки вони безпосередньо не залучені до процесів метаболізму та розмноження мікроорганізмів-продуцентів. Відсутність вторинного метаболіту не спричиняє раптової загибелі, на відміну від первинних метаболітів, а лише погіршує життєдіяльність або плодовитість продуцента, або взагалі не призводить до будь-яких фенотипових змін.

Про *біологічну функцію антибіотиків* для подуцента відомо не багато. Коли різні види мікроорганізмів використовують однакові джерела енергії та біогенні елементи, вони вступають між собою в конкурентну боротьбу за обмежені поживні ресурси та територію. Важливою стратегією в такій конкуренції може бути продукування органічних токсичних речовин як «атакувальної зброї» проти інших мікрокроорганізмів, що може забезпечувати їм певні поживні переваги.

Однак, експериментально важко підтвердити наскільки велика роль антибіотиків у конкурентних відносинах між мікроорганізмами в природних біоценозах. Відомо небагато досліджень, де було показано, що при внесенні в ґрунт мікроорганізму, який продукує антибіотик, чисельність популяції інших мікроорганізмів зменшується. Однак відомо, що при спільному культивуванні в умовах лабораторії продуцента антибіотика з іншими мікроорганізмами, утворення антибіотичних речовин зростає.

До утворення антибіотиків ведуть різні специфічні біохімічні шляхи, що належать до вторинного метаболізму. Вони та ферменти, що їх забезпечують, не є необхідними для росту та виживання мікроорганізмів. У цьому випадку в процесі еволюції організм повинен звільнити свій генетичний апарат від генів, що забезпечують синтез антибіотиків, у разі їх марності як від баласту шляхом відповідних перебудов. Оскільки ці гени не елімінують, можна зробити висновок, що антибіотичні сполуки все ж забезпечують їх продуцентам певну селективну перевагу в природних умовах навіть при тому, що утворюються в дуже малих кількостях. Отже питання про біологічне значення антибіотиків для їх продуцентів в умовах їх природного проживання ще чекає на своє вирішення.

21.1. Тестування ефективності дії

Антимікробна дія антибіотиків вимірюється в одиницях дії (ОД), що містяться в 1 мл розчину препарату або 1 мг хімічно чистої речовини. Зазвичай, 1 мкг хімічно чистого препарату відповідає 1 ОД.

Визначення ефективності протимікробних препаратів проти конкретних збудників є важливим для правильної терапії, при пошуку та створенні продуцентів нових антибіотиків. При відборі антибіотичних препаратів для терапії важливим показником є відсутність помітного токсичного впливу на організм людини.

Нешкідливість даних препаратів встановлюється за допомогою хіміотерапевтичного індекса – відношення мінімальної терапевтичної дози до максимальної дози, яку може витримати організм. При індексі менше одиниці препарат може бути рекомендований для лікування відповідної інфекції, оскільки його терапевтична доза буде меншою за витриману дозу.

Тестування може показати, які антибіотики є найбільш ефективними проти збудника, і вірно призначити терапевтичну дозу. Чутливість мікроорганізмів до антибіотиків визначають за показниками мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) та мінімальної летальної концентрації (МЛК) дифузійними методами та методами серійних розведень.

Мінімальна інгібуюча концентрація – це найнижча концентрація антибіотика, яка пригнічує видимий ріст досліджуваного мікроорганізму в рідкій культурі або на щільному середовищі. Для визначення МІК певні концентрації антибіотика вносять у середовище, яке засівають культурою досліджуваного мікроорганізму та після інкубації оцінюють відсутність видимого росту.

Метод серійних розведень можна проводити як в бульйоні, так і на агарі. Для цього ряд пробірок, що містять бульйон з концентрацією антибіотиків у діапазоні від 0,1 до 128 мг на мілілітр (двократні розведення), інокулюють досліджуваним організмом зі стандартною щільністю. МІК визначається як найнижча концентрація антибіотика, за якої відсутній ріст після 16–20 годин інкубації. Створено роботизовані прилади, в яких мікроорганізм засівають в лунки мікропланшетів, що містять середовище з серією розведень антибіотика, інкубують культуру, зчитують дані та інтерпретують результати.

Для *визначення мінімальної летальної концентрації* проби з пробірок, у яких відсутній ріст, інокулюють у свіже середовище без антибіотиків. При цьому найнижча концентрація антибіотика, яка не підтримує ріст мікроорганізму, буде МЛК. Тест з розведення антибіотика в агарі дуже схожий на тест розведення в бульйоні. Чашки, що містять поживний агар з різним вмістом антибіотика, засівають і перевіряють на наявність росту.

Використовують дві модифікації дифузійного методу – диско-дифузійний та Е-тест. В *основу дифузійних методів* визначення чутливості по-

кладена дифузія антибіотика із носія (паперовий диск) у щільне середовище. Цей аналіз досить простий. На щільне поживне середовище, засіяне досліджуваним мікроорганізммом, накладають невеликі паперові диски, кожен з яких просочений окремим антибіотиком. Антибіотик дифундує з диска в агар та створює градієнт концентрації. Після інкубації навколо диска антибіотика утворюється зона відсутності росту мікроорганізма, якщо антибіотик пригнічує ріст бактерій. Чим більша зона навколо диску, тим більш сприйнятливий збудник. Розмір зони також залежить від початкової концентрації антибіотика на диску, його розчинності та швидкості його дифузії в агарі. Таким чином, розмір зони не може бути використаний для прямого порівняння ефективності різних антибіотиків.

В *Е-тесті* для визначення чутливості збудника до антибіотика використовується полімерна смужка Etest® розміром 0,5 х 6,0 см (рис. 21.1).

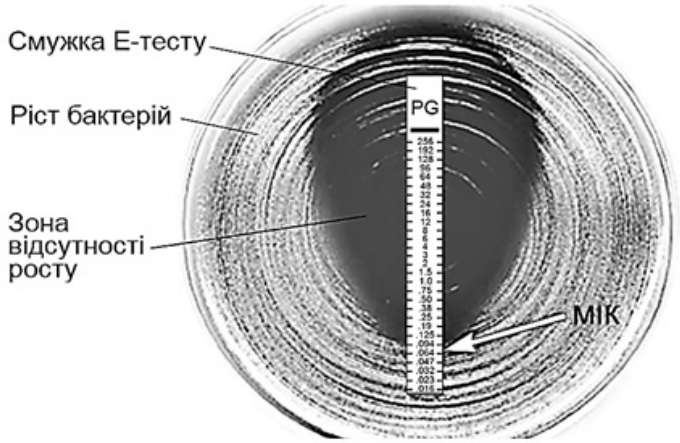


Рис. 21.1. Чашка з Е-тестом визначення МІК

Кожна смужка містить градієнт антибіотика, позначений шкалою значень МІК. Мікробний ізолят, який потрібно перевірити на антимікробну чутливість, засівають на поверхню агаризованого середовища та накладають смужку Е-тесту. Через 24–48 год інкубації з'являється зона відсутності росту у формі еліпса. Значення МІК визначається в точці, де еліпсоподібна зона інгібування росту перетинає шкалу на смужці Е-тесту, як показано стрілкою на рис. 21.1.

21.2. Продуценти антибіотиків

До синтезу антибіотиків здатні головним чином гриби порядку *Aspergillales*, актиноміцети та деякі інші бактерії. На першому місці за хімічним різноманіттям синтезованих речовин стоять стрептоміцети. Наразі відкрито більше 25 тисяч антибіотичних сполук, що синтезуються бак-

теріями, грибами, рослинами та тваринами, але практичне застосування знайшли близько 150 сполук. За сучасними оцінками, виявлено більше 1 700 антибіотиків мікробного походження, з них 45% утворюють актиноміцети, насамперед представники роду *Streptomyces*.

Через загострення проблем, що виникають у медичній практиці при застосуванні антибіотиків, основними з яких є швидкий ріст резистентності до них патогенних мікроорганізмів, пошук нових антибіотиків знову набув ще більшої актуальності. Природний потенціал мікроорганізмів як джерела нових антибіотичних сполук ще не вичерпаний. Зараз найбільш перспективним джерелом низькомолекулярних антибіотичних сполук вважаються мікроорганізми морського походження, оскільки морська мікробіота є значно давнішою за мікробіоту суходолу і значно менш дослідженою в усіх аспектах.

Молекулярно-біологічний аналіз геномів мікроорганізмів свідчить, що вони потенціально здатні синтезувати в 10 разів більше вторинних метаболітів, ніж це виявлено у ході традиційного скринінгу. Більшість із виявлених кластерів генів синтезу антибіотичних метаболітів є мовчазними. Сучасні методи генної інженерії та молекулярної біотехнології дають надію сподіватись на застосуваввння їх для отримання надпродуцентів нових антибіотиків.

Отже, структурна різноманітність природних антибіотичних речовин залишається далеко не вичерпаною, а розуміння механізмів еволюції цієї різноманітності, її експериментальне моделювання мають як теоретичне так і практичне значення.

21.3. Класифікація антибіотиків

Антибіотики класифікують і характеризують за походженням, хімічним складом, механізмами інгібуючої дії на клітини, антимікробними спектрами.

За *хімічним складом* антибіотики поділяють на кілька груп:

1. Беталактамні антибіотики або беталактами – азотвмісні гетероциклічні сполуки з беталактамним кільцем. До ним відноситься група пеніциліну, що включає природний антибіотик бензилпеніцилін та напівсинтетичні пеніциліни (метицилін, оксацилін, ампіцилін, карбеніцилін та ін.), та група цефалоспоринів (цефалоридин, цефапексин, цефамандол та ін.).

2. Тетрациклін та його напівсинтетичні похідні: окситетрациклін, хлортетрациклін, морфоциклін, метациклін, диоксициклін, віброміцин, які складаються з чотирьох конденсованих бензольних кілець з різними радикалами.

3. Аміноглікозиди, до яких належить група стрептоміцину та аміноглікозидні антибіотики, що містять дезоксистрептамін: неоміцин, мономіцин, канаміцин, амікацин, пентаміцин та ін.

4. Макроліди – сполуки, що містять макроциклічне лактонне кільце (еритроміцин, олеандоміцин).

5. Левоміцетин, що є синтетичною речовиною, ідентичною природному антибіотику хлорамфеніколу, до складу якого входить нітрофеніл, дихлорацетамін та пропандіол.

6. Рифаміцини, до яких належать природний антибіотик рифаміцин та його напівсинтетичне похідне рифампіцин. Вони мають своєрідну складну хімічну структуру, в яку вхоцит макроциклічне кільце.

7. Полієнові антибіотики – ністатин, леворин, амфотерицин В, що мають кілька сполучених подвійних зв'язків (CH=CH)-.

За *спектром чутливих мікроорганізмів* антимікрбні сполуки можуть бути класифіковані на антибактеріальні, антигрибкові, антипротозойні та антивірусні. За антимікробним спектром антибіотики поділяють на дві групи: вузького та широкого спектру дії. Так, бензилпеніцилін згубно діє тільки на деякі грампозитивні бактерії, полієнові антибіотики ністатин, леворин, амфотерицин В – лише на деякі гриби та найпростіші. Антибіотики з широким спектром дії активні проти мікроорганізмів різних груп (тетрацикліни, левоміцетин, аміноглікозиди, макроліди, рифампіцин).

За ступенем антибіотична дія визначається як *статична*, коли припиняється ріст мікроорганізму, або *цидна*, коли дія спричиняє загибель мікроорганізму. Наприклад, бензилпеніцилін, цефалоспорини, рифаміцини мають бактерицидну дію; левоміцетин, тетрациклін, макроліди – бактеріостатичну дію.

Статичні агенти оборотно пригнічують ріст, якщо агент видаляється, мікроорганізм відновлює ріст. Антимікробний агент, що вбиває цільовий патоген, в менших концентраціях може діяти як статичний.

21.4. Механізми дії та мішені

За механізмом антимікробної дії антибіотики значною мірою відрізняються один від одного. «Мішенями» для їх інгібуючої дії служать біохімічні реакції, необхідні для біосинтезу та функціонування певних морфологічних компонентів, або органели мікробної клітини: клітинна стінка, цитоплазматична мембрана, рибосома, нуклеоїд. Залежно від механізму дії на цільовий організм антибіотики ділять на тих, що:

• інгібують синтез клітинної стінки (пеніциліни, бацитрацин, ванкоміцин, цефалоспорини та ін.);

• порушують функціонування цитоплазматичної мембрани (граміцидини, валіноміцин, поліени, трихоміцин та ін.);

• пригнічують синтез РНК (рифампіцини, стрептивацини та ін.);

• пригнічують синтез ДНК (мітоміцин С, актиноміцин та ін.);

• інгібують синтез білка (хлорамфенікол, стрептоміцин, канаміцин, еритроміцин, лінкоміцин, пуроміцин, фузидієва кислота та ін.).

Багато антибіотиків націлені на процеси реплікації ДНК, синтез РНК і білка (рис. 21.2). Так, хінолони, такі як ципрофлоксацин, діють на ДНК-гіразу грамнегативних бактерій і топоізомеразу IV у грампозитивних бактерій, перешкоджаючи розплітанню та реплікації ДНК. Коли в клітині, яка росте, транскрипція пригнічується та не утворюється іРНК, синтез білка також не відбувається.

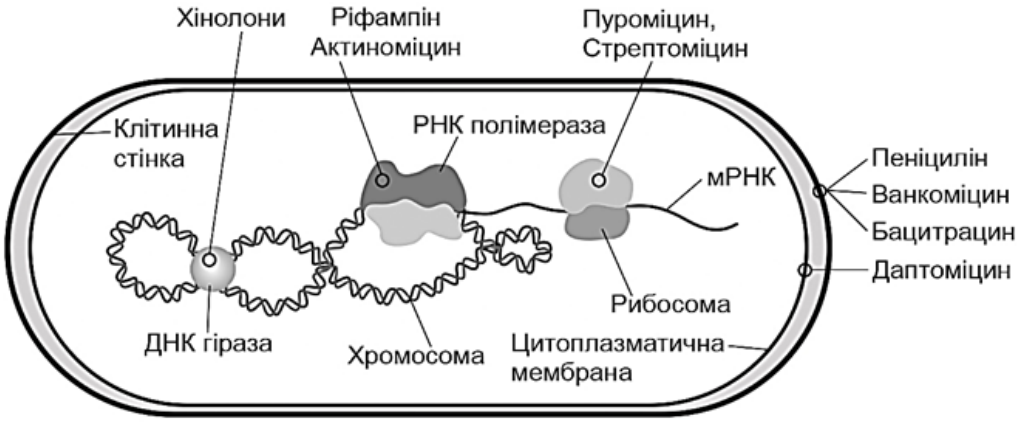


Рис. 21.2. Мішені в мікробній клітиніі, на які діють антибіотики

Антибіотики рифампіцин і актиноміцин запобігають синтезу РНК шляхом блокування активного центру РНК-полімерази (рифампіцин) або зв'язування з головною боріздкою в ДНК.

Багато антибіотиків пригнічують ріст бактерій тим, що впливають на деякі етапи синтезу білка (рис. 21.2). Наприклад, антибіотик пуроміцин в своїй молекулі містить ділянку, яка імітує 3'-кінець тРНК, і ця структурна мімікрія призводить до специфічного зв'язування антибіотика з 70S рибосомою, що викликає розрив ланцюга та ефективно припиняє синтез білка.

Аміноглікозидні антибіотики, такі як стрептоміцин, специфічно спрямовані на 16S рРНК 30S рибосоми та призводять до того, що рибосома неправильно зчитує мРНК, що спричиняє утворення помилок в будові білків, які накопичуються та зрештою пригнічують ріст клітин.

Іншими поширеними мішенями антибіотиків є клітинна мембрана, клітинна стінка та пов'язані з ними метаболічні процеси (рис. 21.2). Даптоміцин – ліпопептид, що продукують деякі види стрептоміцетів, специфічно зв'язується із залишками фосфатидилгліцерину в бактеріальній клітинній мембрані, що призводить до утворення пор і деполяризації мембрани та загибелі клітини.

Деякі антибіотики впливають на зовнішню мембрану грамнегативних бактерій. Наприклад, поліміксини – це циклічні пептиди, чиї довгі гідрофобні хвости спеціально націлені на шар ліпополісахариду, що порушує цілісність структури мембрани та викликає загибель клітин.

Дія декількох β-лактамних антибіотиків (пеніцилін, цефалоспорин та їх похідні) спрямована на синтез пептидоглікану клітинної стінки бактерій. Ці антибіотики пригнічують ріст шляхом втручання в процес утворення поперечних зв'язків між залишками мурамової кислоти, що забезпечують структурну стійкість пептидоглікану.

Подібним чином антибіотик ванкоміцин пригнічує синтез пептидоглікану в грампозитивних бактеріях шляхом зв'язування з пентапептидом попередника пептидоглікану та запобігання утворенню транспептидазами пептидних зшивок.

Антибіотик бацитрацин запобігає синтезу пептидоглікану шляхом зв'язування з транспортною системою попередника пептидоглікану і доставці нових попередників пептидоглікану до місця його синтезу. У результаті нестача прекурсорів для латання прогалин послаблює клітинну стінку та призводить до лізису клітини.

Відомо багато інших антибіотиків, що націлені на інші мішені клітин мікроорганізмів, в першу чергу, це особливі метаболічні реакції, однак основна маса терапевтично корисних антибіотиків вражає одну з названих мішеней.

21.5. Резистентність до антибіотиків

Для того щоб вижити під тиском антибіотиків, які виробляють інші мікроорганізми (або своїх власних антибіотиків), бактерії створили необхідні для цього генетично закодовані механізми резистентності, які можна поділити на чотири групи: модифікація мішені, ферментативна інактивація, вилучення з клітини за допомогою ефлюксних насосів і обхідні метаболічні шляхи (рис. 21.3).

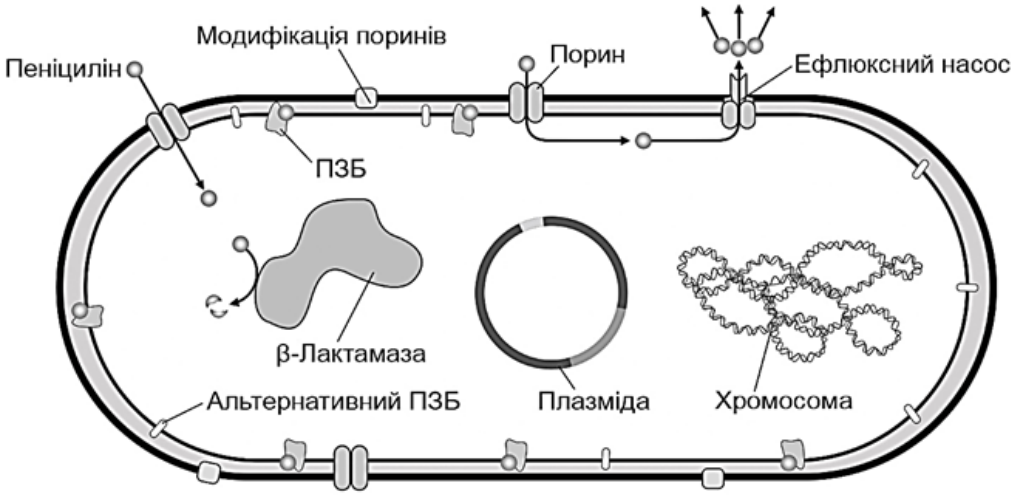


Рис. 21.3. Механізми антибіотикорезистентності. ПЗБ – пеніцилін, що зв'язує білок

Стійкість до антибіотиків можуть сформувати випадкові хромосомні мутації. Наприклад, спонтанні мутанти бактерій, стійкі до антибіотика рифампіцину, що пригнічує активність РНК-полімерази, можна отримати шляхом простого впливу антибіотика на велику популяцію клітин. За таких умов відбираються спонтанні мутанти, що продукують змінену РНК-полімеразу, на яку не впливає рифампіцин.

Ще однією ефективною стратегією резистентності є відкачування антибіотиків, що потрапили в клітину, за допомогою ефлюксних насосів. Такі механізми поширені у грамнегативних бактерій. Ефлюксні насоси виводять з клітини самі різні молекули, включаючи власні продукти метаболізму та чужі, привнесені в клітину антибіотики (рис. 21.3). Викачування знижує внутрішньоклітинну концентрацію антибіотика та таким чином дозволяє клітині виживати при більш високих його зовнішніх концентраціях.

Багато таких насосів транспортують різні антибіотики за межі клітини, що створює проблему множинної резистентності при антибіотикотерапії. Ефлюксна система AcrAB-TolC кишкової палички є одним з найбільш охарактеризованих ефлюксних насосів і може викачувати кілька антибіотиків, включаючи рифампін, хлорамфенікол і фторхінолони.

Знаходження бактерій у створеній біоплівці підвищує резистентність їх до антибіотиків, що ускладнює лікування інфекцій, спричинених бактеріями, які утворюють біоплівку. Екзополісахаридний матрикс біоплівки знижує проникність антибіотиків в клітину та тим самим додатково підвищує стійкість, обумовлену функціонуванням ефлюксного насосу. Наприклад, активність генів, що кодують ефлюксний насос AcrAB-TolC у кишкової палички, підвищується, коли клітини формують біоплівку. Бактерії *Pseudomonas aeruginosa*, модельний мікроорганізм з вивчення біоплівки, кодує кілька множинних ефлюксних насосів, які також є більш активними, коли бактерії ростуть у формі біоплівки.

Обхідні метаболічні шляхи як форма антибіотикорезистентності виникають, коли мішень антибіотика більше не має важливого значення для метаболізму або виживання бактерії. Наочним прикладом цього є метицилін-резистентний золотистий стафілокок (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), збудник різноманітних, навіть небезпечних для життя інфекцій. Метицилін є β-лактамним антибіотиком, який, як й інші пеніциліни, спрямований на активність білків, що зв'язують пеніцилін. Однак, на відміну від багатьох похідних пеніциліну, метицилін стійкий до розщеплення β-лактамазою. Хоча багато штамів *S. aureus* гинуть під дією метициліну, штами MRSA містять хромосомний (або геномний) острівець ДНК розміром від 20 до 60 т. п. н., який називається хромосомною генною касетою стійкості стафілококів до метициліну. Ці гени кодують альтернативний пеніцилін-зв'язуючий білок під назвою MecA, який не розпізнається метициліном чи іншими β-лактамами (рис. 21.3). Цікаво, що

бактерії штамів MRSA синтезують МесА тільки в присутності метициліну або інших β-лактамів.

Хромосомний острівець штамів MRSA також має мобільний елемент, який кодує стійкість до антибіотиків еритроміцину та спектиноміцину. Таким чином, генна касета, ймовірно, може горизонтально переміщуватися та поширювати множинну резистентність, що робить MRSA ще більш серйозною проблемою для клінічної медицини.

Крім чутливості та резистентності до антибіотиків існує інший варіант відповіді бактерій на дію антибіотика – це *персистенція*. Така стійкість виникає, коли популяція чутливих до антибіотиків бактерій утворює специфічні клітини, які тимчасово стають толерантними до антибіотиків. Такі стійкі клітини (персистери) генетично ідентичні іншим клітинам популяції, чутливим до антибіотиків. Ця ознака не є спадковою, не передається генетично. Натомість персистери, які утворюються зі швидкістю від 10^{-6} до 10^{-4} в популяціях клітин експоненціальної культури, переходять у стан спокою, в якому клітини залишаються життєздатними.

Оскільки антибіотики спрямовані на активні функціонуючі процеси, то в стані спокою антибіотик не може їх пригнічувати та вбивати клітину. Коли дія антибіотика припиняється, персистуючі (сплячі) клітини виходять із стану спокою та починають рости. Вважається, що така стійкість є причиною повторних інфекцій *Mycobacterium tuberculosis* у хворих на хронічний туберкульоз і *Pseudomonas aeruginosa* у тих, хто страждає на муковісцидоз.

Стійкість до антибіотиків може бути генетично закодована в бактеріальній хромосомі. Певні гени резистентності існують в різноманітних мобільних генетичних елементах, переважно плазмідах, що можуть легко передаватися між бактеріями одного або різних видів шляхом горизонтального перенесення.

Стійкі до антибіотиків клінічні штами бактерій часто містять гени резистентності до антимікробних препаратів, що розташовані в R-плазмідах. Ферменти, закодовані в генах R-плазмід, забезпечують резистентність до антибіотика з будь-яким відомим механізмом, але частіше це ті, що інактивують антибіотик, змінюючи його структуру шляхом хімічної модифікації або розщеплення.

Класичним прикладом розвитку мультирезистентності є бактерії *Neisseria gonorrhoeae*. Пеніцилін, який широко використовувався для лікування гонореї до 1980-х років, став неефективним і був замінений ципрофлоксацином, який, у свою чергу, втратив значну частину своєї ефективності через 10 років використання (рис. 21.4). Це спонукало до переходу на лікування цефтриаксоном, резистентним до β-лактамаз, а нещодавно – комбінацією цефтріаксону й азитроміцину.

Надмірне вживання антибіотиків прискорює набуття резистентності. На додаток до їх традиційного використання при лікуванні інфекцій лю-

дей і тварин, антибіотики широко використовуються як добавка до кормів сільськогосподарських тварин для стимуляції росту та профілактики виникнення захворювань, особливо в птахівництві (рис. 21.5).

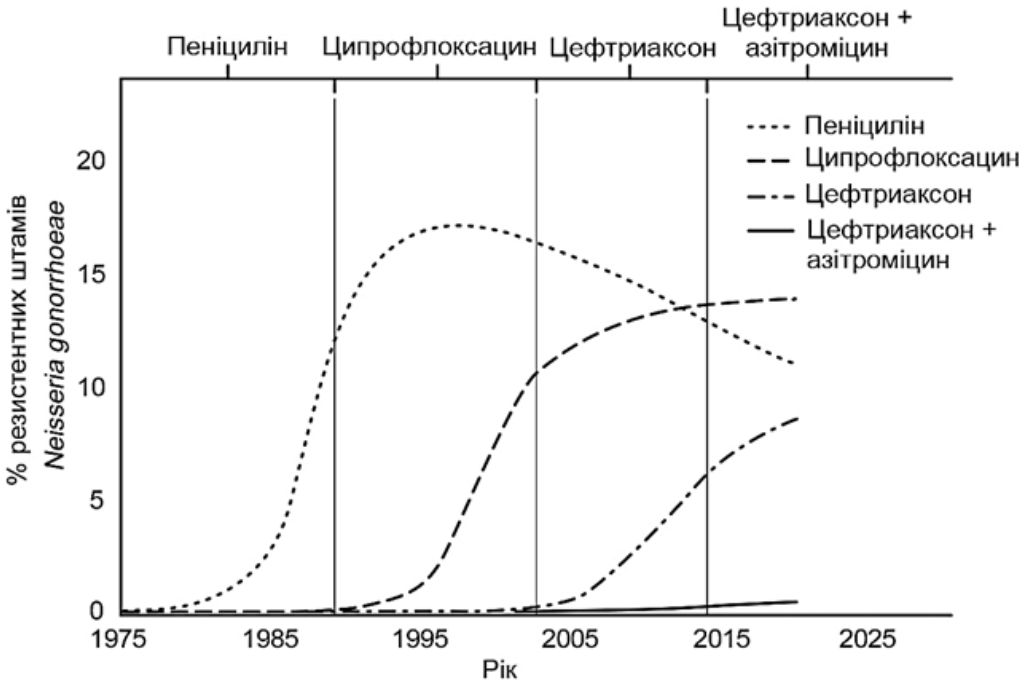


Рис. 21.4. Динаміка мультирезистентності *Neisseria gonorrhoeae*

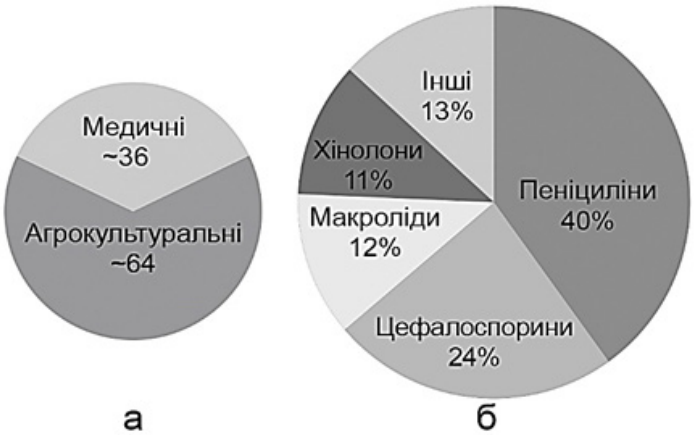


Рис. 21.5. Річний обсяг світового виробництва (а) та використання (б) антибіотиків

У випадках, коли імунна система не запобігає захворюванню, терапія антимікробними препаратами є основним методом боротьби з інфекцією. Незалежно від походження, важливо, щоб антимікробні препарати проявляли вибіркову токсичність, тобто пригнічували або вбивали патогенні мікроорганізми, не впливаючи негативно на хазяїна. Хоча відомо про тисячі антибіотиків, менше 1% з них є клінічно корисними, часто через проблеми з токсичністю для хазяїна або нездатністю проникати в клітини хазяїна. Чутливість окремих мікроорганізмів до різних антимікробних засобів істотно варіює.

Далі наведено деякі з самих поширених антибіотиків відповідно до спектрів мікроорганізмів, на які вони діють, та функціонально/структурної характеристики.

21.6. Антибактеріальні препарати

20.6.1. Антибіотики, що блокують утворення клітинної стінки

У всьому світі щорічно виробляється та використовується приблизно сто тисяч тонн антибактеріальних препаратів, і переважна більшість з них націлена на бактеріальну клітинну стінку (рис. 21.5 б). β-Лактамні антибіотики, до яких відносяться пеніциліни та цефалоспорини, пригнічують синтез клітинної стінки й складають майже дві третини всіх антибіотиків, що виробляються та використовуються у всьому світі. Ці антибіотики мають спільний характерний структурний компонент – β-лактамне кільце (рис. 21.6),

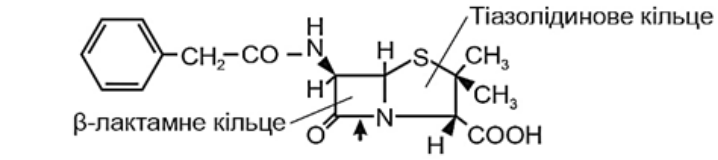
Першим охарактеризованим β-лактамним антибіотиком був пеніцилін G, виділений з гриба *Penicillium chrysogenum* в 1929 році А. Флемінгом. Цей антибіотик був надзвичайно ефективним для контролю стафілококових і пневмококових інфекцій та більш ефективним для лікування стрептококових інфекцій.

Пеніциліни. Більшість пеніцилінів є похідними 6-амінопеніцилановой кислоти й відрізняються один від одного боковим ланцюгом, приєднаним до аміногрупи (рис. 21.6). Найбільш важливою особливістю молекули є β-лактамне кільце, що має важливе значення для активності.

Для розуміння механізму дії пеніциліну необхідно згадати, що коли зшиваються пептидогліканові ланцюги муреїнового каркасу клітинної стінки, бічний ланцюг пептиду на одній субодиниці пептидоглікану повинен з'єднатися з бічним ланцюгом пептиду на іншій субодиниці пептидоглікану в процесі транспептидації (розділ 4.1, рис. 4.6).

Структура пеніцилінів нагадує дві амінокислоти на кінці бічного ланцюга – d-аланіл-d-аланін. Ця структурна подібність блокує реакцію транспептидації, що утворює перехресні зв'язки пептидоглікану, оскільки фермент транспептидаза зв'язує пеніцилін замість його справжнього субстрату. Ці транспептидази називають пеніцилінзв'язуючими білками.

Природні пеніциліни, (пеніцилін G)
Активні проти грампозитивних, β-лактамаза, кислоточутливі



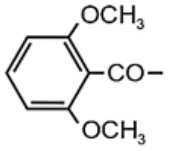
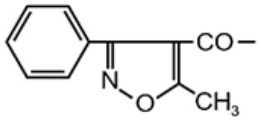
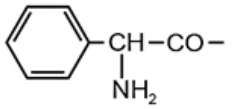
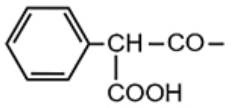
Модифікація N-ацильної групи	Напівсинтетичні пеніциліни
	Метицилін, кислотостійкі, резистентні до β-лактамази
	Оксацилін, кислотостійкі, резистентні до β-лактамази
	Ампіцилін, розширений спектр активності, особливо проти грамнегативних бактерій, чутливі до β-лактамази
	Карбеніцилін, розширений спектр активності, особливо проти грамнегативних бактерій, кислотостійкі, чутливі до β-лактамази

Рис. 21.6. Структура природного та напівсинтетичних пеніцилінів. Стрілка вказує на місце розщеплення β-лактамного кільця β-лактамазами

Оскільки утворення клітинної стінки блокується, відбувається осмотичний лізис клітини.

Пеніциліни також руйнують бактерії шляхом активації їх власних автолітичних ферментів. При цьому пеніциліни діють тільки на бактерії, що ростуть та активно синтезують новий пептидоглікан.

Пеніциліни відрізняються один від одного кількома ознаками. Природні пеніциліни – пеніцилін G і пеніцилін V – препарати вузького спектру дії. Пеніцилін G ефективний проти багатьох грампозитивних збудників. Його необхідно вводити ін'єкційно (парентерально), оскільки він руйнується кислотою в шлунку. Пеніцилін V подібний до пеніциліну G за спектром дії, але його можна застосовувати перорально, оскільки він більш стійкий до дії кислоти. Багато пеніцилін-резистентних бактерій виробляють пеніцилінази (β-лактамази), ферменти, що інактивують антибіотик шляхом гідролізу зв'язку в β-лактамному кільці.

Пеніцилін G активний переважно проти грампозитивних бактерій, оскільки грамнегативні бактерії непроникні для цих антибіотиків. Однак хімічною модифікацією N-ацильної групи пеніциліну G створено напівсинтетичні пеніциліни, такі як ампіцилін і карбеніцилін, що мають більш широку дію й ефективні проти деяких грамнегативних бактерій. Структурні відмінності цих напівсинтетичних пеніцилінів дозволяють їм транспортуватися через грамнегативну зовнішню мембрану, де вони пригнічують синтез клітинної стінки. Пеніцилін G також чутливий до β-лактамаз, що виробляються багатьма стійкими до пеніциліну бактеріями. Напівсинтетичні пеніциліни оксацилін і метицилін широко застосовуються, оскільки вони стійкі до β-лактамаз (рис. 21.6).

Цефалоспорини продукуються видами гриба *Cephalosporium* та за будовою дещо відрізняються від пеніцилінів. Вони зберігають β-лактамне кільце, але мають шестичленне дигідротіазинове кільце, приєднане до нього замість п'ятичленного тіазолідинового кільця пеніцилінів (рис. 21.6).

Цефалоспорини мають такий самий механізм дії, як і пеніциліни. Вони необоротно зв'язуються з транспептидазами і запобігають перехресному зшиванню пептидоглікану. Клінічно важливі цефалоспорини є напівсинтетичними антибіотиками з більш широким спектром дії ніж пеніциліни. Крім того, цефалоспорини, зазвичай, більш стійкі до β-лактамаз. Наприклад, цефтріаксон високорезистентний до β-лактамаз.

Деякі протимікробні препарати імітують фактори росту – органічні поживні речовини, отримані з навколишнього середовища. Аналог фактора росту – це синтетична сполука, яка хімічно нагадує фактор росту, але її тонкі структурні відмінності перешкоджають аналогу функціонувати як фактор росту в клітині, тим самим порушуючи клітинний метаболізм. Важливим аналогом фактора росту є *ізоніазид* (рис. 21.7) – аналог з дуже вузьким спектром дії, ефективний лише проти мікобактерій. Ізоніазид є аналогом нікотинаміду – вітаміну, необхідного для синтезу міколової кислоти, що, у свою чергу, необхідна для будівництва клітинної стінки мікобактерій. Ізоніазид є одним з найбільш ефективних препаратів для лікування туберкульозу, проте стійкість до ізоніазиду у штамів *Mycobacterium tuberculosis* зростає.

21.6.2. Антибіотики, що інгібують синтез білка

Деякі антибіотики пригнічують бактеріальні патогени, порушуючи синтез білка, через взаємодію з рибосомами та зв'язування з рРНК (рис. 21.7). Більшість цих препаратів націлені лише на 70S рибосоми і, отже, не впливають на рибосоми еукаріотичних клітин. Однак завдяки тому, що мітохондрії також містять рибосоми 70S, багато антибіотиків, які пригнічують синтез білка в бактеріях, також потенційно пригнічують синтез мітохондріальних білків в еукаріотичних клітинах. Тим не менш, ці

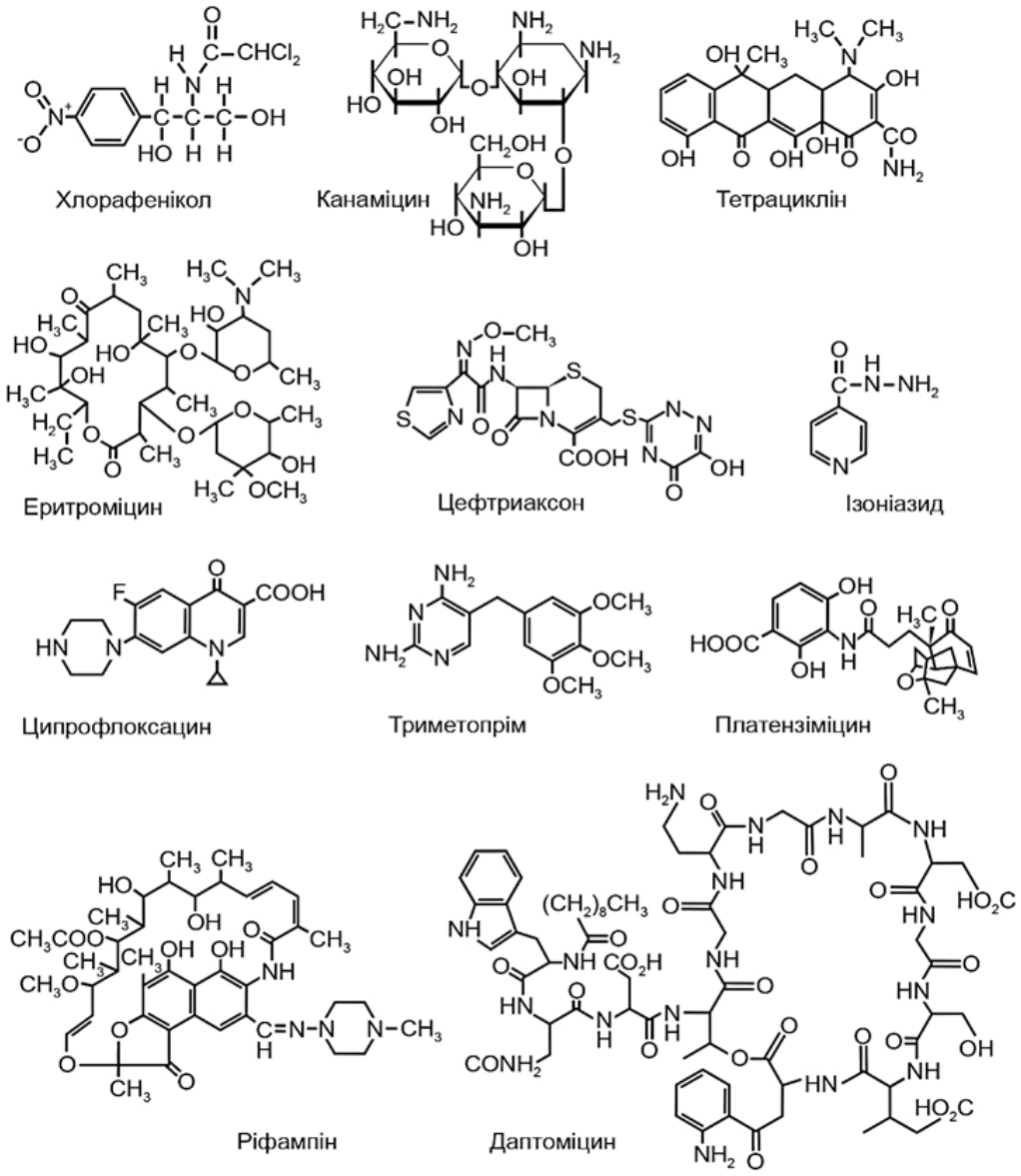


Рис. 21.7. Структура молекул антибіотиків, що інгібують синтез клітинної стінка та білка

препарати все ще корисні з медичної точки зору, оскільки рибосоми 70S в органелах чутливі лише при вищих концентраціях, ніж ті, що використовуються для антимікробної терапії.

Аміноглікозиди – це антибіотики, що містять аміноцукри, з'єднані глікозидними зв'язками, що пригнічують трансляцію, оскільки націлені на 30S субодиницю рибосоми. Стрептоміцин, канаміцин, неоміцин і тобрамі-

цин синтезують різні види бактерій роду *Streptomyces*, тоді як гентаміцин походить від спорідненої бактерії *Micromonospora purpurea*. Аміноглікозиди є бактерицидними та зазвичай використовуються для лікування деяких інфекцій, спричинених грамнегативними бактеріями. Однак, оскільки вони можуть бути досить токсичними та спричиняти ураження слуху та нирок, втрату рівноваги, нудоту та алергічні реакції, їх використовують помірно.

Усі аміноглікозидні антибіотики порушують елонгацію пептиду під час трансляції. Це відбувається, коли аміноглікозиди зв'язуються з рРНК бактеріальної 30S субодиниці та перешкоджають зчитуванню мРНК та/або викликають раннє припинення синтезу пептидів. Вважається, що побічні ефекти аміноглікозидів пов'язані з їхньою здатністю зв'язуватися з мітохондріальними рибосомами хазяїна, які мають те саме місце зв'язування, що й їхні бактеріальні предки.

Тетрацикліни – це родина антибіотиків зі спільною структурою з чотирьох кілець, а заміни бічних ланцюгів утворюють аналоги тетрацикліну (рис. 21.7). Окситетрациклін і хлортетрациклін виробляють природним шляхом *Streptomyces spp.,* тоді як інші тетрацикліни є напівсинтетичними. Як і аміноглікозидні антибіотики, тетрацикліни впливають на функцію 30S субодиниці рибосоми. Тетрацикліни – антибіотики широкого спектру дії, активні відносно більшості бактерій, у тому числі внутрішньоклітинних збудників – рикетсій, хламідій і мікоплазм.

Ці антибіотики зв'язують кальцій у кістках і зубах, послаблюють їх і викликають стійке забарвлення. Тетрацикліни широко застосовуються у ветеринарії, і в деяких країнах вони регулярно використовуються для здорових тварин як харчові добавки для профілактики інфікування патогенами домашньої птиці та свиней.

Макролідні антибіотики інгібують трансляцію, націлюючись на 50S субодиницю бактеріальної рибосоми. Їх основна структура містить лактонне кільце, зв'язане з цукрами, і варіації цих компонентів призводять до створення різноманітних макролідних антибіотиків. На макроліди припадає близько 12% світового виробництва антибіотиків (рис. 21.5). Вони включають, наприклад, еритроміцин, що продукує *Streptomyces erythreus*, кларитроміцин й азитроміцин.

Часткове пригнічення синтезу білка еритроміцином, зокрема, призводить до переважної трансляції одних білків і обмежує трансляцію інших, що порушує метаболічні функції на всіх рівнях. Еритроміцин, який часто клінічно використовується у пацієнтів з алергією на пеніцилін або інші β-лактамні антибіотики, особливо застосовується для лікування легіонельозу. Азитроміцин особливо ефективний проти багатьох бактерій, включаючи *Chlamydia trachomatis*, що передається статевим шляхом. Кетоліди є напівсинтетичними похідними макролідів зі схожим механізмом дії.

Хлорамфенікол (левоміцетин) – природний антибіотик з групи амфеніколів був отриманий з *Streptomyces venezuelae*, але зараз синтезуєть-

ся хімічним шляхом (рис. 21.7). Механізм протимікробної дії пов'язаний з порушенням синтезу білків за рахунок блокування пептидилтрансферазної активності шляхом зв'язування з 23S рРНК 50S субодиниці рибосоми бактерій. Чинить бактеріостатичну дію, має дуже широкий спектр дії, але досить токсичний, тому використовується лише у виключних ситуаціях, що загрожують життю, коли жоден інший препарат не діє.

21.6.3. Антибіотики, що інгібують синтез нуклеїнових кислот

Хінолони – це синтетичні препарати, що мають чотирихінолонове кільце (триметоприм, дигідрофолієва кислота, ципрофлоксацин). Вони порушують бактеріальний метаболізм шляхом втручання у функцію ДНК-гірази, таким чином запобігаючи суперскрученню та упаковці ДНК у бактеріальній клітині. Оскільки ДНК-гіраза міститься в усіх бактеріях, хінолони ефективні для лікування як грампозитивних, так і грамнегативних бактеріальних інфекцій.

Фторхінолони, такі як ципрофлоксацин (рис. 21.7), є фторованими похідними хінолонів, що використовуються для лікування інфекцій сечовивідних шляхів і для профілактики та лікування респіраторних захворювань у тварин.

Ципрофлоксацин є препаратом вибору для лікування сибірської виразки, оскільки деякі штами *Bacillus anthracis*, збудника сибірської виразки, стійкі до пеніциліну. Фторхінолон моксифлоксацин ефективний при лікуванні туберкульозу. У поєднанні з іншими протитуберкульозними препаратами моксифлоксацин може значно скоротити час лікування, що є основною проблемою лікування на основі ізоніазиду. Іноді застосування фторхінолонів супроводжується серйозними побічними проявами, включаючи пошкодження органів і нейротоксичність.

Деякі хінолони порушують транскрипцію, пригнічуючи синтез РНК. Наприклад, рифаміцини, такі як рифампін (рис. 21.7), пригнічують синтез РНК шляхом зв'язування з β-субодиницею РНК-полімерази у бактерій. Рифампін, що часто використовують у поєднанні з ізоніазидом для лікування туберкульозу, має дивний побічний ефект, спричиняючи забарвлення виділень організму, включаючи сльози, сечу та піт у червонувато-помаранчевий колір.

Актиноміцин D, що продукують бактерії *Streptomyces antibioticus*, використовують як цитостатичний препарат у терапії декотрих онкологічних захворювань. Актиноміцин D є першим антибіотиком, у якого була виявлена протипухлинна активність. Він пригнічує синтез РНК шляхом з'єднання з ДНК і блокування елонгації РНК. Цей агент активно зв'язується з ДНК на парах основ гуанін-цитозин, вписуючись у основну боріздку подвійного ланцюга, де синтезується РНК. Висока токсичність актиноміцину є перешкодою для лікування інфекційних хвороб.

21.6.4. Інші механізми дії антибактеріальних препаратів

Подібно до ізоніазидів, сульфаніламідні препарати є синтетичними аналогами факторів росту. Однак замість того, щоб впливати на клітинну стінку, сульфаніламіди блокують ключовий шлях біосинтезу в бактеріях. Самий простий сульфаніламід є аналогом *n*-амінобензойної кислоти (ПАБК), що входить до складу фолієвої кислоти, попередника нуклеотидів. Імітуючи ПАБК, сульфаніламід блокує синтез фолієвої кислоти та тим самим пригнічує синтез нуклеїнової кислоти.

Сульфаніламід вибірково токсичний, оскільки бактерії синтезують власну фолієву кислоту, на відміну від людей і більшості тварин, які отримують фолієву кислоту зі свого раціону. Антимікробна терапія сульфаметоксазолом (сульфаніламідний препарат) з триметопримом (споріднений конкурент синтезу фолієвої кислоти) є високоефективною, оскільки комбінація препаратів блокує два послідовних етапи на шляху синтезу фолієвої кислоти (рис. 21.7). Однак резистентність до сульфаніламідів зростає, оскільки багато раніше чутливих збудників розвивають здатність імпортувати фолієву кислоту з навколишнього середовища.

Деякі антибіотики мають нетипові структури або мішені. Наприклад, антибіотик даптоміцин (рис. 21.7), який виробляється стрептоміцетами, є циклічним ліпопептидом з унікальним механізмом дії. Даптоміцин специфічно зв'язується з бактеріальними цитоплазматичними мембранами, утворює пори та індукує швидку деполяризацію мембрани. Деполяризована клітина швидко втрачає здатність синтезувати макромолекули, такі як нуклеїнові кислоти та білки, що призводить до загибелі клітини. Однак мутації, що змінюють структуру цитоплазматичної мембрани, можуть призвести до набуття резистентності.

Незвичайний антибіотик платензиміцин (рис. 21.7) продукує *Streptomyces platensis*, що пригнічує біосинтез жирних кислот і ліпідів. Він ефективний проти широкого спектру грампозитивних бактерій, в тому числі метицилін-резистентного *Staphylococcus aureus* і ванкоміцин-резистентного ентерокока, що спричиняють майже невиліковні інфекції, та не виявляє токсичності для організму людини. Платензиміцин має унікальний механізм дії, завдяки чому збудники не мають перспектив для набуття резистентності до нього.

21.7. Антибіотики, спрямовані на еукаріотичні мікроорганізми

Гриби, найпростіші та гельмінти створюють особливі проблеми для розробки ефективних ліків, оскільки клітини цих збудників є еукаріотичними, як у людини. Багато препаратів, що діють на грибки, є досить токсичними для людини та мають низький терапевтичний індекс.

Грибкові інфекції підрозділяють на: поверхневі мікози, підшкірні мікози, системні мікози та опортуністичні мікози. Для лікування кожного виду мікозу використовуються різні препарати та їх комбінації.

Мішені багатьох протигрибкових агентів є спільними в грибків та клітин їхніх хазяїв, що робить препарати токсичними. У результаті багато протигрибкових препаратів можна використовувати лише для поверхневого застосування.

Основною групою протигрибкових сполук є інгібітори ергостерину, які діють шляхом безпосередньої взаємодії з ним або пригнічують його синтез, що призводить до порушення проникності мембрани. Ергостерин присутній у цитоплазматичних мембранах грибів замість холестерину, який міститься в мембранах клітин тварин. Важливі інгібітори ергостерину включають *полієнові* (*ністатин*) антибіотики (рис. 21.8), що виробляють бактерії роду *Streptomyces*, які специфічно зв'язуються з ергостерином. *Азоли (міконазол)* та *аліламіни* (*тербінафін, нафтифін*) є протигрибковими препаратами широкого спектру дії. Ці препарати пошкоджують мембрани та порушують їх транспортну активність у грибів.

Ехінокандини (*каспофунгін, мікафунгін*) є інгібіторами клітинної стінки, що блокують активність 1,3-β-D-глюкансинтази – фермента, що утворює полімери β-глюкану в клітинній стінці гриба. Оскільки клітини савців

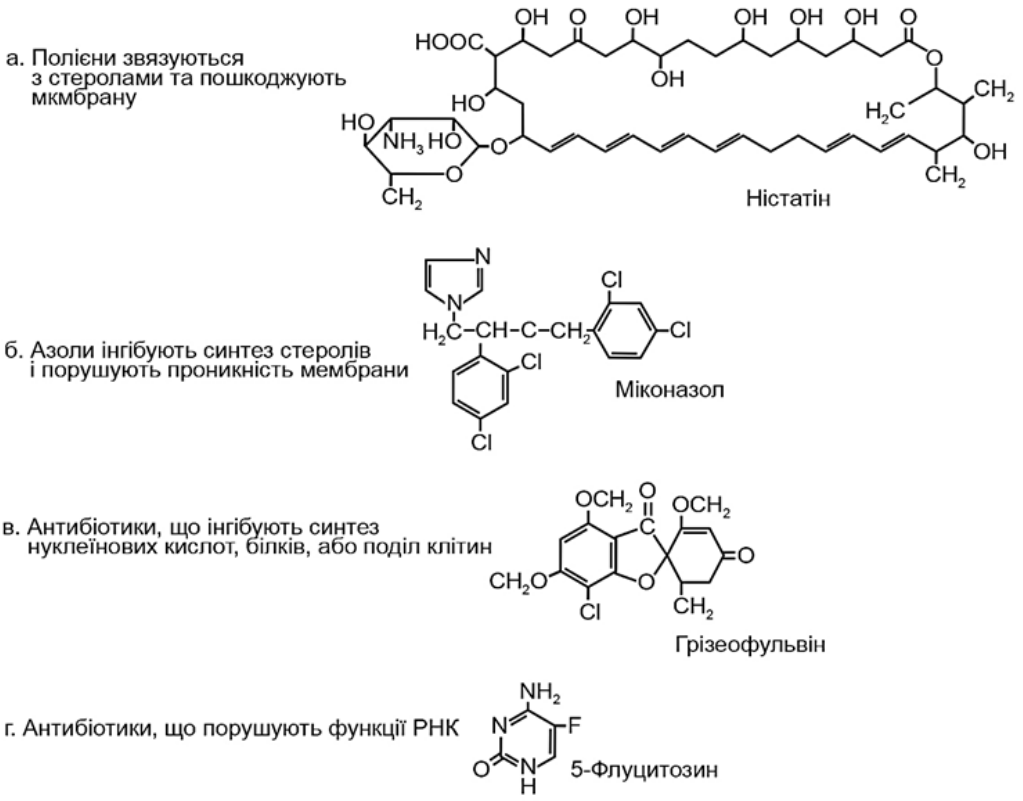


Рис. 21.8. Структура молекул деяких антифунгальних сполук

не мають 1,3-β-D-глюкансинтази (або клітинних стінок), активність цих агентів вибірково вбиває клітини грибів. Ехінокандини часто використовують для лікування хвороб викликаних дріжджами роду *Candida*, а також деяким грибами, стійкими до азолів й інших агентів.

Стінки клітин грибів також містять хітин, полімер N-ацетилглюкозаміну, що зустрічається лише в грибах і комахах. Кілька поліоксинів пригнічують синтез клітинної стінки, перешкоджаючи біосинтезу хітину. *Поліоксини* широко застосовують як фунгіциди в тваринництві.

Інші протигрибкові препарати пригнічують біосинтез фолієвої кислоти, втручаються в топологію ДНК під час реплікації або, як *гризеофульвін* (рис. 21.8), порушують агрегацію мікротрубочок під час мітозу.

Препарати, що застосовують проти системних мікозів, включають *амфотерицин* (рис. 21.8). Амфотерицин В із *Streptomyces spp*. є досить токсичним для людей тому застосовується лише при серйозних, небезпечних для життя інфекціях.

Синтетичний засіб *5-флуцитозин* (рис. 21.8) ефективний проти багатьох системних грибів, його зазвичай використовують у комбінації з амфотерицином В. Він перетворюється лише грибами на 5-фторурацил, який є аналогом урацилу, тому під час транскрипції вбудовується в РНК замість урацилу та порушує функцію РНК. Використовується для лікування криптококового менінгіту, кандидозу та кокцидіоїдомікозу.

Протозойні захворювання, особливо малярію, традиційно лікували хініном або, нещодавно, похідними хініну, такими як хлорохін і мефлохін. Однак велика стійкість до цих сплук плазмодіїв, які викликають малярію, призвели до розробки альтернативних препаратів на основі *артемізиніну*. Артемізинін у невеликих кількостях виробляється рослиною китайського полину (*Artemisia*), що традиційно використовується для контролю циклічної лихоманки, пов'язаної з малярією. Артемізинін також є ефективним засобом для лікування деяких гельмінтних захворювань, таких як шистосомоз. Використовуючи методи синтетичної біології, створено генетично модифікований штам дріжджів, що виробляє антибіотик артемізинін.

Препаратом вибору для боротьби з багатьма паразитичними найпростішими є *метронідазол* (або споріднений *тинідазол*), який діє на анаеробні патогени. Інфекції, спричинені *Giardia intestinalis* (лямбліоз), *Trichomonas vaginalis* (трихомоніаз) і *Entamoeba histolytica* (амебна дизентерія) успішно лікуються цими препаратами. Криптоспоридіоз, викликаний *Cryptosporidium parvum*, часто лікують *нітазоксанідом*.

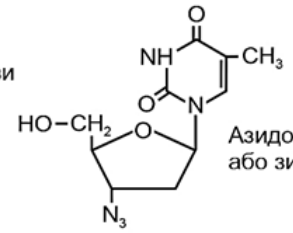
21.8. Антивірусні препарати

Антивірусні препарати часто негативно впливають на збудника, а також на хазяїна, оскільки віруси залежать від біосинтетичного механізму клітини для їх реплікації. В результаті вибіркова токсичність для вірусів

може бути досягнута тільки агентами, які переважно впливають на унікальні шляхи реплікації вірусу або збирання вірусних компонентів.

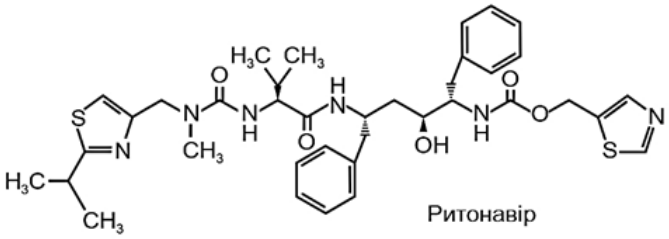
Найбільш широко використовуваними агентами для противірусної хіміотерапії є *аналоги нуклеозидів*, які є нуклеозидними інгібіторами зворотної транскриптази (НІЗТ), що діють шляхом інгібування елонгації полімеразою ланцюга вірусної нуклеїнової кислоти. Першим НІЗТ, що отримав широке застосування, був *азидотимідин* (рис. 21.9), який ефективно

а. Нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази



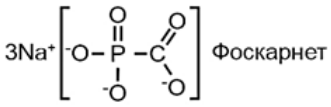
Азидотимідин (AZT)
або зидовудин

б. Інгібітор вірусної протеази



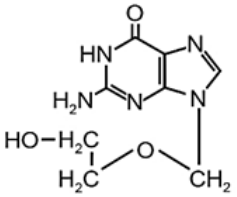
Ритонавір

в. Інгібітор злиття вірусів

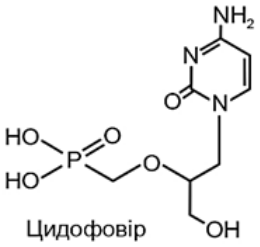


Фоскарнет

г. Інгібітори вірусної ДНК-полімерази

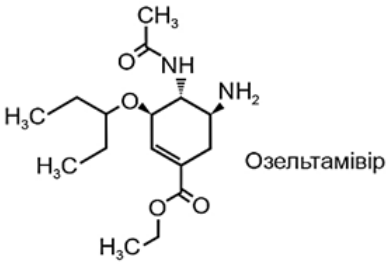


Ацикловір



Цидофовір

д. Інгібітор нейрамінідази



Озельтамівір

Рис. 21.9. Структура молекул противірусних антибіотиків, що інгібують реплікацію вірусів

блокує виробництво комплементарної ДНК вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) та інших ретровірусів. Він структурно подібний до тимідину, але є дидезоксипохідним, позбавленим 3′-гідроксильної групи. Ще один широко використовуваний нуклеозидний аналог *ацикловір* (рис. 21.9), схожий на гуанозин, що успішно використовується для контролю герпесної інфекції.

Ганцикловір використовують для лікування системної цитомегаловірусної хвороби, а *цидофовір* – мононуклеотидний аналог (рис. 21.9) для лікування очних інфекцій (ретиніту). Ф*оскарнет* (рис. 21.9) – це аналог пірофосфату, що не вимагає модифікації вірусними ферментами, тому може використовуватись для лікування захворювань, викликаних як вірусами простого герпесу, так і цитомегаловірусом.

Деякі противірусні засоби націлені на ключовий фермент ретровірусів – зворотну транскриптазу. *Невірапін* – ненуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (ННІЗТ), що зв'язується безпосередньо зі зворотною транскриптазою та пригнічує зворотну транскрипцію. Фосфономурашина кислота, аналог неорганічного пірофосфату, інгібує нормальні міжнуклеотидні зв'язки, що перешкоджають синтезу вірусних нуклеїнових кислот. Як НІЗТ, так і ННІЗТ певною мірою є токсичними.

Інші антиретровірусні препарати включають інгібітори протеази та енфувіртид – інгібітор злиття вірусів з мембраною Т-лімфоцитів, які порушують реплікацію вірусу. Вони запобігають розщепленню вірусних поліпротеїнів на кілька окремих вірусних компонентів та утворенню зворотної транскриптази та інтегрази.

Енфувіртид – це синтетичний пептид із 36 амінокислот, що зв'язується з мембранним білком gp41 ВІЛ та зупиняє конформаційні зміни, необхідні для злиття ВІЛ з мембранами Т-лімфоцитів, таким чином запобігаючи зараженню імунних клітин хазяїна ВІЛ.

Інгібітори нейрамінідази – *озельтамівір*, інгаляційний *занамівір* і *перамівір* обмежують інфекцію вірусу грипу. Ці препарати блокують активний центр нейрамінідази у вірусів грипу А і В та пригнічують вивільнення вірусу з інфікованих клітин (рис. 21.9).

21.9. Резистентність як загроза громадському здоров'ю

Широке застосування антибіотиків створює сприятливі умови для поширення R-плазмід, оскільки вони несуть гени, що надають безпосередню селективну перевагу та обмежують тривале використання будь-якого конкретного антибіотика як ефективного протимікробного засобу.

Крім того, антибіотики використовують в клінічній практиці набагато частіше, ніж це необхідно. Проблема ускладнюється недотриманням пацієнтами режиму, багато пацієнтів припиняють прийом антибіотиків, як тільки відчують себе краще. Підвищення резистентності до антибіотиків

можна звести до мінімуму, якщо ліки використовувати лише для лікування чутливих збудників і застосовувати їх у високих терапевтичних дозах, щоб знищити патоген до того, як резистентні бактерії почнуть поширюватися.

Резистентність до антибіотиків є однією з найбільших загроз здоров'ю сьогодні в усьому світі. Певні патогенні бактерії, що стійкі до антибіотиків, класифікуються ВОЗ як «серйозні або загрозливі». Ця проблема виникла в результаті неправильного використання та зловживання антибіотиками.

Щоб обмежити зростання стійкості до ліків, можна застосувати кілька стратегій. Необхідно запровадити жорсткіший контроль за використанням антибіотиків з кормами для тварин. Препарати для лікування слід призначати у достатньо високій концентрації, щоб знищити чутливі збудники та більшість стійких, які можуть виникнути під час терапії. Пацієнти повинні приймати антимікробні препарати за призначенням і завершувати повний курс терапії. Необхідно обмежити використання препаратів широкого спектру дії, призначати курс антибіотикотерапії після визначення чутливості збудника та застососувати відповідний препарат вузького спектру дії.

Поряд з спробами контролювати появу та поширення резистентності існує нагальна потреба в пошуках абсолютно нових антибіотиків, з якими патогенні мікроорганізми ніколи не стикались.

Питання для самостійного контролю

1. Яке біологічне значення антибіотиків для їх продуцентів?
2. Як працює Е-тест визначення чутливості збудника до антибіотика?
3. Назвіть механізми антимікробної дії антибіотиків?
4. За якими ознаками класифікують антибіотики?
5. Перерахуйте чутливі мікроорганізми до основних груп антибіотиків.
6. У чому полягають проблеми противірусної хіміотерапії?
7. Які генетичні та біохімічні механізми резистентності бактерій?
8. Вкажіть механізм інгібуючої дії противірусних препаратів.
9. Які антибіотики блокують синтез клітинної стінки бактерій?
10. Які хіміотерапевтичні препарати мають противірусну дію?
11. Дайте характеристику основним групам антибіотиків.
12. Які антибіотики порушують функції цитоплазматичної мембрани у дріжджоподібних грибків і які механізми їхньої дії?
13. Наведіть приклади антибіотиків, що блокують синтез білка на рибосомах бактерій.
14. Наведіть приклади антибіотиків, що порушують реплікацію нуклеїнових кислот.
15. Сформулюйте проблеми зростання резистентності до антибіотиків для громадського здоров'я.

РОЗДІЛ 22
ПРИКЛАДНА МІКРОБІОЛОГІЯ ТА МІКРОБНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ

22.1. Мікробіологія харчових продуктів

Ще задовго до того, як стали зрозумілі процеси мікробного метаболізму, людина навчилася використовувати їх у своєму житті. Давно відомі способи випікання хліба, приготування сиру, пива, вина, квасу. Мікроорганізми використовують для створення хімічних або структурних змін та формування продукту, який можна зберігати протягом тривалого часу, а також для створення приємного смаку та запаху. Бродіння може здійснюватися шляхом додавання мікроорганізмів з заквасками або мікроорганізмами з природного середовища з відповідними ферментативними характеристиками.

Мікробна біотехнологія – наука про пошук, створення нових чи покращення властивостей існуючих корисних мікроорганізмів, продуктів їхньої життєдіяльності, мікробіологічних процесів та їх прикладне застосування для розв'язання сучасних проблем у медицині, сільському господарстві, харчовій промисловості, оздоровленні довкілля та інших галузях.

22.1.1. Використання молочнокислих бактерій

Молоко в своєму складі містить білок казеїн, розчинені жири, а також цукор та інші корисні компоненти для молочнокислих бактерій. Молочна кислота, що бактерії виробляють в процесі росту, понижує pH. Це призводить до денатурації казеїну та його згортання (звурдження). Молоко скисає та поділяється на дві складові частини – сироватку та желеподібний згусток казеїну. Утворений природним чином молочнокислий продукт носить назву *кисляк* (рис. 22.1 а). Найбільш відомим молочнокислим продуктом є *йогурт*, що виробляють шляхом бродіння з додаванням заквасок та різних смакових та ароматизуючих добавок.

Рис. 22.1. Кисломолочні продукти: а – кисляк, б – кефір, в – кумис, г – йогурт, д – твердий сир

Виробництво більшості кисломолочних продуктів засноване на молочнокислих бактеріях (МКБ), що належать до родів *Lactobacillus, Lactococcus* і *Leuconostoc*. Залежно від виду молочнокислого продукту для бродіння додають відповідні закваски МКБ. Наприклад, *Lactococcus lactis* використовують у виробництві сиру, а *Leuconostoc* spp. – при виробництві вершкового масла. Суттєвою проблемою для молочної промисловості є бактеріофаги, які інфікують молочнокислі бактерії, знищують їх і таким чином припиняють процес бродіння.

У результаті *мезофільного бродіння* молока отримують сметану та маслянку. Для здійснення цього процесу молоко зазвичай інокулюють бажаною закваскою *Lactobacillus* spp. і *Lactococcus lactis* та інкубують при 20–30 °С. *L. lactis* перетворює цитрат на диацетил, який надає насиченого маслянистого смаку готовому продукту. *Термофільне бродіння* проводиться при температурі близько 45 °С.

У промисловому виробництві йогурту молоко пастеризують, охолоджують до 43 °С або нижче та інокулюють у співвідношенні 1:1 *Streptococcus salivarius* var. *thermophilus* і *Lactobacillus delbrueckii* var. *bulgaricus*. Діючи разом, ці дві бактерії зброджують майже всю лактозу до молочної кислоти та присмачують йогурт диацетилом (*S. salivarius*) і ацетальдегідом (*L. delbrueckii*). Зараз багато йогуртів містять пробіотичні бактеріальні штами, які не обов'язково сприяють процесу бродіння. Фрукти або фруктові ароматизатори пастеризують окремо та поєднують з йогуртом (рис 22.1 г). Свіжоприготований йогурт містить близько 10^9 КУО/г.

Кефір відноситься до продуктів молочнокислого та спиртового бродіння (рис 22.1 б). Процес заснований на використанні дріжджів, молочнокислих бактерій та оцтовокислих бактерій, які містяться в кефірних зернах, утворених з коагульованого казеїну. Завдяки дріжджам кефір може містити до 2% етанолу. Кефірні зерна можна використовувати як закваску шляхом зворотного бродіння, коли зразок утвореного продукту кожної партії залишається для інокуляції наступної партії. Кефір набув популярності та масово виробляється по всьому світу.

Кумис – це кисломолочний напій із молока, який також як і кефір отримують у процесі молочнокислого та спиртового бродіння. Кумис цінний харчовий продукт, що має приємний кислувато-солодкий смак (рис. 22.1 в). Виготовляється сквашуванням кобилячого або коров'ячого молока закваскою, що містить дріжджі та молочнокислі бактерії. В міру дозрівання, молочнокисле бродіння в кумисі припиняється, а дріжджове продовжується. Однодобовий, слабкий кумис містить до 1% спирту, середній, дводобовий – до 1,75%, а міцний, тридобовий – до 2,5%. При довгостроковому зберіганні дріжджове бродіння продовжується, а кількість спирту може досягати 3,4%.

Твердий сир (сичужний) є одним із найдавніших продуктів харчування. Його виробляють з молока шляхом ферментативного згортання біл-

ків, відділення сирної маси, внесення закваски, обробки та ферментативного дозрівання (рис 22.1 д). У всьому світі виробляється близько 2000 різних сортів сиру. Сорт сиру залежить від способу згортання молока, складу мікробіоти, способу обробки, умов та часу дозрівання. При дозріванні проходять складні мікробіологічні та біохімічні процеси, характерні різним видам сиру.

Для виробництва сиру молоко пастеризують, охолоджують та додають закваску. Після початку бродіння та зниження pH додається сичужний фермент, що каталізує гідроліз молочного білка (казеїн), у результаті чого він згортається та утворює згусток. Сирну масу щеплюють мікроорганізмами закваски, ферментують, відділяють від сироватки та в залежності від сорту додають сіль (н. п., сир Чеддер) або витримують у розсолі (н. п., Моцарела) та кладуть на дозрівання. Під час дозрівання сиру впродовж тижнів або років тривають мікробіологічні та біохімічні процеси, що залежать від складу мікроорганізмів, умов та часу дозрівання, що призводить до зниження pH і формування щільності, смаку та текстури сиру.

Кількість мікроорганізмів в заквасці часто перевищує 10^9 КУО на грам сиру перед дозріванням. Основні види бактерій, що входять до складу мезофільних заквасок, включають:

– *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (молочний лактокок) – основний компонент будь-якої мезофільної закваски, що здійснює основні процеси молочнокислого бродіння;

– *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (вершковий лактокок) – один з базових складових, що часто зустрічається в мезофільних заквасках, надає сиру приємного вершкового смаку;

– *Lactococcus lactis* subsp. *diacetilactis* – газоутворюючі бактерії, які в процесі дозрівання сиру виділяють вуглекислий газ та сприяють формуванню малюнка у твердих сирах.

Для виготовлення сирів з високою температурою другого нагрівання, таких як Моцарелла, Сулугуні, Емменталь використовують термофільні заквaски, до складу яких входить *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (або *Streptococcus thermophilus*) – термофільний стрептокок, який є основою більшості термофільних заквасок. *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (болгарська паличка) використовують в рецептах італійських сирів, наприклад, пармезану. *Lactobacillus helveticus* (швейцарська паличка) дозволяє значно збільшити кислотність сироватки та використовується у заквасках для сирів з високою температурою другого нагрівання.

Крім цього, існують газо- та ароматоутворюючі бактерії – лейконостоки *Leuconostoc* sp., які використовуються в деяких заквасках і служать додатковими для покращення малюнка сиру. *Propionibacterium freudenreichii* – пропіоновокислі бактерії, без яких неможливо отримати такі сири як Маасдам, Емменталь та інші сири з дірками, посилюють смак та аромат гото-

вого сиру. *Lactobacillus plantarum* додають завдяки їх антогоністичній дії на бактерії групи кишкової палички.

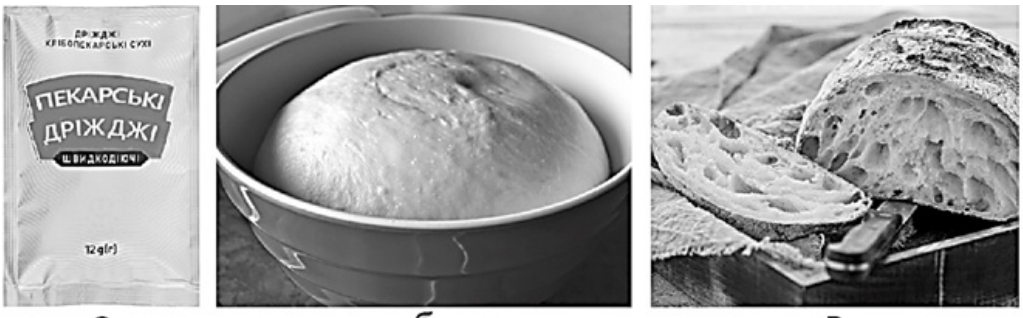
Для деяких сирів (наприклад, Рокфор і Блакитний сир) використовують цвілеві гриби. Спори *Penicillium roqueforti* додають у сирну масу безпосередньо перед завершальною обробкою сиру, або поверхню вже сформованого сиру защеплюють на початку дозрівання (н. п., сир Камамбер) спорами *Penicillium camemberti*.

Молочнокисле бродіння застосовується при приготуванні *квашених овочів* (капусти, огірків, томатів), а також при силосуванні кормів. Молочна кислота, що утворюється, в цих процесах є природним консервантом.

Ще одна область використання молочнокислих бактерій – *закваски для м'ясних та рибних продуктів,* що використовуються при виготовленні деяких сортів сосисок, ковбаси типу салямі, сервелату та різноманітних рибних страв японської кухні. Вихідними культурами у цих процесах є *Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus plantarum*, а на стадії дозрівання іноді *Aspergillus glaucus*.

22.1.2. Використання дріжджів

Хліб – одна з найдавніших страв людини. Для виготовлення хліба застосовують спеціальні дріжджові закваски (рис. 22.2 а). Всі вони відносяться до виду *Sacchamyces cerevisie*, але для хліба, пива, квасу, вина, спирту нині використовують різні раси цих дріжджів. Для деяких спеціальних сортів хліба застосовують добавки до хлібної закваски з пропіоновокислих або молочнокислих бактерій.



а б в

Рис. 22.2. Пекарські дріжджі (а), тісто (б), пориста стрктура хліба (в)

При виготовленні хліба ріст дріжджів відбувається за присутності кисню, що призводить до збільшення виділення CO_2 і мінімального накопичення спирту. В процесі ферментації хліба α- і β-амілази, присутні у зволоженому тісті, гідролізують крохмаль і вивільняють мальтозу та глюкозу. Дріжджі пекарського штаму *Saccharomyces cerevisiae* утилізують глюкозу та виробляють CO_2, що змушує тісто підніматися та утворювати легку та

пористу текстуру хліба (рис. 22.2 б, в, г). Леткі сполуки продуктів бродіння сприяють формуванню аромату.

Дріжджі є основним діючим елементом у процесах приготування алкогольних напоїв (пива, вина та квасу). Такі продукти можуть бути отримані з різної рослинної сировини, що містить доступні вуглеводи.

Пиво. Найбільш поширені види сировини для пива – ячмінь, рис та кукурудза. В європейських країнах традиційно використовують ячмінь. Оскільки дріжджі не можуть гідролізувати та використовувати крохмаль, зерна ячменю пророщують для активації їх амілолітичних ферментів, прогрівають при високій температурі (110–140 °С), відділяють проростки та отримують солод (рис. 22.3 а, б).

Рис. 22.3. Пророщені зерна ячменю (а), солод (б), шишки хмелю (в), ферментери для зброджування пивного сусла (г)

Подрібнені солод і зерна ячменю заливають водою у заторній ємності, де ферменти з солоду гідролізують крохмаль до низькомолекулярних вуглеводів. Після завершення цього процесу отримане пивне сусло варять (рис. 22.3 в, г) з хмелем (сполуки хмелю володіють антимікробною активністю проти сторонньої мікробіоти та придають специфічний смак), охолоджують та засівають культурою певної раси дріжджів.

Для більшості сортів пива використовують низові дріжджі штамів *Saccharomyces carlsbergensis*, які в процесі ферментації осідають на дно. Для отримання пива з низовими дріжджами при температурі 12 °С потрібно 7–10 днів бродіння, при 18 °С – 3–4 дні.

Для приготування елю використовують щільніше сусло і верхові дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, що бродять при вищій температурі (18 °С) значно швидше і з рясним газовиділенням. Пиво виходить міцніше, а дріжджі при бродінні виносяться на поверхню у «шапку пива», тому вони отримали назву «верхові».

Щойно ферментоване (зелене) пиво витримують, як правило, до 19 діб залежно від сорту пива. Пиво можна пастеризувати при 40 °С та вище або стерилізувати, пропускаючи через мембранні фільтри, щоб мінімізувати зміни смаку. На пляшці, зазвичай, вказують кількість градусів Баллінга, що відповідає щільності пивного сусла (вміст сухої речовини в ста грамах сусла до бродіння).

Вино. Виробництва вина починається з віджимання виноградного соку, що називають виноградним суслом, та подальшою його ферментацією (рис. 22.4). Вино можна виготовляти з використанням мікроорганізмів, які знаходяться на виноградних ягодах, але ця суміш бактерій і дріжджів дає непередбачувані результати бродіння. Щоб уникнути цього, свіже виноградне сусло обробляють фумігантом (диоксид сірки), щоб знищити природні мікроорганізми, і додають дріжджі бажаного штаму *Saccharomyces cerevisiae* або *S. ellipsoideus*.

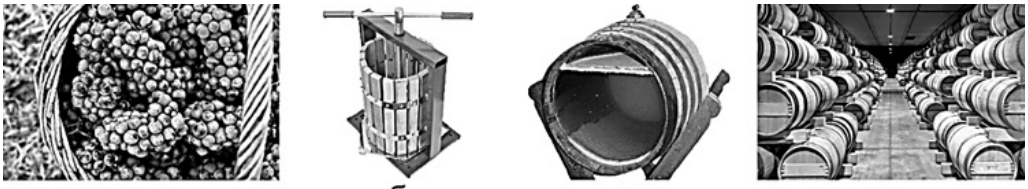


Рис. 22.4. Зібраний виноград (а), прес для віджимання виноградного соку (б), плівка флеру в бочці з хересом (в), вино в бочках на дозріванні (г).

Після інокуляції сік зброджують протягом 3–5 днів при температурі від 20 до 28 °С. Залежно від стійкості дріжджів штаму до алкоголю (спирт зрештою вбиває дріжджі, які його виробляють), кінцевий продукт може містити від 10 до 14% етилового спирту. Очищення та формування смаку відбувається в процесі дозрівання вина.

Виноградний сік містить велику кількість органічних кислот, у тому числі яблучну та винну кислоти, які роблять вино кислим та не стабільним. Рівень яблучної кислоти при ферментації знижують при доброджуванні внесенням бактерій *Oenococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* і *Pediococcus*, які перетворюють яблучну кислоту на молочну. Яблучно-молочнокисле бродіння призводить до знекислення та покращення стабільності та смаку вина.

Виробництво сухого (без залишків вільного цукру) чи більш солодкого (з різною кількістю вільного цукру) вина контролюють початковою концентрацією цукру в суслі. З більш високим рівнем цукру алкоголь накопичуватиметься та гальмуватиме бродіння до того, як цукор буде повністю використано дріжджами, утворюючи солодше вино. Існують модифікації цього процесу. Наприклад, для отримання солодких десертних вин використовують зневоднений виноград, з підвищеним вмістом цукру, інфіковані грибом *Botrytis cinereae*. Сік з такого винограду зброджується спеціальними дріжджами, які швидко переробляють глюкозу та не використовують фруктозу, що зумовлює підвищений вміст цукру в такому вині.

В процесі дозрівання накопичуються смакові сполуки, що впливають на букет вина. Наразі збільшилась кількість сортів вин із внесеними різ-

ними ароматичними добавками, з примусовим нагнітанням CO_2 (ігристі вина), з додатковим внесенням спирту (кріплені вина).

Ігристе вино (н. п., Шампанське) утворюється шляхом вторинного бродіння внесеними дріжджами штаму, стійкого до тиску з утворенням вуглекислого газу, який утворює бульбашки. Для виробництва хересу виноград пару тижнів сушать на сонці, а потім пересипаний невеликою кількістю гіпсу, віджимають, а отримане сусло ферментують. Для бродіння використовують спеціальні хересні дріжджі (флер), які утворюють на поверхні вина товсту плівку біло-сірого кольору (рис. 22.4).

Дистильовані спиртні напої. Більш міцні напої отримують відгоном спирту. Вони відрізняються початковим субстратом та модифікацією післявідгінних операцій. Наприклад, горілку отримують дистиляцією спирту після зброджування крохмалю з жита, пшениці, картоплі; віскі – відгоном спирту після зброджування кукурудзи (Бурбон) та ячменю (Шотландський віскі) та витримуванням його в просмолених дубових бочках; коньяк та бренді – витримуванням відігнаного виноградного спирту в дубових бочках. Різні види міцних напоїв відрізняються за добавками, що вносяться (н. п., джин – це горілка зі спирту, настояного на ягодах ялівцю, лікери містять велику кількість цукру і натуральні або синтетичні ароматизатори та ін.).

В Японії сировиною для алкогольних напоїв (саке) є рис. Для гідролізу крохмалю використовують гриб *Aspergillus oryzae*, що утворює амілази. При цьому відбувається оцукрювання і починається спиртове бродіння, що викликають дріжджі *S. cerevisiae* var. sake. Бродіння при виготовленні саке триває до місяця. Кінцева концентрація спирту в продукті може доходити до 18%.

Етанол як цінна сировина. Виробництво спирту може бути засноване не тільки на використанні харчових субстратів і відходів харчових виробництв, але і на технічній сировині, яка піддається гідролізу, у тому числі неферментативному (кислотному), з утворенням цукрів (наприклад, на тирсі з деревини).

Етанол є цінною сировиною для хімічної промисловості та альтернативним енергоносієм. Його отримують також хімічним синтезом з етилену (2 млн т в рік) та біотехнологічним способом з рослинних соків або гідролізатів крохмалю та деревини (5 млн т в рік).

Крім традиційного продуцента – дріжджів роду *Saccharomyces* – промисловий інтерес представляють, принаймні, три продуценти: анаеробна мезофільна бактерія *Zymomonas mobilis*, анаеробна термофільна бактерія *Clostridium thermocellum* та анаеробна екстремально термофільна *C. thermohydrosulfuricum*.

Zymomonas mobilis, яка катаболізує глюкозу шляхом Ентнера-Дудорова, має перед дріжджами ту перевагу, що вона утворює етанол з більшою

швидкістю та виходом, близьким до теоретичного. У свою чергу, перевага *Clostridium thermocellum* і *C. thermohydrosulfuricum* полягає в тому, що при високій температурі в процесі культивування можна відганяти летючу азеотропну суміш, яка містить етанол; не потрібно охолоджувати біореактор; як субстрат можна використовувати не цукри, а більш дешеві полісахариди.

Використання оцтовокислих бактерій. Отримання оцту ґрунтується на здатності оцтовокислих бактерій роду *Gluconobacter* здійснювати неповне окиснення етанолу в ацетат $CH_3CH_2OH+O_2 = CH_3COOH+H_2O$. Бактерії роду *Acetobacter* не накопичують ацетат, так як у них є замкнутий ЦТК і вони здійснюють «переокиснення» ацетату до H_2O і CO_2. За типом субстрату, з якого одержують оцет, він ділиться на столовий (зі спирту), рисовий, яблучний, виноградний (рис. 22.5), грушевий, бальзамічний (з вина з додаванням трав).

Рис 22.5. Виноградний оцет

Також використовують перетворення оцтовокислими бактеріями сорбіту на сорбозу, утворення глюконату та ацетону.

Багато грибів здатні виділяти в середовище органічні кислоти. На відміну від оцтовокислих бактерій це пов'язано з «дезорганізацією» їх метаболізму шляхом зміни умов культивування, що загальмовують діяльність певних ферментів ЦТК. Причиною накопичення проміжних продуктів у «вузьких місцях» може бути надлишок субстрату, зміна pH та концентрація мікроелементів. За допомогою грибів можна отримувати (у тому числі й у промислових масштабах) молочну (*Rhizopus nigricans, Saprolegnia*), фумарову (*Mucor, Rhizopus*), глюконову (*Aspergillus niger*), щавлеву (багато грибів при високому pH), лимонну (*Aspergillus niger*), ітаконову (*Aspergillus terreus*), L-глутамінову (*Corynebacterium glutamicum)* кислоти.

22.2. Мікробні біотехнології

Сучасні методи біотехнології дають змогу забезпечувати безліч людських потреб – від модифікації рослин для підвищення якості харчових продуктів до розробки життєво необхідних медичних препаратів.

Якщо виходити з сучасної реальної практики в біотехнології в основному експлуатується ферментативна активність мікроорганізмів або клітинних культур для отримання цільових продуктів, що з тих чи інших причин неможливо чи нерентабельно отримувати штучним шляхом.

У світовій літературі всякий біотехнологічний процес, від отримання вина до очищення стічних вод, прийнято називати ферментацією. Проте, під терміном «ферментація», ми маємо на увазі не бродильний характер

процесу, а віддаємо данину традиції. Справа в тому, що класичні мікробні технології спочатку були засновані на бродіннях, перш за все, на спиртовому бродінні.

На відміну від неорганічних каталізаторів ферменти, у тому числі «біотехнологічні» ферменти, функціонують у фізіологічних умовах та виявляють три рівні специфічності: субстратну специфічність (стосовно певного класу хімічних сполук); хіральну специфічність (стосовно одного з двох енантіомерів, правого чи лівого); сайт-специфічність (стосовно певного сайту в молекулі субстрату).

Ферменти діють як інструмент біотехнології *in situ*, тобто, в складі клітин, що ростуть, іммобілізованих клітин, або поза клітиною – в результаті їх секреції продуцентом або після їх препаративного виділення.

Ферменти синтезуються в процесі культивування, в основі якого лежать три чинники: культура (продуцент), культуральне середовище (сировина), культиватор (ферментер).

Переваги використання мікроорганізмів як об'єктів біотехнології полягають у наступному:

- пластичності їх метаболізму та здатності до адаптації;
- датності мікроорганізмів змінювати напрямок метаболізму під впливом умов культивування або внаслідок штучної перебудови спадкових структур самої клітини;
- мікроорганізми у сотні разів продуктивніші за тварини та рослини, що обумовлює високий вихід цільового продукту;
- простоті культивування мікроорганізмів, їх технологічності;
- різноманітних методах направленого створення штамів мікроорганізмів із заданими властивостями;
- низькій вартості мікробіологічного виробництва (вихідним матеріалом мікробного синтезу може бути дешева та доступна сировина).

22.2.1. Продуценти

Мікроорганізми є основними продуцентами в біотехнології. Вони мають різну будову, різні метаболічні властивості та належать до різних таксономічних груп (табл. 22.1). Одні з них – прокаріоти (бактерії та археї), інші – еукаріоти (протисти, дріжджі та плісеневі гриби). Скринінг та створення продуцентів – складний та довготривалий процес. Так, витрати на пошук та розробку одного антибіотичного препарату в середньому вартує близько одного мільярда євро та потребує більше 10 років.

Наприклад, основні етапи процесу пошуку та створення мікроорганізмів продуцентів антибіотичних сполук включають:

- Виділення чистих культур мікроорганізмів.
- Визначення антагоністичної активності до спектру тест-штамів мікроорганізмів та відбір перспективного штаму.

- Ідентифікація відібраного штаму-продуцента за послідовністю нуклеотидів 16S рРНК та класичними методами.
- Екстрагування метаболітів із культуральної рідини чи біомаси.
- Проведення метаболомного аналізу продуктів метаболізму методом високоефективної рідинної хроматографії.
- Ідентифікація продуктів метаболізму шляхом повторної ВЕРХ.
- Виділення та очистка методами хроматографії виявленої сполуки.
- Пошук відповідного гена, що відповідає за синтез антибіотика та конструювання рекомбінантного штаму-продуцента.
- Дослідження механізмів біологічної дії антимікробної сполуки.
- Вивчення молекулярної структури активної молекули.
- Доклінічні дослідження.
- Клінічні дослідження.

Таблиця 22.1

Продуценти та продукти, що вони утворюють

Продуценти	Продукти
Leuconostoc, Pediooccus, Lactobacillus, Streptococcus, Acetobacter aceti	Харчові продукти, маринади, кисломолочні продукти, оцет
Corynebacterium glumaticum, C.glumacum, Brevibacterium flavum, Різні бактерії, н. п., *Propionobscterium freudenreichii*	Харчові та кормові добавки глутамат, лізин та ін. Іносинова кислота, рибонуклеотиди, вітаміни
Bacillus licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis, Actinohlanes missoriensis, Streptomyces sp., Escherichia coli	Ферменти (протеаза, амілаза, глюкозоізомераза, пеніциліназа)
Zymomonas mobilis *Clostridium acetobutylicum* *Lactobacillus sp.*	Розчинники етанол, бутанол, ацетон, молочна кислота
Xanthamonas campestris, Leuconostoc mesenteroides. Azotobacter vinelandii	Полісахариди ксантан, декстран, альгінати
Різні види роду *Rhizobium,* *Bacillus thuringiensis*	Бактерійні та ентомопатогенні препарати. Добрива.
Мікобактерії, актиноміцети, бактерії роду *Bacillus*	Лікувальні засоби Стероїди, антибіотики, амінокислоти

До традиційних (молочнокислі бактерії та дріжджі) додається широке коло нетрадиційних продуцетів, що мають широкі можливості. З усіх продуцентів антибіотиків найважливішими є актинобактерії, які синтезують 50% біологічно активних вторинних метаболітів. Абсолютне чемпіонство належить роду *Streptomyces*. Переважно все, на що здатні в плані синтезу антибіотиків ґрунтові актинобактерії, вже відомо, тому пошуки нових продуцентів ведуться в морських біотопах. Наразі серед актинобактерій, що

колонізують морські біотопи виявлені представники родів *Marinophilus, Salinibacterium, Salinispora, Solwaraspora, Verrucosispora* та інші, що утворюють нові перспективні антибактеріальні та протипухлинні антибіотики, зокрема абісоміцин С, диазепіноміцин та саліноспорамід А.

Описано понад 3 тис. мікробних ферментів. Світовий ринок їх оцінюється в більше ніж 5 млрд євро в рік. В основному це ферменти бактеріального та грибного походження. Особливу актуальність набув скринінг ферментів, стійких до екстремальних факторів серед естремофільних мікроорганізмів (алкаліфілів, ацидофілів, галофілів, психрофілів та термофілів). Багатим джерелом ферментів, що здійснюють каталіз в екстремальних умовах, є археї.

Такими прикладами є альфа-амілаза *Pyrococcus spp*. і глюкоамілаза *Picrophilus spp*., целюлолітичний фермент *Sulfolobus spp.,* ксиланаза *Pyrodictium abbyssia*, ендохітиназа *Thermococcus chitonophagus*, серинова протеаза *Thermococcus stetteri*, естераза *Aeropyrum pernix* та ін.

Цінними для молекулярно-біологічних досліджень із використанням ПЛР є ДНК-полімерази *Pyrococcus kodakaraensis* і *Thermococcus litoralis*, а також пірофосфатази з *Thermoplasma acidophilum*, що застосовуються при високоточному секвенуванні ДНК.

22.2.2. Створення виробничих штамів продуцентів

Більшість мікроорганізмів, які використовуються в промислових процесах, спочатку були виділені з природних об'єктів, тому їх важко було вирощувати в стандартних лабораторних умовах. Крім того, навіть після визначення відповідних умов росту вихідні штами часто продукують дуже мало бажаного продукту.

Починаючи з цих виявлених шляхом скринінгу штамів мікроорганізмів, що продукують потрібний цільовий продукт, мікробіологи, використовучи різні підходи та методи, створюють виробничі штами, оптимізовані до промислових умов.

Хімічний і фізичний мутагенез. Як тільки виявлено, що мікроб виробляє багатообіцяючу сполуку, можуть бути використані різноманітні методи мутагенезу для збільшення виходу цього продукту. Протягом багатьох років біотехнологи обмежувалися хімічним, ультрафіолетовим і рентгенівським мутагенезом. Наприклад, пеніцилін спочатку був отриманий у культурі вихідного штаму *Penicillium notatum* з низькою концентрацією пеніциліну. За допомогою мутагенезу отримали штам *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951, який за аерації дає в 55 разів більше пеніциліну, ніж вихідна культура.

Злиття протопластів. Злиття протопластів є ще одним методом, який сприяє генетичній мінливості мікроорганізмів. Протопласти (клітини без клітинної стінки) отримують шляхом вирощування мікробів в ізото-

нічному розчині в присутності ферментів, що руйнують клітинну стінку (н. п., лізоциму для бактерій та хітинази для дріжджів). Протопласти клітин одного або навіть різних видів здатні фізично зливатися при контакті, що призводить до рекомбінації між хромосомами двох організмів, які тепер містяться в одній клітині. Методом злиття протопластів *P. roqueforti* та *P. chrysogenum* створено нові штами продуценти пеніциліну.

Клонування рекомбінантної ДНК. На відміну від хімічного і фізичного мутагенезу та злиття протопластів, генетична передача *in vitro* специфічних генів до мікроорганізму, яким легше маніпулювати та вирощувати, дає змогу використовувати більш цілеспрямований підхід до конструювання продуцента. Процес, коли гени з одного організму клонують в інший, які потім транскрибуються та транслюють необхідний продукт, називають *гетерологічною експресією генів*. Прикладом гетерологічної експресії генів є клонування та експресія генів людського інсуліну в *E. coli*.

Гетерологічна експресія генів дає змогу виробляти специфічні білки та пептиди без забруднення іншими продуктами, що можуть бути синтезовані у вихідному організмі. Такий підхід зменшує час і витрати на виділення та очищення продукту та створює лише біологічно активні стереоізомери.

Оскільки з молекулярнобіологічної точки зору ДНК всіх організмів однакова, то *in vitro* можливо об'єднувати фрагменти ДНК з будь-яких організмів. У цьому сенсі рекомбінація *in vitro* відрізняється від звичайної генетичної рекомбінації, що потребує гомології ДНК і, як правило, здійснюється в межах близькоспоріднених видів. Генетична інженерія, в принципі, відкриває можливість, для переміщення генів між усіма живими організмами.

Щоб створити рекомбінантну ДНК і ввести її в клітину іншого (модельного) організму, необхідно мати інструменти для розрізання молекул ДНК на фрагменти та інструменти для з'єднання фрагментів ДНК, виділених із різних джерел; підібрати переносник, або вектор генів, призначених для введення в клітину модельного організму, що має самостійно реплікуватися в клітині та забезпечувати реплікацію введеного фрагмента ДНК; розробити спосіб введення гібридних або рекомбінантних молекул ДНК у клітину модельного організму; підібрати метод відбору реципієнтної клітини, що сприйняла фрагмент гібридної молекули ДНК.

Найзручнішими векторами є плазміди, оскільки вони, по-перше, здатні реплікуватися незалежно від хромосомної ДНК бактерій. По-друге, плазміди містять гени, завдяки яким по фенотипу можна відокремити бактерії, що містять плазміди, від бактерій, позбавлених плазмід. Наприклад, R-плазміди містять структурні гени, відповідальні за стійкість до антибіотиків. При висіві бактерій, що містять такі R-плазміди, на середовище з антибіотиком вони будуть рости і формувати колонії, а бактерії, позбавлені R-плазміди, на середовищі з антибіотиком не зможуть рости.

Схема конструювання рекомбінантної ДНК та клонування генів у клітинах бактерій зображено на рис. 22.6. Різати молекули ДНК на фрагменти можна за допомогою ферментів рестриктаз. Для цього необхідно підібрати специфічну рестриктазу, що мала б сайти впізнавання на обох молекулах ДНК (плазміді та ДНК, з якої вирізаються гени для перенесення) і різала б їх з утворенням липких кінців. Рестриктаза не повинна розрізати ДНК плазміди в області, що відповідає за реплікацію, і в області структурних генів, що детермінують фенотип плазміди. З'єднувати або зшивати фрагменти ДНК можна за допомогою ферментів полінуклеотидлігаз.

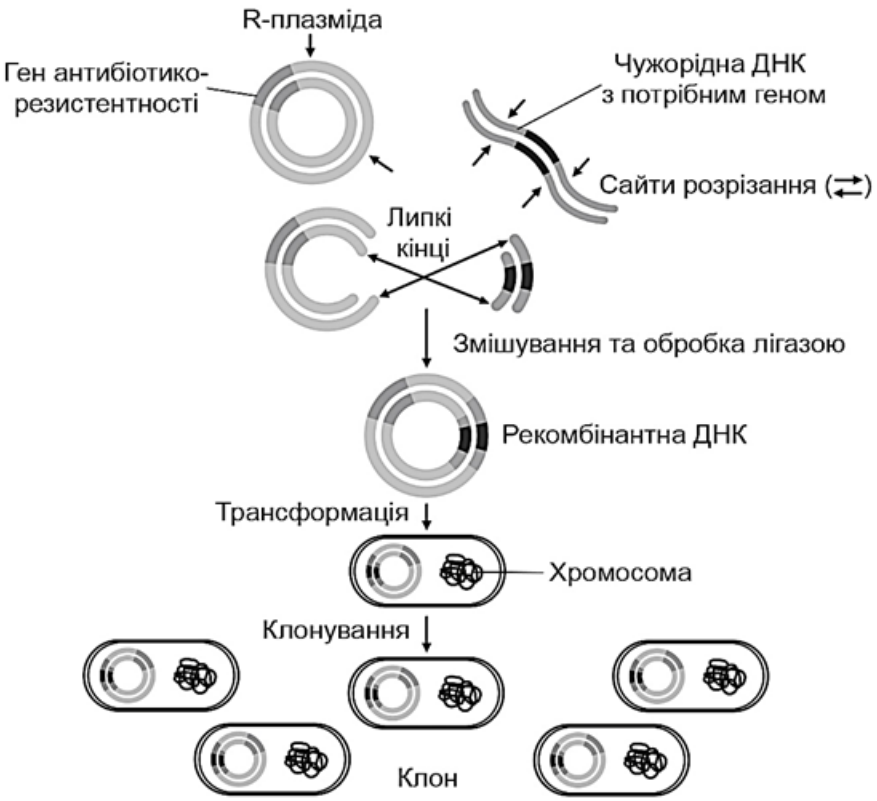


Рис. 22.6. Клонування рекомбінантної ДНК

Вводити рекомбінантні молекули ДНК можна за допомогою трансформації. Для цього рекомбінантною ДНК обробляють реципієнтні клітини модельного мікроорганізму (клітини, в які клонують потрібний ген) і через певний проміжок часу витримування при оптимальній температурі суміш висівають на селективне середовище, що дозволяє відібрати за фенотипом колонії, що сприйняли плазміду та набули резистентності до антибіотика.

Метод клонування знайшов широке застосування. З його допомогою можна отримувати мікробіологічним шляхом корисні для людини продукти. Наразі розроблено методи мікробіологічного отримання гормону інсуліну, який потребують хворі на діабет. Раніше його отримували шляхом екстрагування з підшлункових залоз корів і свиней, що дуже складно і дорого.

Розроблено також методи отримання інтерферонів – білків, що мають антивірусну дію, соматостатину – гормону росту та ін. Гени, що детермінують синтез цих речовин, клоновані переважно в клітини *E. coli*.

Виробництво чужих білків часто порушує високорегульований баланс окисно-відновної потужності клітини-хазяїна (н.п., НАДН/НАД$^+$) і АТФ. Тому необхідно оптимізувати регуляторну та метаболічну діяльність клітини, щоб максимізувати виробництво. Це називається метаболічною інженерією. Застосування з цією метою «омічних» даних (наприклад, геномних, транскриптомних, протеомних і метаболомних даних) для керування генетичними процесами клітини хазяїна називають системною метаболічною інженерією.

Спрямована еволюція. До появи геномного секвенування кількість і місця більшості мутацій залишалися загадкою. Спрямована еволюція (відтворення природного етапу еволюції у лабораторних умовах) використовує більш раціональний підхід до конструювання виробничих штамів, оскільки лише гени, що являють інтерес, є мішенню для мутагенів. У більшості випадків це вимагає, щоб послідовності генів були змінені *in vitro*, а потім замінені у вихідному штамі або гетерологічному хазяїні, який краще придатний для виробництва сполуки у великій кількості.

Біотехнологи виявили, що навіть незначні амінокислотні заміни можуть призвести до неочікуваних змін у функції та стабільності білка, що дає вищий врожай необхідних продуктів або продуктів з новими бажаними властивостями. До активного виробництва бажаного продукту можуть призвести також зміни регуляторних послідовностей в геномі.

Кілька технічних досягнень були ключовими для розробки методології спрямованої еволюції. Перший – це сайт-спрямований мутагенез. У цій техніці змінюється нуклеотидна послідовність певного гена. Зовсім недавно CRISPR/Cas технологія стала основним методом редагування еукаріотичних геномів.

Шляхи біосинтезу певних видів природних продуктів роблять їх особливо придатними для біоінженерії. Наприклад, полікетидні та нерибосомні пептидні антибіотики стали зразками біоінженерії, оскільки біосинтетичні ферменти згруповані у великі модульні комплекси, які функціонують у конвеєрному режимі.

Розвиток високопродуктивного скринінгу (ВПС) дозволяє швидко вибрати бажані молекули із десятків тисяч кандидатів. ВПС використовує комбінацію робототехніки та комп'ютерного аналізу для скринінгу зразків

молекул і навіть цілих клітин за певною ознакою, як правило, у 96-лункових мікропланшетах. Поєднання підходів спрямованої еволюції та ВПС підняло промислову мікробіологію на новий рівень дослідження та ефективності.

Синтетична біологія. Синтетична біологія – це наука, що розробляє нові біологічні системи або перепрофільовує існуючі в природі системи. Інакше кажучи, галузь синтетичної біології передбачає передову інженерію біологічних систем (в першу чергу мікроорганізмів) для виконання нових функцій. У 2010 році повний геном *Mycoplasma mycoides* був успішно синтезований і пересаджений в існуючу клітину *Mycoplasma capricolum*, в якої було видалено власну ДНК. Створена бактерія була здатна рости і отримала назву *Synthia*. На сьогодні прикладом застосування методології синтетичної біології може слугувати створення мікроорганізмів, які шукають і вбивають клітини ракових пухлин, і перепланування фотосинтезу для виробництва енергії, яку можна подавати в існуючі електричні мережі.

Синтетична біологія має головні переваги перед методами, що обговорювалися досі. По-перше, ефективніше зібрати великі масиви генів, що кодують ферменти, які виконують заплановані дослідником складні завдання, ніж намагатися знайти вже існуючу таку збірку в природі. Наприклад, зібрання кількох генів рослин, грибів і бактерій в єдиний мікроорганізм-хазяїн призвів до появи ряду нових видів біопалива.

По-друге, потреба в метаболічній інженерії може бути повністю обмежена, коли нові гени синтезуються *in vitro* для специфіки конкретного хазяїна.

По-третє, синтетична біологія може змішувати та поєднувати регуляторні механізми з експресією генів, якою зазвичай керують інші засоби. Прикладом є розробка бактеріального штаму, який шукає пухлинні клітини та вивільняє свій протиракoвий лікарський вантаж, що запускається механізмом регуляції відчуття кворуму (quorum sensing).

22.2.3. Сировина

Створений штучно, або знайдений в природі продуцент служить «робочою конячкою» біотехнології, а реалізація його ферментативної активності забезпечується завдяки використанню сировини та ферментерів.

Сировина – це субстрат, на який діють ферменти продуцента. При цьому може використовуватися одна з трьох стратегій (рис. 22.7).

Перший шлях. Продуцент росте на багатокомпонентному біологічному субстраті, змінюючи його біохімічний склад та консистенцію. Біомаса продуцента разом із трансформованим субстратом утворюють неподільний цільовий продукт, характерним прикладом якого є йогурт.

Другий шлях. Продуцент вступає у тимчасовий контакт із субстратом для того, щоб змінити його біохімічний склад. Якщо йдеться про індивідуальну сполуку та конкретну зміну його молекулярної структури, це нази-

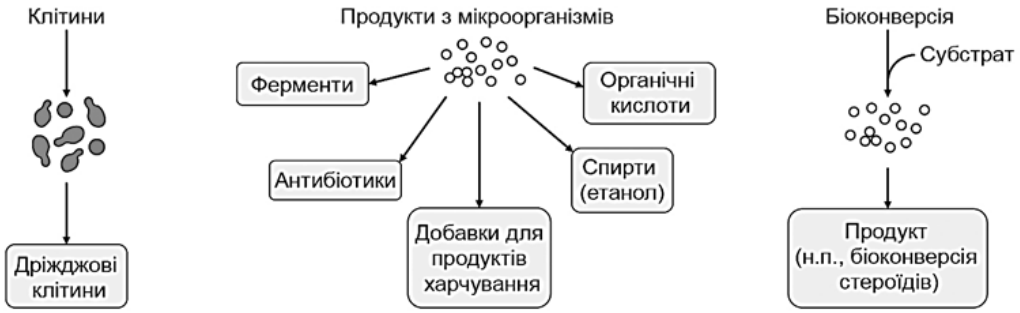


Рис. 22.7. Шляхи використання продуцентів

вається мікробною трансформацією або біоконверсією. Характерний приклад – трансформація гідрокортизону в преднізолон.

Третій шлях. Продуцент росте на спеціально підібраному поживному середовищі з мінімально необхідним набором субстратів. В даному випадку цільовим продуктом є клітини продуцента або їх компоненти, що накопичуються в клітинах (ендогенні) або в культуральному середовищі (екзогенні). Характерним прикладом можуть бути антибіотики.

Джерела вуглецю поділяються на неорганічні та органічні. Серед неорганічних джерел вуглецю реальне промислове значення мають диоксид вуглецю, метан та метанол. Їх використовують виробничі штами фотосинтезуючих або хемосинтезуючих бактерій, зокрема *Spirulina spp*., *Acidithiobacillus ferrooxidans, Methylophilus methylotrophus*.

Набагато ширше використовуються органічні джерела вуглецю. Вони, у свою чергу, поділяються на невідновлювані та відновлювані, а також на полімерні та неполімерні. Невідновлювані джерела вуглецю – продукти автотрофного біосинтезу, поховані в далекі геологічні епохи: нафта та газ.

Відновлювані джерела вуглецю – це цільна біомаса або окремі структурні або запасні полімери рослин (в першу чергу целюлоза та крохмаль), продукти ферментативної або хімічної деполімеризації цих полімерів, а також сахароза – основний вуглецевий компонент рослинного соку бурякових культур та цукрової тростини.

Як джерело азоту можуть використовуватися білки, сечовина або мінеральні солі. Джерелом інших макро- та мікроелементів також є мінеральні солі. Крім основних субстратів, якими задовольняються прототрофи, часто вводяться поживні добавки, що містять вітаміни та інші фактори росту – дріжджовий автолізат, кукурудзяний екстракт, пептон, молочна сироватка та ін.

22.2.4. Ферментери

Типова промислова установка ферментації з перемішуванням показана на рис. 22.8. Для виробничої ферментації потрібний посівний матеріал. Він вирощується на тому ж виробництві або надходить зі спеціалізованих

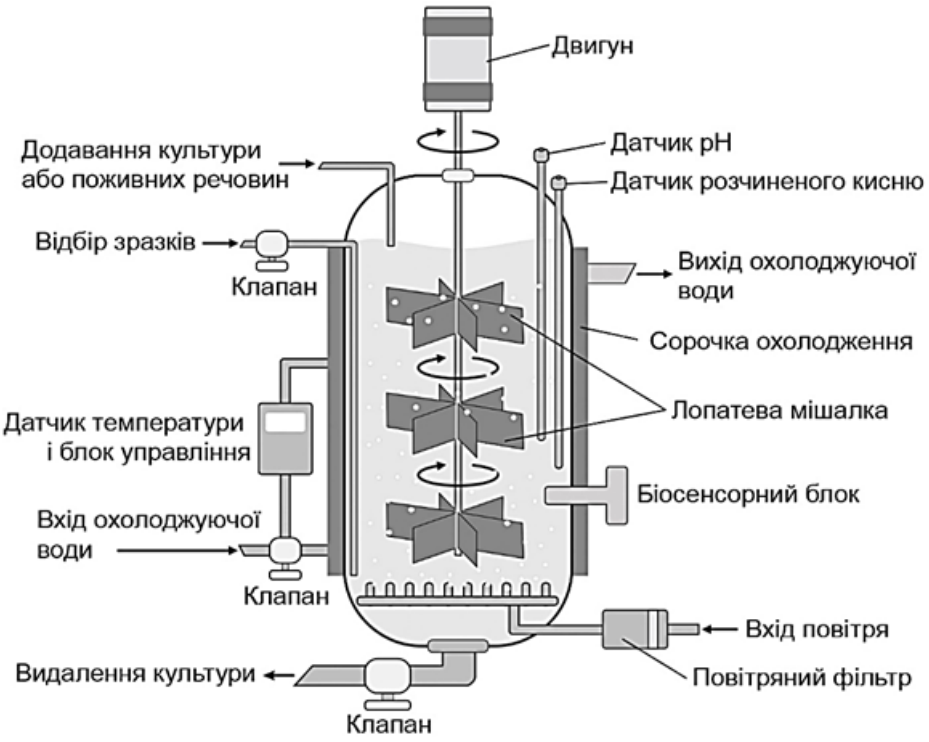


Рис. 22.8. Схема промислового ферментера

підприємств у вигляді стартової культури чи закваски. З метою одержання посівного матеріалу, а також у центральному виробничому процесі – головній ферментації, використовуються ферментери.

Залежно від розміру ферментер може служити як для виробничих, так і для дослідницьких потреб або виконувати виключно виробничі функції. Як правило, ферментер є циліндричною ємністю із співвідношенням висоти та діаметра 3:1, з датчиками та/або пристроями для відбору зразків, а також пристроями для термостатування, перемішування та піногасіння, захищеними від мікробної контамінації, входами для поживного середовища, посівного матеріалу та буферних розчинів; виходами для видалення культури.

Мікроорганізми часто вирощують у ферментерах із перемішуванням або інших системах масового культивування. Залежно від виробничих вимог об'єм ферментерів із перемішуванням варіює від 3 літрів до понад 10 000 літрів. Не зупиняючись на конструктивних особливостях ферментерів, відзначимо, що вони поділяються на: лабораторні (об'єм до 10 л); напіввиробничі (10^3 л) та виробничі ферментери для головної ферментації (обсяг 10^4 л і більше).

Ступінчастий перехід від культивування в меншому ферментері до культивування у більшому ферментері називається масштабуванням; об'ємний коефіцієнт масшабування перебуває в межах одного-двох порядків.

Залежно від конструкції ферментера, а також від завдань, що вирішуються з його допомогою, він може працювати як у режимі періодичного, так і у режимі безперервного культивування.

22.2.5. Ферментація

У енергетичному метаболізмі термін ферментація є синонімом бродіння. Однак для промислових мікробіологів термін ферментація означає культивування мікроорганізмів, рослинних і тваринних клітин.

Залежно від консистенції субстрату ферментація підрозділяється на рідкофазну та твердофазну. Більшість сучасних ферментацій пов'язано з використанням «зануреного» субстрату, який розчинений у воді, знаходиться в колоїдному стані або утворює суспензію різного ступеня дисперсності.

На відміну від цього при твердофазній ферментації на поверхні субстрату не видно вологи, хоча він містить зв'язану воду (зокрема, лігноцелюлозний комплекс несе 75% абсорбованої води). Такі субстрати характеризуються низькою активністю води, що викликає у бактерій (для яких потрібно $a_w > 0,91$) стан стресу, несумісний з можливістю їхнього практичного використання. Дріжджі та плісеневі гриби характеризуються більшою толерантністю до низької активності води (відповідно, $a_w > 0,88$ та $> 0,62$), що дозволяє широко використовувати їх для отримання цільових продуктів із зволоженої рослинної та тваринної біомаси.

Порівняно з рідиннофазною ферментацією твердофазна ферментація має як переваги, так і недоліки. До переваг належать: висока концентрація екзоферментів, висока концентрація продуктів реакції та можливість їх вилучення невеликим обсягом екстрагуючого агента, зміна консистенції субстрату, збагачення субстрату біомасою продуцента та його екзопродуктами.

Недоліками твердофазної ферментації є складність забезпечення масообміну; необхідність великої кількості інокулуму, який неможливо гомогенно розподілити в товщі субстрату; утруднене постачання киснем і проблема з відведенням тепла. Незважаючи на перелічені недоліки, метод твердофазної ферментації широко застосовується у виробництві традиційних продуктів харчування: хліб, сир, салямі, темпе, соєвий соус, натто та ін.

Культивування мікроорганізмів у промислових умовах значно відрізняється від їхнього росту в природі чи лабораторії. Промислові ферментації вимагають розробки відповідних поживних середовищ і перенесення дрібномасштабних технологій у більший масштаб.

Після інокуляції посівного матеріалу у стерильне середовище проводять аерацію, коригування pH і температури, а також відбір проб для під-

тримання суворо контрольованих умов. При необхідності додають агенти, що контролюють піноутворення, особливо у середовищі з високим вмістом білка. Для моніторингу показників, що визначають біомасу, рівні критичних продуктів метаболізму, pH, склад вхідних і вихідних газів та інші параметри, використовують комп'ютери.

Різні продукти біотехнологічних виробництв отримують за своїми технологіями, біологічними продуцентами, сировиною та технологічними режимами. Загальна, типова схема майже всіх біотехнологічних виробництв складається зі стадій, у кожній із яких сировина отримує окремі технологічні перетворення (рис. 22.9).

Рис. 22.9. Загальна схема біотехнологічного виробництва

Біотехнологічна стадія є основною стадією виробництва, в якій субстрат перетворюється в необхідний продукт за участю біологічного об'єкта (мікроорганізм, ізольовані клітини, ферменти або клітинні органели).

Перед біотехнологічною стадією необхідно підготувати сировину, посівний матеріал, простерилізувати повітря, а після завершення біотехнологічного процесу розділити рідину та біомасу, виділити продукт біосинтезу, а за необхідності, його очистити. На окремих етапах біотехнологічне виробництво має певні стоки та викиди в атмосферу, очищення яких має свій окремий біотехнологічний виробничий процес.

Існують інші підходи до культивування, серед яких методи безперервного культивування з використанням хемостатів. Іноді це може помітно покращити рівень використання субстрату та вихід продукту, тому що мікроорганізми можуть підтримуватись в логарифмічній фазі росту.

Мікробні продукти можна класифікувати як первинні та вторинні метаболіти. Первинні метаболіти складаються із сполук, пов'язаних із синтезом мікробних клітин під час експоненційного росту. Вони включають амінокислоти, нуклеотиди та кінцеві продукти бродіння, такі як етанол і органічні кислоти. Корисні ферменти, як продукти, зазвичай, синтезуються мікроорганізмами також під час логарифмічної фази росту.

Вторинні метаболіти зазвичай накопичуються, коли поживні речовини стають обмеженими або продукти життєдіяльності накопичуються після фази активного росту, і тому не виробляються в хемостатах. Антибіотики відносять до вторинних метаболітів.

22.2.6. Іммобілізація

Інший спосіб використання біохімічної активності мікроорганізмів – це прикріплення їх до носія чи фіксація всередині носія. Прикріплення відбувається шляхом адсорбції, за допомогою іонних, гідрофобних або ковалентних зв'язків.

Перший промисловий процес з використанням іммобілізованих клітин *Escherichia coli* відбувався в поліакріламідному гелі для одержання аспарагінової кислоти. Наразі існує багато біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків). Іммобілізовані мікроорганізми використовують також при очищенні стічних вод від токсичних сполук, зокрема, фенолу, бензолу, гексаметилендіаміну. Створені системи очистки стічних вод нейлонового виробництва від циклічного димеру амінокапронової кислоти; денітрифікації стічних вод та вилучення з них важких металів сумішшю адсорбованих мікроорганізмів.

Найбільше розповсюдження одержали методи, що передбачають включення клітин у різні гелі. Клітини, іммобілізовані в поліакриламідний, альгінатний і карагінановий гелі, можуть зберігати життєздатність і за наявності поживних речовин розмножуватись.

22.2.7. Продукти мікробних біотехнологій

Спектр цільових продуктів біотехнології надзвичайно широкий – від традиційних продуктів харчування, коли використовують індивідуальні мікроорганізми, до ремедіації забрудненого природного середовища, коли використовують колективний процес діяльності різних мікроорганізмів і отримують колективний результат – оздоровлене довкілля. Наведемо декілька самих поширених мікробних продуктів, що стали частиною сучасного життя.

Антибіотики. Більше 65% усіх антибіотиків виробляють з допомогою мікроорганізмів. Основними продуцентами антибіотиків є представники роду *Streptomyces* і плісеневі гриби. Антибіотики використовують в нативному або хімічно модифікованому стані (напівсинтетичні).

Синтез пеніциліну та його похідних може слугувати прикладом того, як виробляють антибіотики. Ріст гриба *Penicillium chrysogenum* вимагає ретельної оптимізації складу середовища та умов культивування. Для отримання певного виду пеніциліну, до середовища додають певний попередник, наприклад, фенілоцтову кислота для максимального утворення пеніциліну G, який має бічний бензильний ланцюг.

Після завершення культивування культуральну рідину відокремлюють від біомаси. Антибіотик виділяють шляхом абсорбції, осадження та кристалізації для отримання чистого кінцевого продукту. Цей основний продукт можна хімічно модифікувати для отримання різноманітних напівсинтетичних пеніцилінів. Виробництво модифікованих β-лактамних антибіотиків, таких як ампіцилін і амоксицилін, починається з природного пеніциліну. При цьому β-лактамне кільце зберігається, а бічний ланцюг хімічно модифікується.

Амінокислоти. Амінокислоти лізин і глутамінова кислота використовуються в харчовій промисловості як харчові добавки до хлібобулочних виробів і як сполуки, що підсилюють смак, наприклад, глутамат натрію.

Виробництво амінокислот зазвичай здійснюється мутантними бактеріями з порушеною регуляцією, які надлишково продукують конкретну амінокислоту або ключовий проміжний продукт. Виробництво глутамату та кількох інших амінокислот здійснюється за допомогою мутантних штамів *Corynebacterium glutamicum*, які не мають або мають лише обмежену здатність переробляти α-кетоглутарат циклу трикарбонових кислот до сукциніл-КоА.

Підтримання низького рівня біотину та додавання похідних жирних кислот збільшує проникність мембран, що дозволяє секрецію високих концентрацій глутамату. Мутантні бактерії замість порушеного ЦТК використовують гліоксилатний цикл, щоб задовольнити свої потреби в основних біохімічних проміжних продуктах, особливо під час фази логарифмічного росту. Коли поживні речовини виснажуються, ріст продуцента припиняється та відбувається майже повне молярне перетворення ізоцитрату в глутамат.

Органічні кислоти. Органічні кислоти, такі як лимонна, оцтова і молочна в основному використовуються як консерванти. Лимонну кислоту використовують також як ароматизатор, антиоксидант і зазвичай додають в їжу для придання певного смаку. Виробництво цієї органічної кислоти ілюструє, як концентрація мікроелементів може впливати на вихід кінцевого продукту.

Її виробництво передбачає обмеження вмісту в середовищі таких металів як марганець і залізо, що зупиняє ріст продуцента *Aspergillus niger* в певній точці кривої росту, як правило, при високій концентрації цукру (від 15 до 18%). При цьому спрацьовують механізми регуляції гліколізу та циклу трикарбонових кислот (нагадаємо, що лимонна кислота входить в склад ЦТК). За високого рівня цукру після фази активного росту активність цитратсинтетази зростає, а активність аконітази та ізоцитратдегідрогенази знижується, що призводить до гіперсинтезу лимонної кислоти.

Біополімери. З допомогою мікроорганізмів отримують полісахариди, які використовують для зміни характеристик плинності рідин і утворення гелей. Вони знаходять широке застосування в фармацевтичній та харчовій промисловості. Такі біополімери як декстрани використовують в якості абсорбентів та для збільшення об'єму крові; полісахариди ервіній застосовують у фарбах; поліефіри, отримані з *Pseudomonas oleovorans* – для виготовлення спеціальних пластмас; мікрофібрили целюлози *Acetobacter* spp. слугують харчовими загусниками; полісахариди, такі як склероглюкан, використовуються в нафтовій промисловості як добавки до бурового розчину; полімери ксантану *Xanthomonas campestris* – для застосування в якості харчових добавок.

Біосурфактанти. Біосурфактанти є амфіфільними молекулами, тобто мають як гідрофобну, так і гідрофільну області. Завдяки цьому вони розподіляються на межі між рідинами, що протилежні за полярністю, такими як нафта та вода. З цієї причини біосурфактанти використовуються для емульгування, підвищення мийної здатності, змочуваності та солюбілізації.

Ці властивості особливо важливі в процесах біоремедіації для розсіювання розливів нафти та підвищення видобутку нафти. Самими поширеними мікробними біосурфактантами є гліколіпіди, що містять довголанцюгові жирні кислоти. Їх можна отримувати у вигляді позаклітинних продуктів із різноманітних мікроорганізмів, наприклад, з псевдомонад та дріжджів.

Ферменти. Світовий ринок мікробних ферментів оцінюється в більше 5 млрд євро в рік. Майже всі ферменти, що використовуються в промислових процесах, отримують з мікроорганізмів. В найбільших кількостях виробляються протеази, глюкоамілаза, α-амілаза та глюкозоізомераза, які використовують для гідролізу крохмалю, в виробництві фруктових соків, алкогольних напоїв, миючих засобів та ін.

Особливо цінні «термофільні» ферменти (н.п., α-амілаза, глюкоамілаза, целюлолітичний фермент β-амілаза, ксиланаза, ендохітиназа, серинова протеаза, естераза), які забезпечують високу швидкість реакції та стійкість до інфікування сторонніми мікроорганізмами.

Виняткову цінність для молекулярно-біологічних досліджень із використанням ПЛР-реакції набули термофільні ДНК-полімерази та пірофосфатази, що застосовують при високоточному секвенуванні ДНК.

Ферменти дегідрогенази, оксигенази, гідролази, трансферази та ліази використовують також в промисловому виробництві хімічних та фармацевтичних препаратів. Ці ферменти можуть модифікувати молекулу, вставляючи гідроксильний чи кеторадикал або атом кисню в складну циклічну структуру. Типовою біоконверсією є гідроксилювання стероїду (рис. 22.10). Для цього стероїд розчиняють в ацетоні та додають до попередньо вирощеної культури гриба *Rhizopus nigricans*.

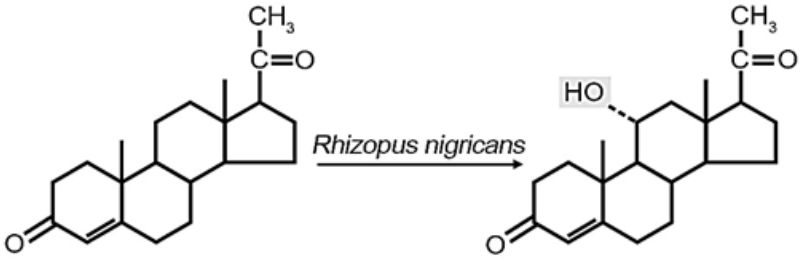


Рис. 22.10. Біотрансформація молекули прогестерону шляхом його гідроксилювання грибом *Rhizopus nigricans*

Біокаталіз зазвичай має перевагу перед хімічним синтезом, тому що природні ферменти мають стереоспецифічність, і завдяки їй продукт не є сумішшю ізомерів.

Вакцини. Вакцини є найважливішим засобом у боротьбі зі збудниками інфекційних хвороб. Найпоширенішими вакцинами є живі ослаблені збудники. Однак необхідно використовувати інші стратегії вакцинації, якщо існує занадто велика генетична різноманітність патогенних штамів або якщо патоген виробляє молекули, що надто схожі на молекули хазяїна і тому запускають аутоімунні реакції. Це стосується серовару B *Neisseria meningitidis* (MenB), одного з п'яти штамів цієї бактерії, що викликає менінгіт.

Вакцина проти менінгіту була виготовлена з капсульного полісахариду інших чотирьох сероварів та використовувалась протягом багатьох років. Полісахарид капсули бактерій серовару B дуже нагадує полісахарид, що знаходиться на поверхні багатьох клітин людини, тому для розробки вакцини проти серовару B застосували підхід зворотної вакцинології. Для використання такого підходу вивчають геномну послідовність збудника, щоб виявити антигени, які можуть бути прийнятними для створення вакцини.

Щоб зрозуміти зворотну вакцинологію, корисно згадати, що антиген – це чужорідна молекула, до якої імунна система хазяїна виробляє антитіла. Для вакцин можна використовувати очищені антигени, а не цілі мікроорганізми. Такі антигени повинні експресуватись патогеном під час інфекції, виділятись або знаходитись на поверхні збудника, бути у всіх штамів збуд-

ника, викликати імунну відповідь хазяїна та бути необхідними для виживання збудника, принаймні, поки він знаходиться в хазяїні.

Використовуючи повну послідовність геному *N. meningitidis* серогрупи В, було ідентифіковано 600 поверхневих білків і близько 300 протестовано на мишах. З них близько 25 заслуговували на подальше вивчення, що призвело до відкриття кількох антигенів, які в комбінації індукують стійку імунну відповідь.

Зворотна вакцинологія в даний час застосовується при розробці вакцин для захисту від ряду інших патогенів, включаючи *Staphylococcus aureus,* стрептокок групи В (*Streptococcus agalactiae*), *Chlamydophila pneumoniae* і *Bacillus anthracis*.

Мікроорганізми як біотехнологічні продукти. *Діатомові водорості* викликали інтерес у нанотехнологів. Ці фотосинтетичні протисти виробляють складні кремнеземні оболонки, що відрізняються у різних видів (рис. 22.11 а). Нанотехнологи зацікавлені в діатомових водоростях, оскільки вони створюють точні структури, які можна використовувати для виготовлення оптичних, каталітичних або електричних матеріалів. Кремнезем у цих оболонках можна хімічно перетворювати на кремній для застосування в наноелектроніці. Інше застосування передбачає використання діатомових раковин для покриття сонячних елементів, оскільки оболонки діатомових водоростей захоплюють у три рази більше електронів, ніж стандартні покриття.

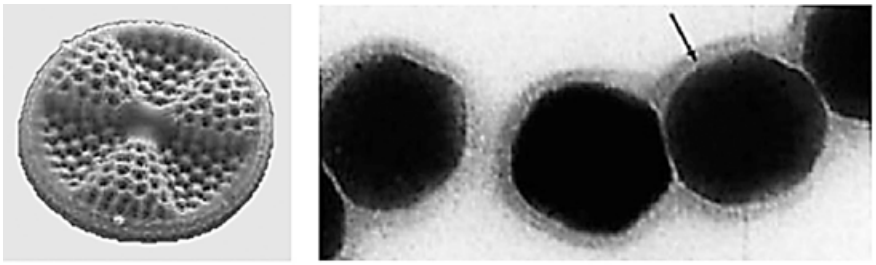


Рис. 22.11. Скануюча електронна мікрофотографія діатомової водорості *Actinoptychus* sp. (а), діаметр якої коливається від 20 до 150 мкм (а). Магнетосоми *Magnetospirillum magnetotacticum* (б); кожна розміром близько 50 нм

Нанотехнологів цікавлять також *магнітобактерії*, які перетворюють залізо в магнетит та утворюють магнетосоми (рис. 22.11 б). Розміри та форми магнетосом різняться між видами, але як і раковини діатомових водоростей, вони ідеально сформовані, незважаючи на те, що мають лише десятки нанометрів у діаметрі. Магнетосоми мають точні форми та мембрану, яка оточує магнетосому. Ця мембрана забезпечує приєднання корисних біологічних молекул, таких як ферменти та антитіла, які можна цілеспрямовано доставляти до місця призначення в організмі людини. Потенційні застосу-

вання магнетосом, що зараз досліджуються, також включають їх використання як контрастного середовища для покращення магнітно-резонансної томографії та як біологічних зондів для виявлення раку на ранніх стадіях.

Біопаливо. Оскільки населення та економічний ріст підвищують потребу в енергії, більшість країн зобов'язались вжити заходів для обмеження вмісту атмосферного CO_2 до 450 частин на мільйон до 2100 року. Ключовим кроком до досягнення цієї мети є розробка економічно конкурентоспроможних альтернатив викопному паливу. Виробництво енергії включає мікробне перетворення органічних матеріалів у етанол і водень, які можуть служити пальним для автомобілів та інших машин.

Наразі етанол використовується як добавка до бензина, оскільки його легко зберігати та можна спалювати в автомобілях, призначених для використання чистого бензину. Виробництво біопалива з використанням рослинних залишків, а також невибагливих рослини, що швидко ростуть (павловнія, міскантус, верба, тополя), починає замінювати виробництво біопалива на основі крохмалю.

Однак етанол поглинає воду, тому є проблеми з його транспортуванням. Крім того, етанол набагато менше енергоємний, ніж інші види палива, включаючи бензин і високомолекулярні спирти, такі як бутанол, які легше виробляти. Це спонукало створення мікроорганізмів, які виробляють інші спирти, ізопреноїди та вуглеводні, що нагадують бензин своєю низькою гігроскопічністю, високою енергоємністю та високою плинністю на холоді.

У багатьох відношеннях водень (H_2) як біопаливо дуже вигідно відрізняється від інших видів палива. Маючи приблизно в три рази більше потенційної енергії на одиницю ваги ніж бензин, H_2 є паливом з найвищим вмістом енергії. Однак, на відміну від етанолу водень не можна просто змішувати з бензином і використовувати в сучасних автомобілях. Це призвело до розробки електромобілів на паливних елементах, що випускають лише водяну пару та тепле повітря.

Водень продукують різноманітні мікроорганізми, що може робити його виробництво досить гнучким. Він виробляється кисневими фотосинтезуючими ціанобактеріями та водоростями, а також аноксигенними фотогетеротрофними бактеріями. У цьому задіяні два різні дуже чутливі до кисню ферменти, що генерують H_2, – гідрогеназа та нітрогеназа.

Оксигенні фотосинтезуючі мікроорганізми виробляють H_2 вночі, коли вони окиснюють відкладені в клітині запасні речовини, такі як полі-β-гідроксибутират. Недоліком використання водних фототрофів для генерування H_2 є те, що їх гідрогеназа сильно пригнічується воднем, тому H_2 необхідно видаляти із системи, як тільки він утворюється.

Навпаки, виробництво H_2 у оксигенних фотогетеротрофних бактерій крім гідрогенази здійснюють також нітрогенази. Це важливо для промислових мікробіологів, оскільки в атмосфері, штучно очищеній від N_2, нітро-

геназа буде утворювати тільки H_2. При цьому ефективність використання електронів на утворення H_2 досягає майже 100%.

Очевидно, що невпинне зростання потреби в енергії зрештою зробить викопне паливо непомірно дорогим і завдяки успіхам синтетичної біології замість видобування нафти будемо утворювати вуглеводні в біореакторах, а H_2 стане важливим мікробіологічним продуктом в Україні.

22.2.8. Мікробні паливні елементи

Перспективний біоінженерний напрям у мікробіології, що активно розвивається, – це використання бактерій для прямого виробництва електроенергії шляхом безпосереднього захоплення електронів із електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) мікроорганізму. Деякі гетеротрофні мікроорганізми окиснюють органічний субстрат, а електрони можуть передавати безпосередньо на електрод.

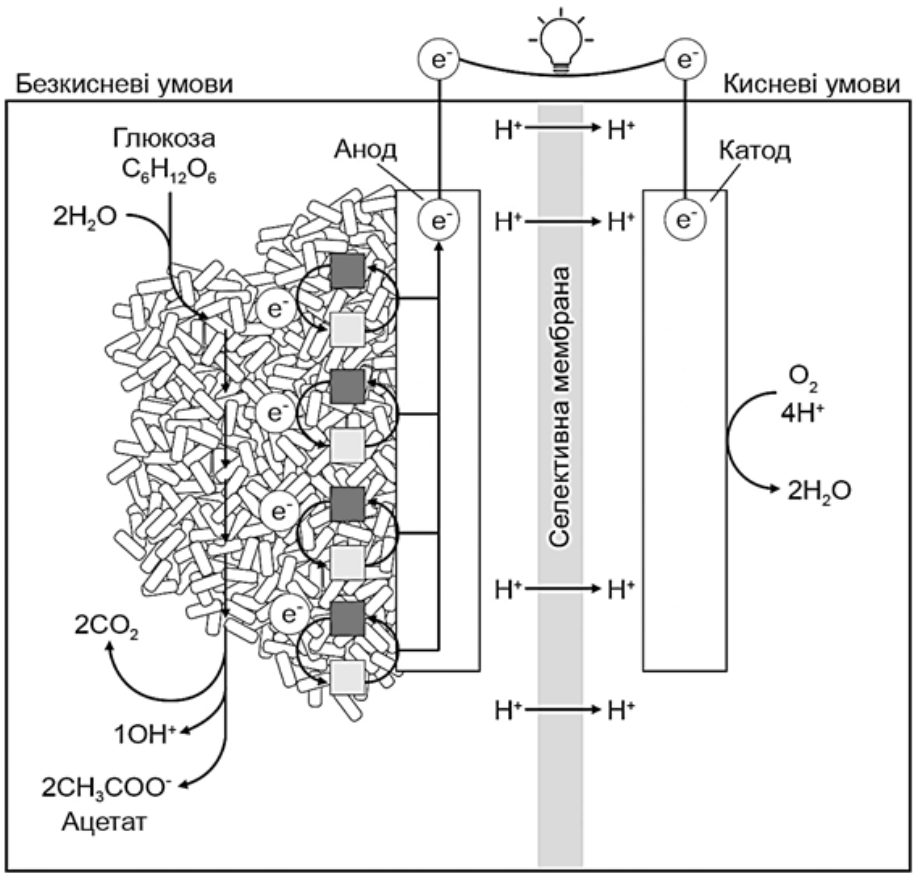


Рис. 22.12. Мікробний паливний елемент. Чорні квадратики – окиснені переносники електронів, сірі квадратики – відновлені переносники електронів

Базова конструкція мікробного паливного елемента МПЕ відносно проста (рис. 22.12). Він складається з двох камер – кисневої та безкисневої, розділених селективної мембраною, що пропускає протони.

При споживанні органічного субстрата у безкисневій камері вивільнюються протони та електрони. Протони дифундують через селективну мембрану до кисневої камери, а електрони з ЕТЛ мікроорганізму передаються на анод, що з'єднаний з катодом. Електрони переміщуються до катода, що створює електричний струм. Каталізатор в кисневій камері об'єднує протони, електрони та кисень з утворенням молекул води.

22.2.9. Біовилуговування металів

Мікробне вилуговування металів засноване на біохімічній взаємодії бактерій з мінералами, в результаті якого атоми металу з вузлів кристалічних ґрат в йонній формі переходять у розчин (прикладом служить отримання міді із сірчистих руд) та на біологічному окисненні, коли бактерії руйнують мінерал, проте метал залишається в елементній формі (прикладом є вилучення домішок золота з арсенопіриту).

Біореактори для вилуговування металів діють у багатьох країнах світу. Таке поширення даної технології обумовлено, по-перше, тим, що родовища руди, де видобуток металів здійснюється фізико-хімічними методами, виснажуються; по-друге, тим, що мікробне вилуговування дешеве та низькоенергоємне; по-третє, мікробне вилуговування дозволяє повністю вилучити метал з відходів традиційних гірничодобувних систем.

Мікробне вилуговування можуть здійснювати хемосинтезуючі залізо- або сіркобактерії *Acidithiobacillus caldus, A. ferrooridans, A. thiooxidans, Leptospirillum ferrooxidans* та *Sulfobacillus spp*., а також археї *Acidianus spp*., *Ferroplasma spp., Metallosphaera spp.* та *Sulfolobus spp*.

При мікробному вилуговуванні бідні руди формують у великі відвали і поливають водою, що просочується через цей відвал (рис. 22.13). При цьому хемолітотрофні мікроорганізми ферментативним шляхом окиснюють атоми сірки у вузлах кристалічних ґрат до сірчаної кислоти. Сірчана

Рис. 22.13. Відвали низькосортної руди (а) та дренажні води з такого відвалу (б)

кислота, що утворилась, розчиняє мінерал і перетворює атоми заліза в катіони Fe^{2+}, а атоми міді – у катіони Cu^{2+}, що переходять в розчин. Крім цього, мікроорганізми ферментативним шляхом окиснюють катіон Fe^{2+} в катіон Fe^{3+}, а катіон Fe^{3+} у свою чергу окиснює атоми міді в катіони Cu^{2+}.

Ключова реакція вилуговування міді насправді не є безпосередньо бактеріальним окисненням сульфіду міді (CuS). Окиснення сульфіду відбувається окисненим залізом (Fe^{3+}), що утворюється в результаті бактеріального окиснення двовалентного заліза (рис. 22.14). У будь-якій мідній руді також присутній FeS_2, а окиснення його бактеріями призводить до утворення Fe^{3+}. Спонтанна реакція CuS з Fe^{3+} протікає за відсутності O_2 і утворює Cu^{2+} та Fe^{2+} (рис. 22.14).

Рідина, що витікає з нижньої частини відвалу (рис. 22.13), яка багата на розчинені метали, транспортується до осадової установки, де метал осаджують і очищають, а рідина закачується назад до верхньої частини відвалу, і цикл повторюється.

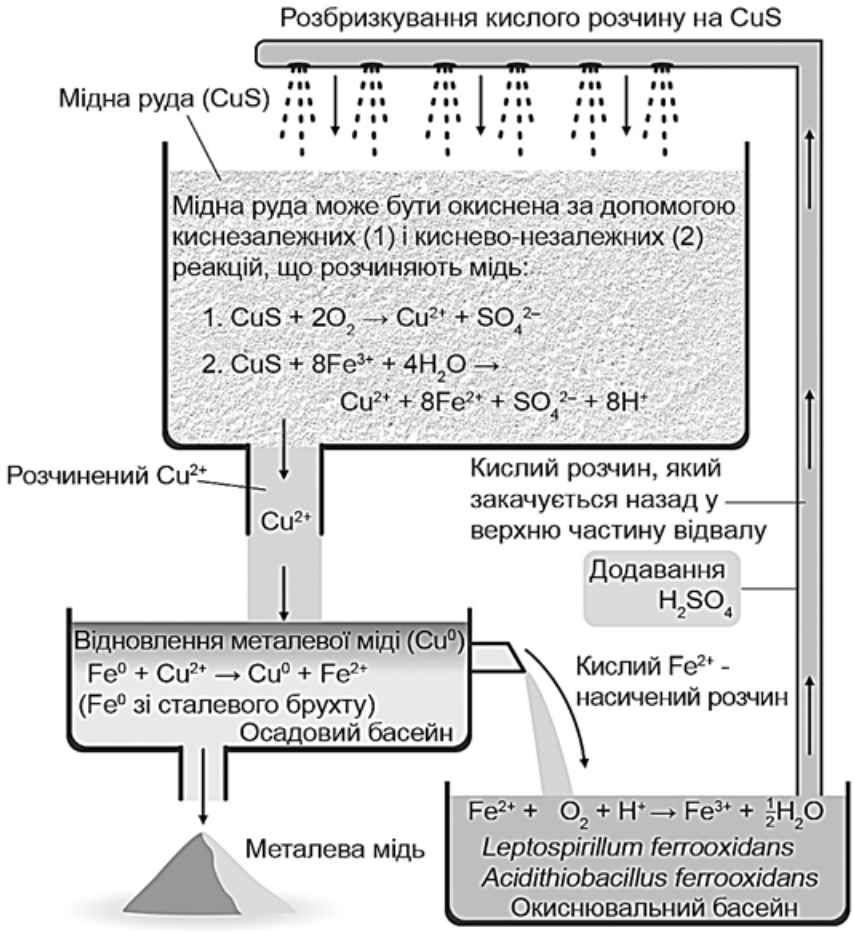


Рис. 22.14. Мікробіологічні процеси вилуговування міді з мінералів сульфіду міді

Природні штами *A. ferrooridans, A. thiooxidans* і *L. ferrooxidans* накопичуються у промислових установках спонтанно. Ці хемолітоавтотрофи пристосовані до високої кислотності середовища, тобто умов, в яких відбувається вилуговування металів, що є для них елективними.

Альтернативними природним є створені виробничі штами, адаптовані до росту на конкретному мінералі з відповідними характеристиками. Для вилуговування міді, як правило, використовують не чисті культури бактерій, а змішані природні популяції. Найчастіше з промислових установок можна виділити залізоокисні бактерії *A. ferrooridans* та *Leptospirillum ferrooxidans*.

У відвалі вилуговування підвищується температура, що призводить до зрушень складу мікробного співтовариства, яке окиснює залізо. *A. ferrooxidans* є мезофілом, і коли тепло, що утворюється під час діяльності мікроорганізмів, підвищує температуру приблизно до 30 °С в середині відвалу вилуговування, ці бактерії витісняються помірно термофільними хемолітотрофними бактеріями, що окиснюють залізо (*Leptospirillum ferrooxidans* і *Sulfobacillus*), а при ще вищих температурах (60–80 °С) у відвалах вилуговування переважають гіпертермофільні археї, такі як *Sulfolobus*.

За даними світової статистики, в установках мікробного вилуговування щорічно обробляються >30 млн т мідної руди. Сировиною служать борніт Cu_5FeS_4, ковеліт CuS, кубаніт $CuFe_2S_3$, халькопірит Cu_3AsS_4. Найчастіше використовуються бідні руди з вмістом міді < 0,4%, а також відвали, що залишаються після фізико-хімічної переробки багатих руд і містять залишки міді. Приблизно чверть усієї міді, що видобувається в усьому світі, одержують шляхом мікробного вилуговування.

Іншими прикладами процесів мікробного вилуговування є бактерії, які використовують для отримання урану (U) та золота (Au). При вилуговуванні урану *A. ferrooxidans* окиснює U^{4+} до U^{6+} за допомогою O_2 як акцептора електронів. Однак вилуговування U більшою мірою залежить від абіотичного окиснення U^{4+} тривалентним залізом (Fe^{3+}), причому *A. ferrooxidans* бере участь у процесі головним чином через повторне окиснення Fe^{2+} до Fe^{3+}, як у випадку вилуговування міді (рис. 22.14):

$$UO_2 + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow UO_2SO_4 + 2FeSO_4$$
$$(U^{4+}) \quad (Fe^{3+}) \quad (U^{6+}) \quad (Fe^{2+})$$

На відміну від UO_2, уранілсульфат (UO_2SO_4), що утворюється, добре розчинний і концентрується з застосуванням інших процесів.

Золото, зазвичай, присутнє в природі в родовищах, пов'язаних з мінералами, що містять миш'як (As) і FeS_2. *A. ferrooxidans* і споріднені бактерії можуть вивільнювати захоплене Au з арсенопіриту:

$$2FeAsS[AU] + 7O_2 + 2H_2O + H_2SO_4 \rightarrow Fe_2(SO_4)_3 + 2H_3AsO_4 + [Au]$$

Потім за традиційними методами видобутку золота Au утворює комплекс із ціанідом (CN^-). На відміну від вилуговування міді, що здійснюється у величезних відвалах, вилуговування золота здійснюється в невеликих резервуарах біореакторів (рис. 22.15), де може бути вивільнено понад 95% всього Au в руді. Крім того, потенційно токсичні залишки As і CN, що утворюються в процесі видобутку, видаляються і не забруднюють навколишнє середовище.

Рис. 22.15. Установки для біовилуговування золота в резервуарах консорціумом *Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus thiooxidans* і *Leptospirillum ferrooxidans*

Маломасштабне мікробне біореакторне вилуговування стало популярним як альтернатива екологічно шкідливим методам видобутку золота, що залишають токсичний слід As і CN^- на місці видобутку. Наразі розробляються пілотні біотехнології для вилуговування цинку, свинцю та нікелю.

22.3. Прикладна екологічна мікробіологія

22.3.1. Очищення та санітарний аналіз питної води

Воду необхідно не лише очищати перед вживанням, а й контролювати її чистоту. Є певні бактеріальні та вірусні патогени та найпростіші, які становлять особливо серйозні ризики для здоров'я. Очищення води є критично важливою ланкою в контролі передачі збудників захворювань. Зазвичай джерелом питної води слугують поверхневі води.

Процес очищення води складається з кількох кроків. Спочатку воду утримують протягом певного часу, щоб осіли більші завислі частинки.

В системі очищення до неї додають хімічні коагулянти, такі як сульфат алюмінію та вапно для процесу коагуляції або флокуляції. У відстійнику коагульовані частинки (флокули разом з мікроорганізмами) осідають і відстояну воду пропускають через піщані фільтри. При цьому піщинки діаметром приблизно 1 мм фізично затримують дрібні частинки, флокули та видаляють до 99% мікроорганізмів. Після фільтрації воду дезінфікують хлоруванням або озонуванням. Системи водопостачання повинні забезпечити 99,9% інактивації мікроорганізмів.

Стандартним підходом до моніторингу безпеки питної води є виявлення індикаторних (санітарно-показових) мікроорганізмів. Це мікроорганізми, за якими можна опосередковано судити про можливу присутність патогенів у навколишньому середовищі. При їх визначенні виходять із припущення, що чим більше об'єкт забруднений продуктами життєдіяльності людини та тварин, тим більше буде санітарно-показових мікроорганізмів і, відповідно, тим більш ймовірним є присутність патогенних мікроорганізмів.

Показниками епідемічної безпеки питної води є *загальне мікробне число* (кількість гетеротрофних бактерій в 1 мл), загальні та фекальні коліформні бактерії (використовують показники *колі-індекс* – кількість бактерій групи кишкової палички в 1 л та *колі-титр* – найменший обєм, в якому виявляється одна кишкова паличка), ентерококи, синьогнійна паличка, патогенні ентеробактерії; віруси (ентеровіруси, аденовіруси та ін.); патогенні кишкові найпростіші (ооцисти криптоспоридій, ізоспори, цисти лямблій, дизентерійні амеби та ін.), кишкові гельмінти.

Державні санітарні норми та правила «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною», що діють в Україні, встановлюють, що в питній воді не повинні бути виявлені наведені індикаторні мікроорганізми, а показник загальне мікробне число не може перевищувати 50 КУО/мл.

22.3.2. Мікробні технології очищення стічних вод

Забезпечення якісною питною водою в значній мірі залежить від менеджменту стічними водами. Міська каналізаційна система приймає побутові стічні води з великою кількістю фекальних мікроорганізмів і побутових хімічних засобів, а також промислові стічні води та вуличні стоки, що часто містять високий рівень органічних речовин, важких металів, поживних речовин та твердих частинок.

У штучних біотехнологічних очисних спорудах (рис. 22.16) значно більше можливостей застосовувати селекціоновані штами мікроорганізмів, у тому числі генетично модифіковані. Метаболічні можливості мікроорганізмів дозволяють розкладати навіть не природні, штучно створені речовини.

Рис. 22.16. Станції біологічного очищення стічних вод нафтопереробного заводу (а) та комунальних стічних вод (б)

Первинний етап очищення стічних вод здійснюється шляхом фізичного видалення більшої частини твердого матеріалу та готує стічні води до етапу вторинного очищення.

Вторинна очистка залежить від швидкості росту та біохімічної активності мікроорганізмів для перетворення розчиненої органічної речовини (РОР) на мікробну біомасу та вуглекислий газ. Це зменшує вміст РОР, що розкладається, приблизно на 90–95%. В процесі росту мікроорганізми утворюють стійкі флоки, що називають активним мулом.

Для збільшення швидкості флокуляції та кількості матеріалу, що осідає, часто додають комерційні коагулянти. В якості альтернативи для створення стабільного активного мулу додають селекціоновані або генетично модифіковані бактерії. Результатом є об'ємний осад, спричинений масовим розвитком ниткоподібних бактерій родів *Sphaerotilus* і *Thiothrix*, а також інших не ідентифікованих ниткоподібних мікроорганізмів. Наприкінці процесу воду зазвичай хлорують або обробляють озоном перед скиданням у навколишнє середовище.

Аеробна система з активним мулом (рис. 22.17 а) включає горизонтальний потік стічних вод з рециркуляцією частини шламу. Системи з активним мулом можуть бути розроблені з різними механізмами перемішування для активної аерації.

Аеробне очищення може здійснюватись за допомогою біоплівкового фільтра (рис. 22.17 б). У ньому стічні води повільно протікають через подрібнений твердий матеріал, поверхня якого вкрита сформованою мікробною біоплівкою. Мікробна спільнота біоплівки розкладає органічні відходи.

Аеробні методи обробки стічних вод, забруднених поліциклічними та ароматичними сполуками, не завжди ефективні. До того ж ароматичні сполуки знижують поверхневий натяг водних розчинів і, отже, можуть

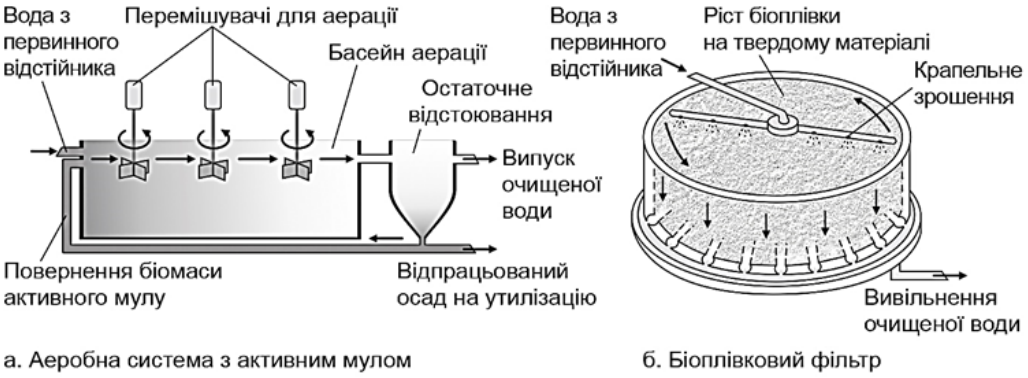


Рис. 22.17. Схеми споруд аеробного очищення стічних вод: (а) система з активним мулом; (б) біоплівковий фільтр

бути причиною неконтрольованого піноутворення в системах з активним мулом, що аеруються, а деякі леткі і токсичні ароматичні сполуки можуть викликати проблеми забруднення повітря.

Усі аеробні процеси утворюють надлишок мікробної біомаси або осаду стічних вод, який містить багато стійкої органіки, що потребує додаткової анаеробної переробки. Здатність анаеробних мікроорганізмів до розкладання стійкої органіки дає можливість здійснювати повну мінералізацію ксенобіотиків в анаеробних умовах. Такий процес проводить не індивідуальний мікроорганізм, а мікробна асоціація, що дозволяє збільшити ефективність та глибину деградації в анаеробних умовах, а також отримати корисні кінцеві продукти (н. п., біогаз). При цьому не відбувається значного накопичення біомаси мікроорганізмів.

Анаеробний спосіб ферментації відбувається у великих резервуарах (метантенках), призначених для роботи з безперервним введенням необробленого осаду та видаленням залишкового, стабілізованого осаду (рис. 22.18). Метан, як основний компонент утвореного газу, часто спалюється для виробництва тепла та електроенергії.

У анаеробному біореакторі відбуваються принаймні три основні процеси: бродіння компонентів осаду з утворенням органічних кислот, виробництво метаногенних субстратів, CO_2, і водню (рис. 22.18). Ферментація складних субстратів призводить до утворення ацетату, CO_2 і H_2, які археї перетворюють на CH_4. Ці метаногенні процеси включають критичні баланси між акцепторами і донорами електронів. Для найбільш ефективного метаногенезу концентрацію водню потрібно підтримувати на низькому рівні. Якщо водень і органічні кислоти накопичуються, падіння pH призведе до пригнічення метаногенезу.

Анаеробне зброджування органічних відходів має багато переваг. Більша частина мікробної біомаси, утвореної при аеробному рості, роз-

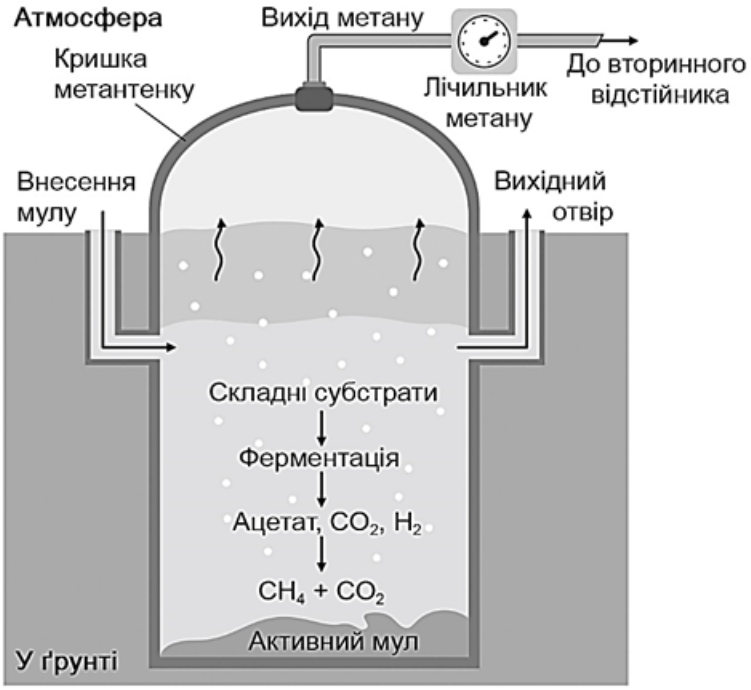


Рис. 22.18. Схема конструкції метантенка

кладається в анаеробному біореакторі. Крім того, оскільки процес метаногенезу енергетично дуже неефективний, метаногенні археї споживають приблизно вдвічі більше поживних речовин для виробництва еквівалентної біомаси, ніж аеробні системи. В результаті утворюється менше мулу, який можна легко висушити. Висушений мул, видалений з добре працюючих контрольованих анаеробних систем очищення, можна використовувати як органічне добриво в саду.

22.3.3. Біологічна деструкція, біоремедіація, біоаугментація

Деструктивну діяльність мікроорганізмів також використовують в складних природних середовищах для отримання корисних результатів. Прикладами цього є використання автохтонних мікробних спільнот для здійснення процесів біодеградації, біоремедіації та підтримки навколишнього середовища, а також додавання мікроорганізмів до ґрунту чи рослин для підвищення врожайності сільськогосподарських культур.

Процеси біодеградації. Біологічне розкладання, що здійснюють мікроорганізми, призводить до різноманітних змін в органічних молекулах (рис. 21.19 а), а саме: залишає основну її структуру незмінною; фрагментує складні органічні молекули (рис. 22.19 б) таким чином, щоб фрагменти могли бути повторно зібрані для отримання вихідної структури; або повні-

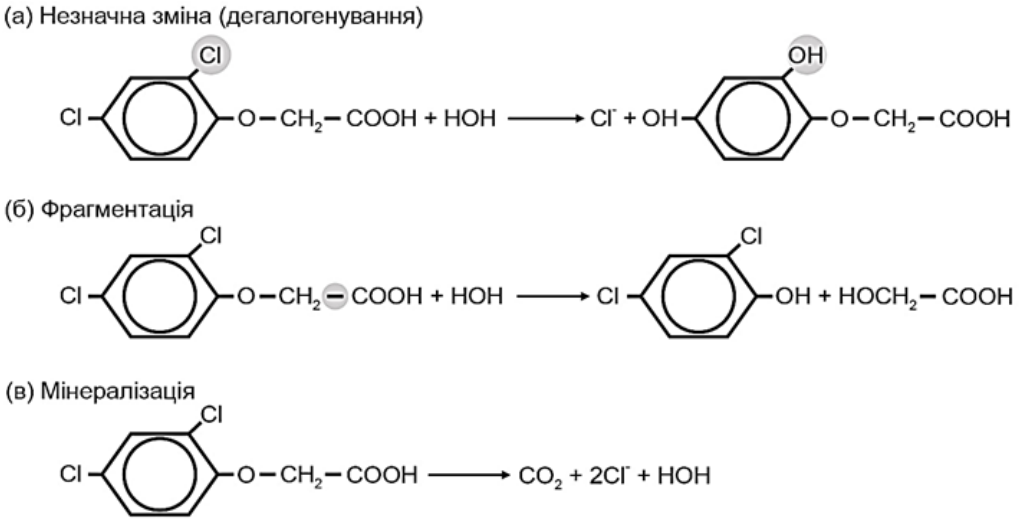


Рис. 22.19. Типи біодеградації складних органічних сполук: (а) незначна зміна функціональних груп у молекулі, н. п., заміна хлору на гідроксильну групу; (б) розщеплення органічної сполуки на органічні фрагменти; (в) повна деградація органічної сполуки

стю мінералізує (рис. 22.19 в), що перетворює органічну молекулу в неорганічну форму.

Вилучення токсичних хімічних промислових продуктів з ґрунту та водного середовища є складним, але необхідним завданням. Сполуки, такі як перхлоретилен (ПХЕ), трихлоретилен (ТХЕ) і поліхлоровані біфеніли (ПХБ) є поширеними сполуками, що забруднюють природне середовище. Ці сполуки адсорбуються на органічних речовинах у навколишньому середовищі, що робить дезактивацію за допомогою традиційних підходів складною або неефективною. Активація мікроорганізмів для трансформації цих забруднюючих речовин в нетоксичні продукти називається біоремедіацією. Щоб зрозуміти, як відбувається біоремедіація, розглянемо біохімію процесу біодеградації.

Деградація складних сполук вимагає кількох окремих стадій, що зазвичай здійснюють різні мікроорганізми. Спочатку забруднюючі речовини перетворюються на менш токсичні сполуки, що легше розкладаються. Першим кроком для багатьох токсикантів, включаючи хлорорганічні пестициди, алкільні розчинники та арилгалогеніди, є відновне дегалогенування.

Видалення галогенового замісника (н.п., хлору, брому, фтору) з одночасним додаванням електронів до молекули відбувається двома способами. При гідрогенолізі галоген заміщується атомом водню (рис. 22.20), а при дигалоелімінації видаляється два галогенні замісники з сусідніх атомів вуглецю, одночасно утворюючи додатковий зв’язок між атомами вуглецю. При

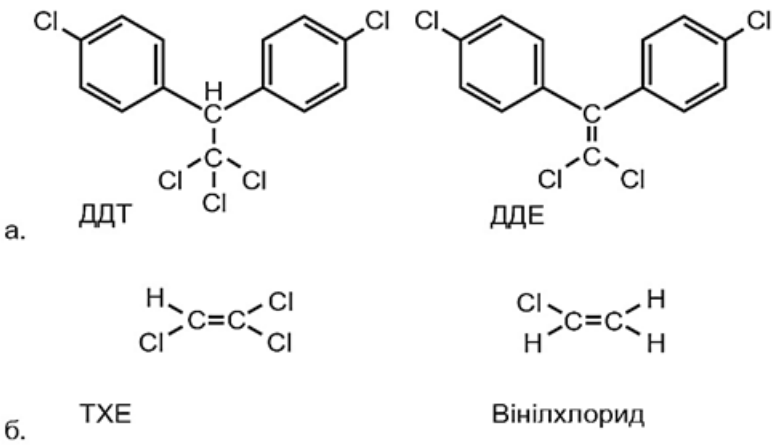


Рис. 22.20. Токсичні продукти деградації 1,1,1-трихлоро-2,2-ди(4-хлорофеніл) етану (ДДТ) і трихлоретилену (ТХЕ) до токсичних 1,1-дихлор-2,2-ди-(4-хлорфеніл)етилену (ДДЕ) і вінілхлориду, відповідно

дегалогенування ПХБ *Desulfitobacterium, Dehalospirillum* і *Desulfomonile* використовують електрони з молекули води, а для дегалогенування різних хлорованих сполук – з водню.

Відновне дегалогенування зазвичай відбувається в безкисневих умовах. Насправді гумінові кислоти (полімерні залишки розкладання лігніну, що накопичуються) можуть служити кінцевими акцепторами електронів. Використання гумінових кислот як акцепторів електронів має місце при анаеробному дехлоруванні вінілхлориду та дихлоретилену.

Після завершення етапів анаеробної дегалогенізації деградація основної структури багатьох пестицидів та інших ксенобіотиків здійснюється швидше за присутності O_2. Таким чином, розкладання галогенованих токсичних сполук, як правило, вимагає дії представників різних таксономічних груп мікроорганізмів, які формують консорціум.

Популяції, що складають мікробну спільноту, змінюються у відповідь на додавання неорганічних або органічних субстратів. Якщо конкретну сполуку, таку як гербіцид, додавати неодноразово, мікробне співтовариство ґрунту змінюється, а деградація відбувається швидше. Згодом мікробне співтовариство може стати настільки ефективним у розкладанні гербіциду, що ефективність цільового використання гербіциду зменшується.

Процеси деструкції, що відбуваються в ґрунтах, також можуть бути використані у масштабних процесах деструкції вуглеводнів або сільськогосподарських відходів, які вносяться в ґрунт для їх розкладання.

Хоча це часто дуже ефективно, проте іноді така деструкція не знижує токсичність. Прикладом цієї проблеми є мікробна трансформація 1,1,1-трихлоро-2,2-ди(4-хлорофеніл)етану (ДДТ), пестициду, який колись широко використовувався в аграрному виробництві (рис. 22.20 а).

При цьому з молекули видаляється один атом хлору з утворенням 1,1-дихлор-2,2-ди-(4-хлорфеніл)етилену (ДДЕ), який також є екологічним токсином. Іншим важливим прикладом є деструкція трихлоретилену (ТХЕ), який широко використовують. Під час розкладання в безкисневих умовах може утворюватися небезпечний канцероген вінілхлорид (рис. 22.20 б).

Біоремедіація та біоаугментація. Біоремедіація зазвичай включає стимулювання деградаційної активності мікроорганізмів, які вже присутні в забруднених водах або ґрунтах. Існуючі мікробні спільноти, зазвичай, не можуть здійснювати процеси біодеградації з бажаною високою швидкістю через обмежені фізичні або харчові фактори. Наприклад, біодеградація може бути обмежена низьким рівнем кисню, азоту, фосфору або інших поживних речовин. У цих випадках необхідно визначити обмежувальні фактори та забезпечити їх.

Часто додавання органічних речовин, що леко метаболізуються, посилює біодеградацію стійких сполук, які інакше не були б використані мікроорганізмами, процес називається кометаболізмом.

Сира нафта – це складна суміш вуглеводнів, які можуть служити джерелом вуглецю та енергії. Мікроорганізми, що розкладають нафту, є частиною мікробіому біосфери, тобто вони повсюдно поширені в ґрунтових, морських та прісноводних екосистемах, але їх небагато.

Досвід ліквідації наслідків розливів нафти в морському середовищі показує, наскільки ефективним може бути стимулювання природних мікробних спільнот (рис. 22.21 а). У складі вуглеводнів відсутні фосфор і азот, що обмежує їх деградацію. Ще одним ключовим фактором у сприянні біоремедіації є ступінь контакту між мікроорганізмами та вуглеводневим субстратом. Для збільшення доступності вуглеводнів для мікроорганізмів, часто використовуються гранули, що містять поживні та олеофільні речовини. Цей підхід прискорює деградацію плям сирої нафти на 30–40%.

Рис. 22.21. Біоремедіація берегової лінії моря при ліквідації розливу нафти з внесенням мінеральних добрив (а), біоаугментація забрудненого нафтою грунту з внесенням препарату мікроорганізмів та мінеральних добрив (б)

У процесі біоремедіації бере участь мікробна спільнота біотопу. Нафта, що є складною сумішшю вуглеводнів, розкладається мікроорганізмами різних таксономічних груп. На активність процесів біодеградації впливає наявність поживних речовин і вивільнення мікроорганізмами поверхнево-активних речовин, що сприяють диспергуванню нафти (рис. 22.22). Первинні продукти розкладання вуглеводнів бактеріями далі використовуються вторинними споживачами.

Рис. 22.22. Мікробна спільнота, задіяна в розкладанні вуглеводнів нафти. Пунктирні лінії представляють фактори, що впливають на швидкість біоремедіації, такі як лізис бактерій-деструкторів фагами та поїдання їх найпростішими

Прискорення мікробіологічних процесів шляхом додавання ізольованих активних мікроорганізмів до ґрунтів, вод чи іншого природного комплексу називається *біоаугментацією* (рис. 22.21 б). Мікроорганізми-деструктори додають у вигляді суспензії разом з поживними речовинами, ферментами, поверхнево-активними та хімічними речовинами, що виділяють кисень, безпосередньо до існуючих природних угруповань, де вони формують нові мікробні співтовариства. Це допомагає інтродукованим мікроорганізмам створювати ефективну популяцію за конкуренції з боку природного, ендогенного мікробного співтовариства.

Така інтродукція часто не дає очікуваного результату, так як для мікроорганізмів, отриманих в лабораторії, не завжди можна створити оптимальні умови прояву їх активності і, як правило, вони менш конкурентоспроможні, ніж резидентна мікробіота даного середовища.

22.3.4. Біодеградація пластику

Пластмаси є найпоширенішим органічним полімерним забруднювачем на Землі. Не дивно, що матеріали, розроблені для того, щоб витри-

мувати розкладання, накопичились в навколишньому середовищі та тепер становлять проблему утилізації планетарного масштабу.

Хімічно пластмаси є вуглецевими полімерами. Щільність та ступінь зшивання молекул визначають властивості кінцевого продукту. Зі збільшенням кількості пластику було введено новий термін – пластисфера для опису мікробного середовища на пластиковому смітті. Пластик, що піддається впливу тепла або ультрафіолетового випромінювання, має ослаблену полімерну структуру, яка може забезпечити мікробну деградацію. Наприклад, плаваючий морський пластик колонізується фотоавтотрофами та фотогетеротрофами, які утворюють поверхневі біоплівки та ініціюють деградацію. Однак швидкість розкладання набагато повільніша за швидкість, з якою пластик додається в океани.

Пластик стійкий до біодеградації, оскільки, він, як правило, гідрофобний, що перешкоджає адгезії мікроорганізмів, довгі повторювані вуглеводневі ланцюги важкодоступні для ферментів, а головне, що в середовищі є інші, більш пріоритетні джерела вуглецю.

Поліетилен (ПЕ) є прикладом проблем деградації. Структурна подібність між ПЕ та вуглеводнями вказує на потенціал ферментів деструкції вуглеводнів розкладати ПЕ. Організми, такі як *Alkalivorax spp.*, які розкладають вуглеводні в районах розливів нафти, використовують моно- та диоксигенази для додавання атомів кисню до вуглецевих полімерів. Подальше окиснення кінцевого вуглецю генерує жирні кислоти, які мікроорганізми метаболізують через шлях β-окиснення.

ПЕ являє собою суміш кристалічних та аморфних областей, тому, хоча їх хімічний склад однаковий з нафтою, структурна організація полімеру відрізняється. Аморфні області більш здатні до біорозкладання, тому деградований зразок ПЕ нагадує швейцарський сир.

Відкриття бактерії *Ideonella sakaensis* продемонструвало, що один тип пластику, поліетилентерефталат (ПЕТ), може бути повністю деполімеризований до мономерів етиленгліколю та терефталевої кислоти. *I. sakaensis*, виділений з ґрунту біля заводу з переробки пластику, виробляє екзоферменти, що каталізують ці реакції.

Наразі існують тисячі синтетичних полімерів, що використовуються для виготовлення різних видів пластику, і їхні різноманітні властивості, безсумнівно, вимагатимуть різних механізмів та методів деградації.

22.4. Мікроорганізми в аграрному виробництві

В системі грунт–мікроорганізми–рослина мікроорганізми є незамінною та невід'ємною складовою. Саме тому рослина, що забезпечена повноцінним комплексом мікроорганізмів, одержує повноцінне живлення і, як наслідок, реалізує свій потенціал щодо підвищення врожайності. Тому виникає необхідність застосовувати агроприйоми, спрямовані на збільшення

кількості агрономічно цінних мікроорганізмів, або ж штучно забезпечувати агроценози корисними бактеріями.

В останні роки досить інтенсивно застосовують біологічні препарати на основі селекціонованих мікроорганізмів, інтродукція яких у кореневу зону рослин протягом певного вегетаційного періоду забезпечує більш комфортний розвиток сільськогосподарських рослин. В Україні створено комерційні препарати на основі *Rhizobium* spp. (для бобових культур), *Klebsiella* spp. (для кукурудзи та гречки), *Paenobacillus polymyxa* та *Achromobacter album* (для цукрового буряка), азотфіксуючих, фосформобілізуючих та інших мікроорганізмів.

Відсутність у кореневій зоні рослин активної корисної специфічної мікробіоти сприяє колонізації цієї екологічної ніші нетиповими та шкодочинними мікроорганізмами. Інтродуковані корисні мікроорганізми тривалий час не допускають патогенні мікроорганізми до інфікування рослин. Передпосівна інокуляція насіння біопрепаратами сприяє затримці розвитку хвороби та позитивно позначається на врожайності культур.

Значну шкоду аграрному виробництву завдають фітопатогенні гриби (збудники фузаріозу, аскохітозу, альтернаріозу, антракнозу тощо), бактерії (збудники бактеріального раку, м'якої гнилі, «чорної ніжки»), нематоди, а також листогризучі комахи, що може призводити до 50–70% втрат урожаю. Існує низка комерційних мікробних препаратів на основі *Trichoderma harzianum*, *T. polysporum*, *T. harzianum*, *B. subtilis* та ін., рекомендованих для використання в інтегрованих системах захисту рослин.

Реальним також є використання спектра біологічних інсектицидів. На сьогодні в арсеналі мікробіологів є препарати на основі ентомопатогенних бактерій *Bacillus thuringiensis* для боротьби з колорадським жуком. Перспективними для біологічного захисту рослин від широкого спектру шкодочинних комах є також *Streptomyces avermitilis*.

22.5. Біокорозія промислових та побутових об'єктів і матеріалів

Так звані біологічні пошкодження різних об'єктів та матеріалів базуються як на ферментативній активності мікроорганізмів, так і на агресивних продуктах їхньої життєдіяльності.

Великою проблемою у нафтовидобуванні та виробництві нафтопродуктів є біокорозія трубопроводів та псування самого палива. При транспортуванні нафти трубами на їх внутрішній поверхні утворюється плівка мікроорганізмів, яка з одного боку, часто механічно заважає протоку, з іншого – пошкоджує труби через утворення сірчаної кислоти мікроорганізмами, що окиснюють сірку, яка є в нафті, та через продукцію сульфатредукувальними бактеріями сірководню, що вступає в реакцію з залізом. Водночас і вуглеводні самої нафти, і нафтопродукти можуть використовуватись багатьма мікроорганізмами (дріжджі, псевдомонади, мікобактерії та ін.), що змінюють їх хімічну структуру.

Ще один приклад біокорозії – псування творів мистецтва та пам'яток культури. Мікроорганізми хімічно змінюють фарби, особливо ті, що містять натуральні компоненти, а також кам'яні споруди за рахунок виділення кислот і лугів та утворення мікротріщин при механічному проникненні мікробних клітин, переважно гіфів грибів.

Однією з сучасних проблем є мікробне забруднення в електронній індустрії. Під час виробництва електронних пристроїв мікроорганізми можуть потрапляти на комп'ютерні чипи, зменшуючи адгезію покриттів, що знижує життя транзисторів. Звичайно, у виробництві застосовують бідистильовану, вільну від розчинених органічних речовин та мікроорганізмів воду, проте навіть така вода здатна підтримувати мікробний ріст, оскільки оліготрофні мікроорганізми можуть рости при дуже низьких рівнях поживних речовин, вимитих із пластику або адсорбованих з повітря. Навіть при використанні мембранних фільтрів для стерилізації може зберегтися мікробне забруднення через присутність мікробактерій, здатних проходити через фільтр з розміром пор 0,22 мкм.

Питання для самостійного контролю

1. Які мікроорганізми застосовують для отримання харчових продуктів?
2. Якими властивостями повинні володіти дріжджі для випікання хліба?
3. Охарактеризуйте способи оцукрювання крохмалю під час приготування пива.
4. У чому переваги використання мікроорганізмів в біотехнології?
5. Яким чином мікроорганізми можуть допомогти вирішити енергетичні проблеми?
6. Які препарати для медицини можуть бути отримані шляхом поєднання хімічних та мікробіологічних стадій виробництва?
7. Які мікрорганізми є перспективними кандидатами для промислового виробництва H_2?
8. Які мікроорганізми використовуються в сільському господарстві?
9. Опишіть мікробіологічні процеси, що відбуваються в метантеку.
10. Які чинники впливають на успіх біоремедіації?
11. Наведіть переваги та недоліки аеробних та анаеробних технологій очистки стічних вод.
12. Як здійснюється біовилуговування та які мікроорганізми беруть у цьому участь?
13. Які ще мікроорганізми крім дріжджів можуть брати участь у приготуванні вина та пива?
14. Чому для одержання оцту використовують переважно бактерії роду *Gluconobacter*?
15. Які індивідуальні хімічні речовини можуть бути одержані шляхом мікробіологічного синтезу?

ДОДАТОК

КОРОТКИЙ ОПИС ОСНОВНИХ ГРУП МІКРООРГАНІЗМІВ

У Додатку наведено склад та описання основних характеристик окремих філогенетичних груп мікроорганізмів доменів *Bacteria*, *Archaea* та *Eukarya*.

ДОМЕН *BACTERIA*

У цьому розділі представлено основні філогенетичні групи 23 філумів домену *Bacteria*, що мають культивованих представників (див. рис. 3.2).

Філум B1. ***Aqificie.*** Давня гілка бактерій, що поєднує грамнегативні, неспоротворні палички або гіфи. Термофіли з оптимумом температури 65–85 °С. Метаболізм хемолітоавтотрофний чи хемоорганотрофний. Багато представників здатні рости анаеробно за рахунок нітратредукції. Представники родів *Aqifex* та *Hydrogenobacter* – мікроаерофіли, гіпертермофіли, хемолітоавтотрофи, що використовують водень, тіосульфат і елементарну сірку як донори електронів.

Філум B2. ***Thermotoga.*** Це грамнегативні палички, що мешкають у геотермальних зонах, морських гідротермах, сольфатарах, вважаються дуже давньою гілкою. Мають зовнішні покриви, що не прилягають до клітини (тога). Пептидоглікан не містить мезодіамінопімелінової кислоти. Це суворі анаероби, гіпертермофіли (оптимальна температура росту 85 °С), хемоорганогетеротрофи. Споживають широкий спектр органічних сполук. Відновлюють тіосульфат та/або S°.

Філум B3. ***Thermodesulfobacteria.*** Грамнегативні палички, зовнішній мембранний шар яких утворює випинання, термофільні, суворі анаеробні хемоорганогетеротрофи, здатні до дисиміляційної сульфатредукції.

Філум B4. ***Deinococcus-Thermus.*** Включає один клас *Deinococci* із двох порядків. Порядок I. *Deinococcales* поєднує грампозитивні нерухомі сферичні або паличкоподібні клітини зі складною багатошаровою клітинною стінкою. Стійкі до іонізуючої радіації (витримують 3–5 млн рад, тоді як для людини летальною дозою є 100 рад). Порядок II. *Thermales* містить грамнегативні прямі палички або нитчасті бактерії, нерухливі, не утворюють спор, термофіли, хемоорганогетеротрофи з суворо дихальним метаболізмом.

Філум B5. ***Chrysiogenetes.*** Включає один клас з тією ж назвою та поєднує грамнегативні рухливі вигнуті палички, здатні до анаеробного дихання, в якому кінцевим акцептором електронів є арсенат; мезофіли; близькі до клостридій, бацил і дельтапротеобактерій.

Філум B6. ***Chloroflexi.*** Об’єднує грамнегативні нитчасті бактерії, що мають ковзний рух. Пептидоглікан містить L-орнітин як диамінокислоту.

Зовнішня мембрана, що містить ліпополісахарид, не виявлена. Один клас з тією ж назвою поділяється на два порядки. Порядок I. *Chloroflexales* включає нитчасті аноксигенні фототрофні бактерії, що утворюють бактеріохлорофіл і каротиноїди. Порядок II. *Herpetosiphonales* не має бактеріохлорофілів, а є лише каротиноїди. Метаболізм аеробний, хемогетеротрофний.

Філум B7. *Thermomicrobia*. Грамнегативні, короткі неправильні нерухомі бактерії у формі палички. Спор не утворюють. Пептидоглікан не містить диамінокислот. Гіпертермофіли (оптимальна температура росту 70–75 °C). Облігатні аероби та хемоорганогетеротрофи.

Філум B8. *Nitrospirae*. Грамнегативні вигнуті, вібріоподібні або спіральні клітини з різними типами метаболізму. Більшість представників – аеробні хемолітотрофи, включають нітрифікатори, залізобактерії та магнітобактерії.

Філум B9. *Deferribacteres*. Хемоорганогетеротрофи, що дихають анаеробно та використовують як кінцевий акцептор електронів Fe^{3+}, Mn^{4+}, S^{o}, Co^{3+} і нітрат.

Філум B10 *Cyanobacteria*. Складається з п’яти підсекцій, виділених відповідно морфології, способу поділу клітини та диференційованості організмів, що до них входять. Ключові роди: *Prochlorococcus, Crocosphaera, Synechococcus, Trichodesmium, Oscillatoria, Anabaena*. Ціанобактерії складають велику, морфологічно та екологічно неоднорідну групу оксигенних, фототрофних бактерій. Ці організми були першими фототрофними організмами, що виділяли кисень на Землі, і перетворили колись безкисневу на насичену киснем атмосферу Землі.

Клітини ціанобактерій мають розміри 0,5–100 мкм в діаметрі. Ціанобактерії можна розділити на п’ять морфологічних груп: 1. *Chroococcales* – одноклітинні, діляться шляхом подвійного поділу; 2. *Pleurocapsales* – одноклітинні, діляться шляхом багаторазового (колоніального) поділу; 3. *Oscillatoriales* – це ниткоподібні негетероцистоподібні форми; 4. *Nostocales* ниткоподібні, діляться вздовж вісі, і здатні до клітинної диференціації; 5. *Stigonematales* морфологічно подібні до *Nostocales* за винятком того, що клітини діляться в кількох площинах, утворюючи розгалужені нитки. Нарешті, прохлорофіти є лінією унікальних одноклітинних ціанобактерій, які тепер віднесені до *Chroococcales*.

Деякі з основних морфологічних класифікацій ціанобактерій відповідають філогенетичним групам, а інші ні. Види *Pleurocapsales* утворюють цілісну групу всередині ціанобактерій. Це свідчить про те, що розмноження множинним поділом виникло лише один раз в еволюційній історії *Cyanobacteria*. Так само види *Nostocales* і *Stigonematales* мають спільного предка та утворюють узгоджену філогенетичну групу, що вказує на єдине походження клітинної диференціації всередині ціанобактерій, а одноклітинні та прості нитчасті (*Chroococcales* і *Oscillatories*) розсіяні по різним

філогенетичним групам ціанобактерій і не є узгодженими еволюційними лініями.

Представники усіх видів ціанобактерій здатні фіксувати CO_2 у циклі Кальвіна, частина їх асимілює N_2. Клітини отримують енергію зі світла. Деякі ціанобактерії також можуть рости в темряві на глюкозі або сахарозі, використовуючи цукор як джерело вуглецю та енергії. За високих концентрацій сульфіду деякі ціанобактерії здатні переключатися від оксигенного до аноксигенного фотосинтезу, використовуючи сірководень, а не воду, як донор електронів, при фотосинтезі. Ціанобактерії мають спеціалізовані мембранні системи – тилакоїди, що збільшують здатність клітин збирати світлову енергію. Клітинна стінка ціанобактерій містить пептидоглікан і структурно подібна до інших грамнегативних бактерій.

Ціанобактерії мають кілька механізмів рухливості. Багато ціанобактерій виявляють ковзаючу рухливість. Везикули газу регулюють плавучість клітин таким чином, щоб вони могли мати достатню інтенсивність світла для фотосинтезу. Багато нитчастих ціанобактерій *Nostocales* і *Stigonematales* утворюють спеціалізовані клітини – гетероцисти, в яких здійснюють фіксацію N_2.

Ціанобактерії займають центральне значення для продуктивності океанів. Малі одноклітинні ціанобактерії, такі як *Synechococcus* і *Prochlorococcus*, є найбільш поширеними фототрофами в океанах. Разом ці організми забезпечують 80% морського фотосинтезу і 35% всього фотосинтезу на Землі. Азотфіксація ціанобактерій є домінантним джерелом надходження азоту у морські екосистеми.

Філум B11. *Chlorobi*. Складається з одного класу *Chlorobia*, що містить п’ять родів. Це грамнегативні різні за морфологією, суворі анаероби, облігатні фототрофи. Клітини ростуть переважно за рахунок фотоасиміляції простих органічних сполук. Деякі види можуть використовувати сірководень або тіосульфат як донор електронів для фіксації CO_2. У присутності сульфіду та світла відкладають глобули сірки на зовнішній стороні клітини. Бактерії більшості родів здатні рости як хемоорганогетеротрофи в мікроаеробних чи аеробних умовах.

Філум B12 *Proteobacteria* є найбільшим за складом видів та містить найбільш метаболічно різноманітні бактерії. До цієї групи входить більше третини описаних видів культивованих бактерій, більшість з яких має практичне значення. Протеобактерії – це грамнегативні бактерії, які демонструють широку розноманітність джерел та механізмів отримання енергії (хемолітотрофний, хемоорганотрофний і фототрофний). Вони включають анаеробні, мікроаерофільні, факультативно аеробні види та демонструють широкий спектр клітинних форм. На основі порівняння послідовностей генів 16S рРНК філум *Proteobacteria* поділено на шість класів: *Alpha-, Beta- , Gamma-, Delta-*, *Epsilon-* та *Zetaproteobacteria*.

Незважаючи на філогенетичну широту *Proteobacteria*, види в різних класах мають схожі метаболізми. Наприклад, фототрофія та метилотрофія зустрічаються в трьох різних класах протеобактерій, а нітрифікуючі бактерії входять до чотирьох класів цього філуму. Це є свідченням того, що у формуванні метаболічної різноманітності протеобактерій важливу роль відігравало горизонтальне перенесення генів.

Клас *Alphaproteobacteria* містить приблизно тисячу описаних видів та є другим за розміром класом філуму *Proteobacteria*. Більшість видів – облігатні або факультативні аероби. Багато з них є оліготрофними, краще ростуть в середовищах з низькою концентрацією поживних речовин. Клас *Alphaproteobacteria* включає шість порядків: *Rhodospirilales* та *Rhodobacterales* обєднують фототрофні пурпурові несірчані бактерії; *Rickettsiales* містить облігатні внутрішньоклітинні паразити, збудники хвороб людини; *Sphingomonadales* поєднує ковзні бактерії – роди *Cytophaga*, що розкладають целюлозу або хітин, та *Sporocytophaga, Flexibacter, Microscilla, Lysobacter; Caulobacterales,* містить брунькувальні та простекобактерії (рід *Caulobacter*), а найбільший та метаболічно різноманітний порядок *Rhizobiales* – фототрофи (н. п., *Rhodopseudomonas*), хемолітотрофи (н. п., *Nitrobacter*), симбіонти (н. п., *Rhizobium*), вільноживучі азотфіксуючі бактерії (н. п., *Beijerinckia*), деякі патогени рослин і тварин, різноманітні хемоорганотрофи.

Порядок *Rhizobiales* отримав свою назву від ризобій, які утворюють кореневі бульбочки та фіксують азот у симбіотичній асоціації з бобовими рослинами. У цьому порядку є дев'ять родів, що містять ризобії: *Bradyrhizobium, Ochrobactrum, Azorhizobium, Devosia, Methylobacterium, Mesorhizobium, Phyllobacterium, Sinorhizobium* і *Rhizobium*. Зазвичай, це хемоорганотрофи та облігатні аероби. Гени, що відповідають за здатність утворювати кореневі бульбочки, розподілені між цими родами шляхом горизонтального переносу генів. Кожен рід ризобій має окремий спектр рослин, які вони колонізують.

Порядок *Rickettsiales* (ключові роди *Rickettsia* і *Wolbachia*) містить облігатні внутрішньоклітинні паразити або мутуалісти тварин. Представників цього порядку культивують на курячих ембріонах або в культурі клітин хазяїна. Як правило, *Rickettsiales* тісно пов'язані з членистоногими. Рикетсії та ерліхії, що викликають такі захворювання, передаються через укуси, в той час як представники *Wolbachia* є облігатними паразитами або мутуалістами комах та інших членистоногих.

Бактерії роду *Rickettsia* є збудниками кількох захворювань людини – висипний тиф (*Rickettsia prowazekii*) і плямисту лихоманку Скелястих гір (*Rickettsia rickettsii*). Ці організми тісно пов'язані з переносниками та можуть передаватись кліщами, блохами, вошами та кліщами. Більшість рикетсій метаболічно спеціалізовані, здатні окиснювати лише амінокислоти

глутамат або глутамін і не здатні використовувати глюкозу або органічні кислоти. Рикетсії не здатні синтезувати певні метаболіти, тому отримують їх із клітин хазяїна. Рикетсії не виживають довго поза хазяїном, це пояснює, чому вони повинні передаватися переносниками від тварини до тварини.

Рід *Wolbachia* містить багато внутрішньоклітинних паразитів комах. Ці бактерії можуть призводити до партеногенезу (розвиток незапліднених яєць), загибелі самців і фемінізації (перетворення самців комах на самок). *Wolbachia pipientis* є найкраще вивченим видом роду. Бактерії *W. pipientis* колонізують яйце комахи, де вони розмножуються у вакуолях клітин хазяїна. *W. pipientis* передаються від інфікованої самки до потомства через інфекцію яйця. Партеногенез, викликаний *Wolbachia,* зустрічається у деяких видів ос. У цих комах самці зазвичай розвиваються з незапліднених яєць та містять лише один набір хромосом, тоді як самки – із запліднених яєць і містять два набори хромосом.

Клас *Betaproteobacteria* включає шість порядків (*Burkholderiales, Hydrogenophilales, Metylophilales, Neisseriales, Nitrosomonadales, Rhodocyclales*) і містить мікроорганізми з різною фізіологією (хемоорганогетеротрофи, метилотрофи, нітрифікатори першої фази, фототрофні пурпурові несіркові бактерії, збудники тяжких захворювань людини).

Порядок *Neisseriales* містить принаймні 29 родів хемоорганотрофів, з яких найкраще охарактеризовані види роду *Neisseria*. Види нейсерій виділяють від тварин, деякі з них є патогенними. Нейсерії – це переважно сапрофіти, які мешкають у ротовій порожнині та інших ділянках на тілі тварин. *Neisseria meningitidis* можуть викликати потенційно смертельне запалення головного мозку (менінгіт). *Neisseria gonorrhoeae* – збудник гонореї, що передається статевим шляхом. До цього класу також відносяться сапрофітні грамнегативні бактерії, які мешкають у забрудненій воді та активному мулі аеротенків.

Клас *Gammaproteobacteria* включає дуже різноманітних представників тринадцяти порядків. Гамапротеобактерії є найбільшим і самим різноманітним класом протеобактерій, що містить майже половину (1500) всіх описаних видів у філумі. Метаболічно й екологічно різноманітні та включають багато добре відомих патогенів людини. Різні бактерії цього класу можуть бути фототрофами, хемоорганотрофами або хемолітотрофами та мати дихальний або бродильний метаболізм.

Enterobacteriales або кишкові бактерії складають відносно однорідну філогенетичну групу *Gammaproteobacteria*, що включає факультативно аеробні, грамнегативні, неспороутворюючі, нерухливі або рухливі завдяки перитрихальним джгутикам палички. Кишкові бактерії оксидазонегативні і каталазопозитивні. Оксидазний тест визначає наявність цитохром-с-оксидази, що присутня у бактерій, які дихають. Фермент каталаза розкладає перекис водню та зустрічається у бактерій, здатних рости в присутності

кисню. Вони відновлюють нітрати тільки до нітритів та зброджують цукри до різноманітних кінцевих продуктів.

Серед кишкових бактерій багато видів, патогенних для людини, тварин та рослин. *Escherichia coli* – найбільш відомий серед усіх організмів як модельний класичний мікроорганізм для наукових досліджень. Через медичне значення кишкових бактерій їх добре охарактеризовано. Оскільки кишкові бактерії генетично тісно пов'язані, їх ідентифікація часто викликає значні труднощі. Види роду *Escherichia* є майже універсальними мешканцями кишкового тракту людини та інших теплокровних тварин, хоча вони аж ніяк не є домінуючими в цьому середовищі.

Ешерихії відіграють важливу роль у кишковому тракті, синтезуючи вітаміни, зокрема вітамін К. Як факультативний аероб, цей організм, ймовірно, також споживає O_2, створюючи в товстій кишці анаеробні умови. Деякі штами ешерихій – патогени, що викликають діарейні захворювання, особливо у немовлят. Ешерихії є основною причиною інфекцій сечовивідних шляхів у жінок. Деякі штами, такі як ентерогеморагічна *E. coli* O157:H7, через утворення дуже сильного ентеротоксину можуть спричинити спорадичний спалах важкої хвороби, що загрожує життю.

Представники роду *Salmonella* досить тісно пов'язані з ешерихіями. Проте, на відміну від них сальмонели майже завжди патогенні як для людини, так і для інших теплокровних тварин. У людини сальмонели найчастіше викликають захворювання на черевний тиф і гастроентерит.

Шигели (рід *Shigella*) також генетично дуже тісно пов'язані з *Escherichia*. Геномний аналіз переконливо свідчить про те, що *Shigella* та *Escherichia* обмінялись значною кількістю генів шляхом горизонтального перенесення. Шигели є типовими патогенами для людини, викликають досить важкий гастроентерит – бактеріальну дизентерію. *Shigella dysenteriae* є наглядним прикладом передачі збудника з їжею та водою. Ці бактерії містять ендотоксин, проникають в епітеліальні клітини кишківника та виділяють нейротоксин, що викликає гострий шлунково-кишковий дистрес.

Рід *Proteus* зазвичай містить високорухливі клітини, які виробляють фермент уреазу. На відміну від сальмонел та шигел, протеї показують лише віддалену спорідненість з ешерихіями. Протеї є частою причиною інфекцій сечовивідних шляхів у людини. Колонії, що на чашках з агаром демонструють характерні ознаки роїння, називають швармом.

Порядок *Pseudomonadales* об'єднує виключно хемоорганотрофи, які мають дихальний тип метаболізму. Представники можуть рости як аероби і, як правило, оксидазо- та каталазопозитивні, але деякі також здатні до анаеробного дихання з нітратом як акцептором електронів. Більшість видів використовують широкий спектр органічних сполук як джерело вуглецю та енергії. Ці організми всюдисущі в ґрунті та водних системах, а багато видів викликають захворювання рослин і тварин.

Типом порядку є рід *Pseudomonas*. Бактерії кількох видів цього роду є патогенами. *Pseudomonas aeruginosa* – збудник інфекцій сечовивідних і дихальних шляхів у людини, може спричиняти системні інфекції в осіб, які зазнали значних пошкоджень шкіри. Синьогнійна паличка природно стійка до багатьох широко використовуваних антибіотиків, що забезпечують гени, локалізовані в плазмідах резистентності (R-плазміди). Ці гени кодують білки, що забезпечують детоксикацію різних антибіотиків або викачують їх із клітини. *Pseudomonas syringae* є добре відомим збудником хвороб рослин.

Бактерії порядку *Vibrionales* включають факультативно аеробні прямі та вигнуті палички, які використовують ферментативний метаболізм. Однією з ключових відмінностей між групою вібріонів і кишковими бактеріями є те, що вібріони є оксидазопозитивними, тоді як кишкові бактерії оксидазонегативні. Хоча представники видів *Pseudomonas* також є оксидазопозитивними, вони не бродять і тому чітко відрізняються від видів *Vibrio*. Найбільш відомими родами цієї групи є *Vibrio*, *Aliivibrio* та *Photobacterium*, деякі з них здатні до біолюмінесценції.

Більшість вібріонів і споріднених бактерій є водними, їх можна знайти в морському, солонуватому або прісноводному середовищі. Холерний вібріон *Vibrio cholerae* є збудником холери, яка є однією з найпоширеніших інфекційних хвороб людини в країнах, що розвиваються. Збудник передається майже виключно через воду. *Vibrio parahaemolyticus* мешкає в морському середовищі та є основною причиною гастроентериту в Японії завдяки споживанню сирих морепродуктів.

Клас *Deltaproteobacteria* складається із семи порядків. Перші чотири порядки включають сульфідогенні бактерії. Сюди відносяться сульфат- і сіркоредукувальні бактерії *Desulfovibrio, Desulfomicrobium, Desulfohalobium* (екстремальні галофіли), *Desulfuromonas* та *Desulfurella* (термофіли). Порядок *Bdellovibrionales* складається з водних хижаків грамнегативних бактерій, дуже дрібних рухливих вібріонів родів *Bdellovibrio* та *Vampirovibrio*.

Порядок *Myxococcales* містить грамнегативні бактерії з ковзним рухом і складним життєвим циклом з утворенням плодових тіл. Це аеробні органотрофи, що володіють потужними гідролазами та здатні розкладати природні полімери. Утворюють плодові тіла та координовано рухаються по поверхні щільного середовища. Міксобактерії мешкають у ґрунті, компостах, гною, хоча деяких виділяють з водного середовища. Представники родів *Myxococcus, Archangium, Cystobacter, Poliangium, Nannocystis* є «мікрохижаками», які скоординовано полюють на інших бактерій.

Клас *Epsilonproteobacteria* об'єднує представників родин *Helicobacteraceae* і *Campilobacteraceae*. Це грамнегативні, рухливі, прямі, вигнуті та спіральні палички, мікроаерофіли, що живуть у шлунково-кишковому тракті людини та інших ссавців. Серед них є збудники септицимії, діареї, ентеритів, гастритів та виразок. Кампілобактери є паразитами

мікроводоростей. Види *Campylobacter* є грамнегативними, оксидазо- та каталазопозитивними, рухливими спірилами. Більшість з них викликають гострий гастроентерит, що зазвичай призводить до кривавого проносу. Патогенез обумовлений токсином, спорідненим з холерним.

Helicobacter pylori заселяє різні відділи шлунку та дванадцятипалої кишки та провокує розвиток захворювань гастродуоденальної зони: гастриту, дуоденіту, виразки шлунка та дванадцятипалої кишки. Є великі групи в цьому класі, які відомі лише з послідовностей генів 16S рРНК, отриманих з навколишнього середовища. Види епсилонпротеобактерій виявляють повсюдно в морських і наземних середовищах, особливо в глибоководних місцях існування гідротермальних джерел, багатих сульфідами та киснем, а також на поверхні тварин, які живуть поблизу гідротермальних джерел.

Філум B13 *Firmicutes*. Переважно грампозитивні бактерії з низьким вмістом Г+Ц в ДНК. Включає три класи: *Clostridia* (з порядками *Clostridiales, Thermoanaerobiales, Haloanaerobiales), Bacilli* (з порядками *Bacillales* та *Lactobacillales*) та *Mollicutes* (бактерії без клітинної стінки).

Цей філум поєднує фенотипово дуже різнорідні мікроорганізми. Серед них термофільні та гіпертермофільні бактерії; анаеробні; аноксигенні фототрофні бактерії; ковзні нефототрофні бактерії, що не утворюють плодові тіла; аеробні хемолітотрофні бактерії; бактерії, здатні до дисиміляційної сульфат- або сульфітредукції; симбіонти або паразити хребетних та безхребетних; анаеробні грамнегативні коки; мікоплазми –плейоморфні клітини без клітинної стінки, можуть пересуватися ковзанням, мають складні харчові потреби, деякі потребують стеролів; термоактиноміцети – грампозитивні організми, що формують субстратний та повітряний міцелій.

Порядок *Lactobacillales* (основні роди *Lactobacillus, Streptococcus*) включає молочнокислі бактерії, ферментативні організми, які утворюють молочну кислоту, як продукт метаболізму. Ці організми широко використовуються в виробництві та збереженні продуктів харчування. Молочнокислі бактерії – це неспороносні, оксидазо- та каталазонегативні, аеротолерантні, анаеробні палички або коки, які генерують енергію в процесах бродіння, виробляють при цьому молочну кислоту, а самі не можуть синтезувати певні амінокислоти, вітаміни, нуклеотиди.

Завдяки різним шляхам метаболізму цукрів одні виробляють лише молочну кислоту і називається гомоферментативними, а інші, крім молочної кислоти, виробляють етанол і CO_2) і називаються гетероферментативними. Більшість молочнокислих бактерій отримують енергію лише за рахунок метаболізму цукрів і тому обмежуються середовищами існування, в яких присутні цукри. Молочнокислі бактерії використовують для приготування різноманітних кисломолочних продуктів та квашених овочів.

Роди *Lactococcus* і *Streptococcus* містять гомоферментативні види молочнокислих бактерій кокоїдної форми з досить різними середовищами існування, які мають важливе практичне значення для людини. Деякі види є патогенними для людини і тварин. Представники роду *Streptococcus* відіграють важливу роль у виробництві пахти, силосу та інших ферментованих продуктів, а певні види відіграють провідну роль у формуванні карієсу зубів.

Рід *Enterococcus* включає гомоферментативні стрептококи переважно фекального походження, які можуть бути патогенними для людини. Стрептококи розділені на дві групи споріднених видів: підгрупа *pyogenes* з характерним видом *Streptococcus pyogenes*, який є причиною стрептококкової ангіни, та підгрупа *viridans,* що представлена видом *Streptococcus mutans*, основним збудником карієсу зубів. Стрептококи також діляться на імунологічні групи, що базуються на наявності специфічних вуглеводних антигенів. Гетероферментативні лактококи належать до роду *Leuconostoc*. Ці бактерії виробляють смакові інгредієнти диацетил і ацетоїн при катаболізмі цитрату та використовуються як закваски при ферментації молока.

Неспороутворюючі бактерії порядків Bacillales і Clostridiales – це фірмікути, що утворюють ендоспори, згруповані в порядках *Bacillales* і *Clostridiales,* хоча багато видів цих порядків (*Listeria, Staphylococcus, Sarcina*) не здатні до утворення ендоспор.

Порядок *Bacillales* зазвичай містить аеробні та факультативно аеробні хемоорганотрофи. Представники цієї групи широко розповсюджені, особливо в ґрунтах. Наприклад, бактерії роду *Listeria* широко зустрічаються в ґрунтах. Вони є умовно-патогенними мікроорганізмами та поширеною причиною харчових захворювань. Лістерії – грампозитивні, каталазопозитивні, паличкоподібні, факультативно аеробні хемоорганотрофи. Хоча відомо кілька видів *Listeria*, вид *Listeria monocytogenes* заслуговує найбільшої уваги, оскільки ці бактерії спричиняють хворобу харчового походження – лістеріоз. Мікроорганізм передається через інфіковані, як правило, готові до вживання продукти, такі як сири та ковбаси, та може викликати як легкі захворювання, так і смертельну форму менінгіту.

Бактерії роду *Staphylococcus* – факультативні аероби, які здатні дихати та бродити. Їх клітини зазвичай об’єднані в групи, виробляють кислоту з глюкози як аеробно, так і анаеробно. Бактерії видів *Staphylococcus* каталазопозитивні, що дозволяє відрізнити їх від представників роду *Streptococcus* і деяких інших родів молочнокислих бактерій. Стафілококи відносно стійкі і досить добре витримують висихання та високий вміст NaCl. Вони переважно виділяються зі шкіри, ґрунту або кімнатного пилу. Стафілококи є поширеними коменсалами та паразитами людей і тварин, іноді вони викликають серйозні інфекційні захворювання.

Існує два основних види – *Staphylococcus epidermidis*, непігментований, непатогенний мікроорганізм, що мешкає на шкірі або слизових обо-

лонках, а також жовтопігментований *Staphylococcus aureus*, який часто пов'язаний з патологічними станами: фурункули, прищі, пневмонія, остеомієліт, менінгіт, артрит. Деякі штами *S. aureus* високопатогенні та стійкі одразу до кількох антибіотиків (так звані штами MRSA – абревіатура від *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*).

Рід *Sarcina* включає облігатні анаероби, які є каталазонегативними в межах порядку *Clostridiales*. Характерною морфологічною особливістю цих бактерій є те, що при поділі вони утворюють пакети з восьми або більше клітин. Сарцини надзвичайно кислотостійкі, здатні ферментувати цукор і рости в середовищі з pH до 2. Клітини виду *Sarcina ventriculi* мають навколо клітинної стінки товстий волокнистий шар целюлози, що функціонує як цементуючий матеріал, і утримує разом клітини в пакеті. Сарцини можна виділити з ґрунту, мулу, фекалій і вмісту шлунка. Завдяки своїй надзвичайній кислотостійкості *S. ventriculi* може мешкати та рости в шлунку людей, які страждають на певні шлунково-кишкові розлади та виразки пілоричного відділу.

Основними представниками спороутворюючих бактерій порядків *Bacillales* і *Clostridiales* є роди *Bacillus, Clostridium, Sporosarcina*. Усі ендоспороутворюючі бактерії є грампозитивними видами. Вважається, що здатність до утворення ендоспор з'явилась лише один раз у спільного предка *Bacillales, Clostridiales* і *Lactobacillales,* однак багатьма представниками *Bacillales* і *Clostridiales* і всіма представниками порядку *Lactobacillales* була втрачена в ході еволюції.

Два роди, про які найбільше відомо, це *Bacillus*, які є аеробами або факультативними аеробами, і *Clostridium*, які є облігатними анаеробами. Усі бактерії, що утворюють ендоспори зустрічаються переважно в ґрунті. Навіть ті види, які патогенні для людини або тварин, є переважно сапрофітними ґрунтовими організмами і заражають тварин лише випадково.

Бактерії родів *Bacillus* і *Paenibacillus* виробляють позаклітинні гідролітичні ферменти, що розщеплюють білки, полісахариди, нуклеїнові кислоти та ліпіди. Це дозволяє їм використовувати ці продукти як джерела вуглецю та електронів. Багато бактерій продукують антибіотики – бацитрацин, поліміксин, тироцидин, граміцидин, циркулін.

Деякі з них (*Paenibacillus popilliae* і *Bacillus thuringiensis*) виробляють токсичні інсектицидні білки. *P. popilliae* викликає смертельну молочну хворобу у личинок японського жука та жуків родини *Scarabaeidae*. *B. thuringiensis* викликає смертельні захворювання комах різних груп. Обидва ці збудники комах під час споруляції утворюють кристалічний білок, що називається параспоральним тільцем, яке формується в клітині. У *B. thuringiensis* параспоральне тільце є протоксином, що перетворюється в токсин у кишечнику комахи. Токсин зв'язується зі специфічними рецепторами в епітеліальних клітинах кишки та індукує утворення пор, що викликає лізис клітини.

Препарати з ендоспор *B. thuringiensis* і *P. popilliae* використовують як біологічні інсектициди. Гени *cry* кристалічного білка *B. thuringiensis* були введені в генетично модифіковані рослини (кукурудзу, сою, бавовник), що зробило їх стійкими до комах-шкідників.

У бактерій роду *Clostridia* відсутній дихальний ланцюг, тому на відміну від видів *Bacillus*, вони отримують АТФ шляхом бродіння. У клостридій відомо багато анаеробних механізмів утворення енергії, на яких ґрунтується поділ роду *Clostridium* на підгрупи. Ряд клостридій ферментують цукор, утворюючи масляну кислоту як основний кінцевий продукт. Деякі з них виробляють ацетон і бутанол, наприклад *Clostridium pasteurianum*, який також є енергійним азотфіксатором.

Одна група клостридій включає види *C. thermocellum, C. cellulolyticum* і *C. cellulovorans*, що утилізують целюлозу з утворенням кислот і спиртів. Ймовірно, ці види є основними організмами, які розкладають целюлозу в безкисневих середовищах, таких як рубець і осадові відкладення. Целюлозолітичні клостридії мають целюлосому, складну багатоферментну структуру, розташовану на зовнішній поверхні клітинної стінки. Целюлосома містить фермент целюлазу, що гідролізує нерозчинну целюлозу на розчинні продукти, які транспортуються в клітину та метаболізуються.

Клостридії іншої групи зброджують окремі амінокислоти з утворенням ацетату, бутирату, CO_2 і H_2. Деякі види ферментують лише пари амінокислот у так званій реакції Стікленда. При цьому одна амінокислота функціонує як донор електронів і окиснюється, тоді як інша – як акцептор електронів і відновлюється.

Багато продуктів амінокислотного бродіння клостридій мають смердючий запах: масляна кислота, ізомасляна кислота, ізовалеріанова кислота, капронова кислота, сірководень, метилмеркаптан, кадаверин, путресцин, аміак. Основним середовищем існування клостридій є ґрунт, де вони живуть в основному в безкисневих «кишенях».

Ряд клостридій населяє безкисневе середовище кишкового тракту ссавців. Деякі здатні спричиняти важкі захворювання у людей, наприклад, ботулізм викликає *Clostridium botulinum*, правець – *Clostridium tetan*і, газову гангрену – *Clostridium perfringens*. Патогенні клостридії не є незвичайними з позицій метаболізму, але відрізняються від інших тим, що виробляють специфічні токсини. *C. perfringens* і споріднені види можуть також викликати гастроентерит у людей і домашніх тварин.

Клас *Mollicutes* – це бактерії, які не мають клітинних стінок (mollis латиною означає «м'який») і є одними з найменших відомих організмів. Цю групу часто називають мікоплазмами тому, що *Mycoplasma* – відомий та найкраще охарактеризований рід цього класу. Мікоплазми не забарвлюються за Грамом, оскільки не мають клітинної стінки. За класифікацією з використанням морфологічних, фізіологічних та біохімічних ознак мікоп-

лазми віднесли до філуму *Tenericutes*, проте за послідовністю нуклеотидів 16S рРНК вони філогенетично є фірмікутами.

Мікоплазми живуть в організмах тварин і рослин, що не потребує клітинної стінки. Ці організми також мають дуже малі геноми (розміром від 0,6 до 2,2 млн п. н), що притаманно для облігатних симбіонтів.

Мікоплазми нагадують протопласти – бактерії з видаленими клітинними стінками. Здатність протистояти осмотичному лізису частково визначається наявністю стеринів, що роблять цитоплазматичну мембрану мікоплазм більш міцною. Деякі мікоплазми вимагають стеролів в середовищі культивування. Окрім стеринів окремі мікоплазми містять сполуки ліпоглікани, що також зміцнюють мембрану клітини.

Клітини мікоплазм демонструють різну морфологію: кокоїдні клітини різного розміру, ниткоподібні форми, часто сильно розгалужені. Коккоподібні елементи розміром 0,2–0,3 мкм є одними з найменших вільноживучих клітин. На агарі колонії мають характерний вигляд «смаженого яйця» з щільним центральним ядром. Через відсутність клітинної стінки ріст мікоплазм не пригнічується антибіотиками, що діють на синтез клітинної стінки.

Середовища для культивування деяких мікоплазм зазвичай досить складні та включають дріжджовий екстракт, пептон, свіжу сироватку, асцитичну рідину. Більшість мікоплазм потребують вітамінів, амінокислот, пуринів і піримідинів як факторів росту. Деякі види є суворими аеробами, тоді як інші – факультативними аеробами або облігатними анаеробами.

Рід *Spiroplasma* складається з молікутів спіральної або спіралеподібної форми клітини. Хоча вони не мають клітинної стінки та джгутиків, але рухливі за допомогою гвинтового або хвильового руху завдяки внутрішньоклітинним фібрилам. Спіроплазми виділено з кліщів, рідини судинних рослин і комах, які харчуються цими рідинами. Наприклад, *Spiroplasma citri* виділена з листя цитрусових рослин, у яких викликає хворобу, що називається стійка хвороба цитрусових. Деякі види *Spiroplasma* викликають захворювання комах, такі як спіроплазмоз медоносних бджіл і летаргію жука *Melolontha*.

Філум B14 *Actinobacteria.* Іншою великою групою грампозитивних бактерій є *Actinobacteria*, які утворюють окремий філум в домені *Bacteria*. Актинобактерії – це паличкоподібні та нитчасті, переважно аеробні бактерії, які є звичайними мешканцями ґрунту та рослинних матеріалів. У більшості вони є нешкідливими коменсалами, за виключенням мікобактерій наприклад, *Mycobacterium tuberculosis*. Мають важливе економічне значення у виробництві антибіотиків та кисломолочних продуктів. Відомо дев'ять порядків філуму *Actinobacteria,* переважна більшість видів яких належить до порядку *Actinomycetales*. Далі більш детально охарактеризовано найбільш важливі представники цього філуму: коринеформні бактерії, пропіоновокислі бактерії, мікобактерії та нитчасті актинобактерії.

Коринеформні бактерії. Коринеформні бактерії грампозитивні, аеробні, малорухливі, паличкоподібні, неправильної форми, булавоподібні клітини з V-подібним розташуванням клітин. Основними родами коринеформних бактерій є *Corynebacterium* і *Arthrobacter*. Рід *Corynebacterium* складається з надзвичайно різноманітної групи бактерій, включаючи патогени тварин і рослини та сапрофіти. Деякі види є патогенними, наприклад *Corynebacterium diphtheriae* – збудник дифтерії. Рід *Arthrobacter*, що складається в основному з грунтових організмів, відрізняється від *Corynebacterium* за циклом розвитку. Деякі коринеформні бактерії утворюють коккоподібні клітини. Бактерії видів *Arthrobacter* є одними з найпоширеніших серед усіх ґрунтових бактерій, стійкі до висихання та голодування, здатні розкладати гербіциди, кофеїн, нікотин, феноли та інші складні органічні сполуки.

Пропіоновокислі бактерії. Пропіоновокислі бактерії (рід *Propionibacterium*) – грампозитивні анаероби, зброджують молочну кислоту, що сама є продуктом бродіння молочнокислих бактерій, вуглеводи, багатоатомні спирти, утворюють переважно пропіонову кислоту, що частково відповідає за унікальний смак сиру, оцтову кислоту та CO_2. Пропіоновокислі бактерії виділяють багато CO_2, завдяки чому утворюють очі (або пустоти), характерні для швейцарського сиру.

Рід *Mycobacterium*. Мікобактерії поширені в ґрунтах і більшість з них нешкідливі. Рід *Mycobacterium* містить також кілька відомих патогенів людини, головний серед них *Mycobacterium tuberculosis* – збудник туберкульозу. Це паличкоподібні бактерії, які володіють характерною властивістю кислотостійкості при забарвленні, що обумовлено наявністю унікальних ліпідів – міколових кислот у клітинній стінці. Міколові кислоти являють собою групу складних гідроксильованих ліпідів з розгалуженим ланцюгом, ковалентно зв'язаних з пептидогліканом, що надає поверхні клітини воскоподібну гідрофобну консистенцію.

Через воскову поверхню мікобактерії погано забарвлюються за Грамом. Вони певною мірою плеоморфні і можуть навіть утворювати псевдоміцелій. Мікобактерії ділять на дві великі групи: види, бактерії яких повільно ростуть (н. п., *M. tuberculosis, M. bovis*) і види бактерій, що ростуть швидко (н. п., *M. smegmatis*). При рості на щільних середовищах мікобактерії утворюють компактні, часто зморшкуваті колонії. Здебільшого мікобактерії мають відносно прості харчові потреби. Ріст *M. tuberculosis* стимулюється ліпідами та жирними кислотами. Деякі мікобактерії виробляють жовті каротиноїдні пігменти, що використовується для їх ідентифікації.

Streptomyces і споріднені бактерії. Ключові роди: *Streptomyces, Actinomyces, Nocardia.* Актиноміцети являють собою велику групу філогенетично споріднених, нитчастих, аеробних, грампозитивних бактерій. Багато актиноміцетів мають характерний цикл розвитку, що завершується

утворенням спор, стійких до висихання. Ріст гіфів призводить до утворення міцелію, аналогічному тому, що утворюють нитчасті гриби. Коли поживні речовини виснажуються, надземні гіфи міцелію диференціюються в спори, які легко розсіюються повітрям.

Streptomyces – самий важливий рід цієї групи. Відомо понад 500 видів цього роду. Їх гіфи мають діаметр 0,5–1,0 мкм і невизначену довжину, часто не мають поперечних стінок. У вегетативній фазі стрептоміцети складаються зі щільно сплетених гіф, що призводить до утворення компактної міцеліальної колонії. У міру старіння колонії повітряні гіфи утворюють так звані спорофори, що виступають над поверхнею колонії та дають початок конідіям (спорам), які за будовою принципово відрізняються від ендоспор *Bacillus* і *Clostridium*. Вони формуються шляхом утворення поперечних стінок з подальшим перетворенням клітин в конідії. Відмінності у формі та розташуванні надземних гіфів і конідієносців є одними з основних ознак, що використовуються в класифікації видів стрептоміцетів. Конідії та спорофори часто пігментовані та створюють вигляд покритої пилом колонії.

Стрептоміцети – переважно ґрунтові організми, хоча деякі живуть у воді. Вони надають характерний землистий запах ґрунту завдяки виробленню ряду складних метаболітів – геосмінів. Стрептоміцети, зазвичай, продукують позаклітинні гідролітичні ферменти, що дозволяють їм використовувати полісахариди, білки та жири, а деякі штами можуть використовувати вуглеводні, лігнін, танін та інші полімери.

Найбільш вражаючою фізіологічною властивістю стрептоміцетів є вироблення ними широкого спектру антибіотиків. Близько 50% усіх ізольованих стрептоміцетів продукують антибіотики. Деякі штами виробляють кілька хімічно різних антибіотиків. Хоча організм-продуцент стійкий до власних антибіотиків, зазвичай, він залишається чутливим до антибіотиків, що виробляються іншими стрептоміцетами. Для кодування ферментів для синтезу антибіотиків потрібно багато генів, сформованих у кластери, через що геноми *Streptomyces*, як правило, досить великі (більше 8 млн п. н.).

В медицині та ветеринарії використовують більше 60 антибіотиків із стрептоміцетів. Продукція антибіотиків пов’язана з утворенням спор, яке запускається виснаженням поживних речовин, і може бути механізмом пригнічення росту інших організмів, що конкурують із клітинами стрептоміцетів за дефіцитні поживні речовини.

Філум B15. *Planctomicetes*. Включає один клас з тією ж назвою з одним порядком *Planctomycetales*, що містить одну родину *Planctomycetaceae* і чотири роди. Представники родів *Pirellula* та *Gemmata* мають мембрану навколо нуклеоїда.

Філум B16 *Chlamydiae* *с*кладається з одного класу *Chlamydia*, що включає один порядок *Chlamydiales*. Це нерухливі облігатні паразити, кокоїди, що розмножуються всередині вакуолей, пов’язані з мембранами у

цитоплазмі клітин еукаріотів. У них відсутній ряд ферментів та кофакторів катаболічних та анаболічних шляхів, АТФ транспортують з клітин хазяїна, мають дуже невеликий геном. Деякі є збудниками хвороб людини (пневмонія, трахома, хламідіози). За морфологією це зазвичай дуже маленькі коки, приблизно 0,5 мкм в діаметрі, що демонструють характерний цикл розвитку. Як і багато облігатних паразитів і симбіонтів, геноми *Chlamydiae* мають малі розміри від 0,55 до 1,0 млн п. н.

Усі види *Chlamydiae* демонструють унікальний життєвий цикл, в якому можна побачити два типи клітин: перший – невелика щільна клітина, що називається елементарним тільцем, яка відносно стійка до висихання та є засобом розсіювання; другий – більш-менш щільна клітина, що називається сітчастим тілом, яка ділиться шляхом бінарного поділу та є вегетативною формою.

Елементарні тільця – це клітини, що не розмножуються, спеціалізовані на передачі інфекції, а сітчасті тільця є неінфекційними формами, які функціонують лише для розмноження в клітинах-хазяїнах. Після ряду поділів ці вегетативні клітини перетворюються на елементарні тіла, що вивільняються, коли клітина-хазяїн розпадається, і можуть інфікувати інші сусідні клітини. Час генерації для вегетативних клітин становить 2–3 год. На відміну від рикетсій, хламідії передаються не членистоногими, а переважно повітряно-крапельним шляхом через дихальну систему.

Хламідії особливо добре пристосовані до інвазії та колонізації еукаріотичних клітин. Різні види можуть інфікувати різноманітне коло еукаріотичних хазяїв. Вид *Parachlamydia acanthamoebae* заражає вільноживучих амеб, особливо амеб роду *Acanthamoeba*. Більшість бактерій видів *Chlamydiae* можуть розмножуватися або виживати серед вільноживучих амеб і таким чином служити джерелом інфекції.

Найкраще вивчені патогени людини Ch*lamydophila psittaci* – збудник захворювання пситакозу; *Chlamydia trachomatis* – збудник трахоми та ряду інших захворювань людини; *Chlamydophila pneumoniae* – збудник деяких респіраторних захворювань. Пситакоз – це епідемічне захворювання птахів, яке іноді передається людині та викликає пневмонію. Трахома, виснажлива хвороба ока, що характеризується васкуляризацією та рубцюванням рогівки, є розповсюдженою причиною сліпоти у людей. Інші штами *C. trachomatis,* що інфікують сечостатевий тракт, передаються статевим шляхом. Хламідії є одними з найбільш біохімічно обмежених з усіх відомих бактерій. Деякі гени у *C. trachomatis* є чітко еукаріотичними, що свідчить про горизонтальне перенесення їх від хазяїна до бактерії.

Філум B17 *Spirochaetes*. Ключові роди філуму: *Spirochaeta, Treponema, Cristispira, Leptospira, Borrelia.* Спірохети – це грамнегативні, рухливі, за формою звивисті, як правило, тонкі та гнучкі бактерії. Спірохети поширені у відкладеннях водойм і в тваринах. Деякі спричиняють захво-

рювання, зокрема, важливе захворювання людини сифіліс, що передається статевим шляхом. Спірохети поділяють на вісім родів переважно за ознакою патогенності, філогенезу, середовища проживання, морфологічними та фізіологічними характеристиками.

Спірохети мають незвичайний спосіб рухливості завдяки ендоджгутикам, що нагадують звичайні джгутики, але знаходяться в периплазмі клітини. Ендоджгутики закріплені на обох полюсах і простягаються вздовж клітини. Обидва ендоджгутики та протоплазматичний циліндр оточені гнучкою мембраною. Ендоджгутики обертаються, як і типові бактеріальні джгутики. Коли обидва ендоджгутики обертаються в одному напрямку, клітина крутиться в протилежному напрямку. Клітина обертається подібно штопора, що дозволяє їй проникати крізь в'язкий матеріал чи середовище.

Рід *Spirochaeta* включає вільноживучі, анаеробні та факультативно аеробні бактерії. Ці організми, яких відомо кілька видів, поширені в прісній і морській воді та осадах. *Spirochaeta plicatilis* – велика спірохета, що зустрічається в сульфідних прісноводних і морських середовищах. *Spirochaeta stenostrepta* є облігатним анаеробом, який знайдено у багатому сірководнем чорному мулі. *Cristispira* – унікальні спірохети, що зустрічаються в природі лише в деяких молюсках.

Рід *Treponema* – анаеробні або мікроаерофільні спірохети, асоційовані з хазяїном, коменсали або збудники хвороб людей і тварин. *T. pallidum*, збудник сифілісу, є самим відомим видом трепонем. За морфологією ця бактерія відрізняється від інших спірохет тим, що її клітина не спіральна, а плоска та хвиляста, розміром 0,2 мкм у поперечнику.

Інші види трепонем також часто зустрічаються як коменсали у людей та інших тварин. Наприклад, *Treponema denticola* мешкає в ротовій порожнині людини та пов'язана з нею при захворюваннях ясен. *Treponema saccharophilum* – велика пектинолітична спірохета, знайдена в рубці корів, *Treponema primitia* – в задній кишці деяких термітів.

Більшість видів *Borrelia* є патогенами тварин або людини. *Borrelia burgdorferi* є збудником кліщової хвороби Лайма. *B. burgdorferi* – одна із небагатьох відомих бактерій, яка має лінійну хромосому. Інші види *Borrelia* мають переважно ветеринарне значення, як збудники захворювання великої рогатої худоби, овець, коней і птахів. У більшості випадків бактерії передаються тварині-хазяїну через укус кліща.

Роди *Leptospira* та *Leptonema* містять суто аеробні спірохети, які окиснюють довголанцюгові жирні кислоти як єдині донори електронів і джерела вуглецю. Лептоспіри тонкі, дрібно скручені і зазвичай загнуті на кожному кінці в напівкруглий гачок. Лептоспіроз – один із найбільш значимих зоонозів у всьому світі. Його збудником є *L. interrogans*. Природними хазяїнами більшості лептоспір є гризуни, собаки та свині. У людей самим поширеним захворюванням є лептоспіроз, при якому мікроорганізм лока-

лізується в нирках і може спричинити ниркову недостатність або навіть смерть. Зазвичай, лептоспіри проникають в організм через слизові оболонки або через шкіру при контакті з інфікованою твариною та локалізується в нирках і печінці, викликаючи нефрит і жовтяницю.

Філум B18. *Fibrobacteres*. Філум складається всього з одного роду *Fibrobacter*. Це грамнегативні паличкоподібні або плейоморфні бактерії, що не утворюють спори, облігатні анаероби, пов'язані з травним трактом ссавців. Фібробактерії філогенетично близькі до спірохет і хламідій.

Філум B19. *Acidobacteria*. Включає один клас *Acidobacteria*, один порядок *Acidobacteriaceae*, що містить одну родину *Acidobacteriaceae* з трьох родів (*Acidobacterium*, *Sporohalobacter, Geothrix*). Це грамнегативні безспорові палички, мезофіли, хемоорганогетеротрофи. Одна група містить аеробні ацидотолерантні мікроорганізми, друга – анаеробні організми, які отримують енергію за рахунок анаеробного дихання або бродіння.

Філум B20 *Bacteroidetes* поділений на чотири порядки: *Bacteroidales, Cytophagales, Flavobacteriales* і *Sphingobacteriales*. Бактероїди (не плутати з бактеріями роду *Rhizobium*, які в бульбочках бобових рослин утворюють форми клітин, названі бактероїдами) – грамнегативні палички, не утворюють спори, як правило, сахаролітичні, облігатні аероби, факультативні аероби та облігатні анаероби. Філум включає представників, що рухаються шляхом ковзання, деякі рухаються за допомогою джгутиків, а деякі – нерухливі.

Порядок *Bacteroidales* в основному містить облігатно анаеробні ферментуючі види. Типовий рід – *Bacteroides*. Бактероїди зазвичай є коменсалами, мешкають в шлунково-кишковому тракті людини та тварин, де їх нараховують близько 10^{11} бактерій на грам вологих фекалій. *Bacteroides thetaiotaomicron* є одним із відомих видів *Bacteroides* в товстому кишечнику.

Різноманітність і кількість генів вуглеводного обміну, знайдених у його геномі набагато перевищує ті, що зустрічаються в будь-яких інших видів бактерій. Таким чином, вони значно збільшують різноманітність рослинних полімерів, що розкладаються в травному тракті людини. Види *Bacteroides* незвичайні тим, що вони одні з небагатьох бактерій синтезують особливий тип ліпідів – сфінголіпіди, які поширені в тканинах ссавців, але рідко зустрічаються в інших бактерій.

Порядок *Cytophagales* включає майже виключно облігатні аероби. Клітини зазвичай являють собою довгі тонкі грамнегативні палички, часто з загостреними кінцями, рухаються ковзанням. Цитофаги широко поширені в ґрунтах і прісних водоймах. Спеціалізуються на розкладанні екзоферментами складних полісахаридів до розчинних сахаридів та дисахаридів, що легко засвоюються. У *Cytophaga hutchinsonii* ферменти целюлази розташовані на зовнішній поверхні клітинної стінки, тому бактеріям потрібен фізичний контакт з волокнами целюлози.

Рід *Cytophaga* містить види, здатні розкладати не тільки целюлозу, а також агар і хітин. Споріднений рід *Sporocytophaga* подібний до *Cytophaga* за морфологією та фізіологією, але ці бактерії утворюють сферичні структури, що називаються мікроцистами. *Cytophaga columnaris* є збудником хвороб риб і може викликати серйозні проблеми при вирощуванні риби.

Flavobacteriales містять аеробні та факультативно аеробні хемоорганотрофи, грамнегативні палички, рухливі шляхом ковзання. Флавобактерії особливо поширені в прісноводних і морських водних середовищах, а також у харчових продуктах. Більшість видів є облігатними аеробами, хоча деякі здатні до анаеробного дихання, використовуючи нітрати як акцептори електронів. Флавобактерії часто утворюють жовті пігменти та рідко є патогенними для риб. Деякі *Flavobacteriales* є психрофілами або психротолерантними, тому мешкають в полярних водах і морському льоду.

Sphingobacteriales фенотипово подібні до багатьох *Flavobacteriales*. Бактерії видів *Sphingobacteriales* здатні розщеплювати більшу кількість складних полісахаридів, ніж *Flavobacteriales*. Рід *Flexibacter* – типовий для порядку *Sphingobacteriales*. Клітини деяких видів *Flexibacter* рухаються шляхом ковзання, ниткоподібні або короткі нерухомі палички. Багато флексибактерій пігментовані за рахунок каротиноїдів, локалізованих в клітинній мембрані, або подібних пігментів названих флексирубінами. Флексібактерії не є патогенами, поширені в ґрунті та прісних водах.

Філум B21. *Fusobacteria*. Філум включає один клас з тією ж назвою, один порядок *Fusobacteriales* та одну родину *Fusobacteriaceae*. Поєднує анаеробні грамнегативні палички з хемоорганогетеротрофним метаболізмом. Мешкають у рубці жуйних, шлунково-кишковому тракті та ротовій порожнині людини та тварин. Серед них є патогенні представники.

Філум B22. *Verrucomicrobia*. Містить два роди *Verrucomicrobium* та *Prostecobacter*, об'єднані в одну родину *Verrucomicrobiaceae*, один порядок *Verrucomicrobiales* і один клас *Verrucomicrobiae*. Це грамнегативні бактерії, що містять диамінопімелінову кислоту в пептидоглікані. Бактерії деяких видів здатні формувати простеки або фімбрії. Облігатні чи факультативні аероби, хемоорганогетеротрофи, мезофіли.

Філум B23. *Dictioglomi*. Філум включає лише один рід *Dictioglomus*. Це грамнегативні екстремально термофільні палички, не утворюють спори. Облігатні анаероби, хемоорганогетеротрофи з бродильним типом метаболізму. Кілька сотень клітин можуть збиратися у сферичні агрегати, покриті спільною оболонкою.

ДОМЕН *ARCHAEA*

До домену *Archaea* відносять прокаріотичні мікроорганізми розділені на 5 філумів: *Nanoarchaeota, Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Korarchaeota, Crenarcheota* (див. рис. 3.3).

Філум *Crenarcheota*. *Crenarchaeota* серед культивованих представників домену *Archaea* є найбільш термофільними археями з оптимальними температурами дещо вищими температури кипіння води. Багато гіпертермофілів хемолітотрофні автотрофи, які є єдиними первинними продуцентами в цих середовищах існування. Філум *Crenarchaeota* містить велику та фізіологічно різноманітну групу гіпертермофільних бактерій, які метаболізують сірку. Морфологічно – це різнорідна група, що включає палички, коки, нитчасті форми, дископодібні клітини, грамнегативні, деякі рухливі, облігатні термофіли з температурою росту в інтервалі 70–113 °С, ацидофіли, аеробні, факультативні або суворо анаеробні хемолітоавтотрофи або хемоорганогетеротрофи. Більшість бактерій використовують в метаболізмі молекулярну сірку. Хемогетеротрофи можуть рости за рахунок сірчаного дихання. Філум включає один клас *Termoprotei*.

Філум *Euryarchaeota* включає фізіологічно та метаболічно різноманітні археї; містить більшість культивованих видів; метаногени, галофіли, термофіли та гіпертермофіли. Метаногени є самими суворими з анаеробів, в той час як екстремальні галофіли переважно облігатні аероби. Філум поділено на сім класів. *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanopyri* (метаногенні археї) включають суворі анаероби, що утворюють метан. Екстремально галофільні археї об'єднані в клас *Halobacteria*, а позбавлені клітинної стінки – в клас *Thermoplasmata*.

Сульфатредукувальні археї, об'єднані в клас *Archaeoglobi,* є суворими анаеробами, здатними до дисиміляційної сульфатредукції. Клас *Thermococci* містить суворо анаеробні облігатні термофіли з оптимумом росту при температурі 67–103 °С, гетеротрофи, деякі використовують елементарну сірку. До *Euryarchaeota* відносять гіпертермофільні роди *Thermococcus* і *Pyrococcus*, гіпертермофільний метаноген *Methanopyrus* і термоплазму без клітинної стінки, яка фенотипово подібна до мікоплазм.

Філум *Thaumarchaeota* – група нітрифікуючих архей, яка є самою поширеною в природі. Представники *Thaumarchaeota* – хемолітотрофи, аеробно окиснюють аміак (NH_3) до нітриту (NO_2^-). Вони фіксують CO_2 як і більшість нітрифікуючих бактерій. Але при цьому фіксують його шляхом 3-гідроксипропіонатного/4-гідроксибутиратного циклу, що ще більше виділяє архей нітрифікаторів від нітрифікуючих бактерій, які використовують для цього цикл Кальвіна.

До відкриття *Thaumarchaeota* вважали, що лише певні види бактерій окиснюють аміак, однак на відміну від аміакоокиснюючих бактерій, архея *Nitrosopumilus maritimus* пристосована до життя в екстремальних умовах обмеження поживних речовин у відкритих водах океану. Мембрани всіх *Thaumarchaeota* містять унікальний ліпід кренархеол. Температури росту *Thaumarchaeota* дуже різноманітні, деякі види процвітають у полярних морях в той час як інші мешкають у середовищах гарячих джерел при температурі близько 75 °С.

Філум *Nanoarchaeota* представлений одним незвичайним видом *Nanoarchaeum equitans*, що є одним із найменших відомих клітинних організмів і має найменший геном серед видів *Archaea* (0,49 млн п. н.). Коккоподібні клітини *N. equitans* близько 0,4 мкм в діаметрі, мають лише близько 1% об'єму клітини кишкової палички. Вони ростуть і розмножуються прикріпленими до свого хазяїна *Ignicoccus hospitalis* – гіпертермофільного виду філуму *Crenarchaeota*, що робить його єдиним відомим архейним симбіонтом. На одній клітині *Ignicoccus* розміщується до 10 клітин *N. equitans* (видовий епітет equitans означає «їздити верхи»). Наноархеї *N. equitans* та їх хазяїн *Ignicoccus* були вперше виділені з підводного гідротермального джерела. *N. equitans* росте при температурах від 70 до 98 °С.

Філум *Korarchaeota* створений для представників, які виявлені лише за нуклеотидною послідовністю 16S рРНК і до цього часу не вдалось культивувати.

ДОМЕН *EUKARYA*

На філогенетичному дереві філуми домену *Eukarya* об'єднані в групи споріднених філумів: *Archaeplastida*, *Stramenopiles*, *Alveolata, Rhizaria*, *Excavates*, *Amoebozoa* та *Opisthokonta* (див. рис. 3.4), що не є офіційними таксонами. Мікроорганізми входять до складу всіх основних еволюційних ліній домену *Eukarya*.

Супергрупа Ризарії (*Rhizaria*)

Супергрупа протистів об'єднує хлорарахніофіти, радіолярії та форамініфери. Вони відрізняються від інших протистів своїми ниткоподібними цитоплазматичними виростами (псевдоподіями), за допомогою яких вони рухаються та живляться. Деякі *Rhizaria* мають амебоїдну морфологію, тому колись були помилково класифіковані як амеби через їхні псевдоподії. Тепер відомо, що багато філогенетично різноманітних організмів використовують псевдоподії для пересування та харчування.

Хлорарахніофіти. Це прісноводні та морські амебоподібні фототрофи, які мають джгутик для пересування. Придбання ними хлоропластів зелених водоростей є яскравим прикладом вторинного ендосимбіозу та показує, що цей процес сформував кілька філогенетично різних ліній еукаріотичних мікроорганізмів.

Хлоропласти, зазвичай, мають дві мембрани, що походять із внутрішньої та зовнішньої мембран ціанобактерій, які мають клітинну стінку грамнегативних клітин, а хлоропласти в хлорарахніофітів мають чотири мембрани. Крім того, вони мають нуклеоморфи, заховані між двома групами мембран хлоропластів. Нуклеоморфи – це залишкові ядра, що залишилися після ендосимбіонтів водоростей, які утворилися під час вторинного ендосимбіозу. Як нуклеоморфи, так і додаткові мембрани були отримані з водоростевих ендосимбіонтів.

Свідченням ендосимбіозу є те, що хлорарахніофіти об'єднали принаймні п'ять різних геномів: геном хазяїна, мітохондріальний геном хазяїна, геном водоростевого ендосимбіонта (який став нуклеоморфом), геном мітохондрій ендосимбіонта водоростей та геном хлоропласта ендосимбіонта водорості. Більшість несуттєвих або дубльованих генів в процесі еволюції були видалені, а багато генів з мітохондрій і хлоропластів – перенесені в геном хазяїна. У результаті більшість генів хлорарахніофітів присутні в ядрі клітини хазяїна. Сам нуклеоморф значно зменшений у розмірі відносно свого предка і з часом може бути повністю втрачений з хлоропласта.

Форамініфери. На відміну від хлорарахніофітів, форамініфери – виключно морські мікроорганізми. Вони утворюють раковинні структури – черепашки, що мають специфічні характеристики та часто досить декоративні. Черепашки утворені з органічних матеріалів, укріплених карбонатом кальцію. Вони прикріплені до клітини так, що амебоподібна клітина може частково висуватися під час годування. Форамініфери живляться в першу чергу бактеріями, іншими протистами, а також рештками відмерлих організмів.

Клітини форамініфер також можуть ендосимбіотично приймати різноманітні водорості, які забезпечують їх органічним вуглецем, ймовірно, в обмін на отримані неорганічні поживні речовини від розпаду відмерлих організмів. Фототрофи зустрічаються в основному в планктонних форамініферах, які залишаються завислими у воді, щоб забезпечити своїх ендосимбіонтів достатньою кількістю сонячного світла. Черепашки форамініфер відносно стійкі до розкладання та легко кам'яніють. Їх з успіхом використовують палеонтологи та геологи для біостратиграфії донних відкладень.

Радіолярії – хемоорганотрофні та переважно планктонні еукаріоти, які живуть у верхніх шарах морської води, і споживають бактерії та тверді органічні речовини. Представники деяких видів знаходяться в симбіозі з водоростями, які постачають поживні речовини для радіолярій. Назва «радіолярія» походить від радіальної симетрії їх тіл – прозорих або напівпрозорих мінеральних скелетів з кремнезему. Поряд з накопиченням ліпідних крапель і великих цитоплазматичних вакуолей, голчасті псевдоподії радіолярій, ймовірно, допомагають утримувати організм в завислому стані в товщі води океану. Коли клітини зрештою гинуть, їх скелети осідають на дно та можуть з часом перетворитися на товсті шари кремнеземного матеріалу.

Супергрупа Страменопіли (*Stramenopiles*)

Страменопіли включають як хемоорганотрофні, так і фототрофні мікроорганізми, а також макроорганізми. Члени цієї група несуть джгутики з багатьма короткими, схожими на волоски розширеннями. Ця морфологічна ознака надає групі відповідну назву (від лат. *stramen* – «солома» і *pilus* –

«волосина»). Основними представниками групи *Stramenopiles* є діатомові водорості, ооміцети, золотисті та бурі водорості.

Діатомові водорості включають понад 200 родів одноклітинних, фототрофних еукаріотів, які є основними компонентами мікробного фітопланктону в морських і прісних водоймах. Для діатомових водоростей характерний екзоскелет, утворений із кремнезему, до якого додано білок і полісахарид. Екзоскелети, що захищають клітину від хижаків, у різних видів мають різні форми та можуть бути дуже декоративними.

Ця зовнішня структура, що називається фрустулою, часто залишається після смерті клітини. Діатомові фрустули зазвичай демонструють морфологічну перисту та радіальну симетрії. Вони стійкі до розкладання, оскільки складаються переважно з кремнезему. Фрустули можуть залишатися неушкодженими протягом мільйонів років в донних відкладеннях. Діатомові водорості вперше з'явилися на Земля відносно недавно, близько 200 мільйонів років тому.

Ооміцети або водяні цвілі були раніше віднесені до грибів на основі їх нитчастого росту та наявності ценоцитних (багатоядерних) гіфів, характерних для грибів. Однак філогенетично ооміцети далекі від грибів і тісно пов'язані з іншими страменопілами. Клітинні стінки ооміцетів зазвичай складаються з целюлози на відміну від хітинових клітинних стінок грибів. Водяні цвілі мають джгутикові клітини, яких немає у переважної більшості грибів. Тим не менш, ооміцети екологічно подібні до грибів, оскільки вони ростуть у вигляді маси гіфів та розкладають мертвий рослинний і тваринний матеріал. Ооміцети є збудниками хвороб рослин, наприклад, ооміцет *Phytophthora infestans* викликає фітофтороз картоплі, *Pythium* – поширений збудник розсади в теплицях, *Albugo* викликає «білу іржу» на рослинах деяких сільськогосподарських культур.

Супергрупа Альвеоляти (*Alveolata)*

Альвеоляти характерні своїми альвеолами, цитоплазматичними мішками, розташованими безпосередньо під цитоплазматичною мембраною. Функція альвеол достеменно невідома. Відомо три філогенетично різних, хоча й споріднених види альвеолят – інфузорії, які використовують вії для рухливості; динофлагеляти, що рухаються за допомогою джгутиків; і апікомплексани – паразити людини та тварин.

Інфузорії (*Ciliata*) мають війки – структури, що забезпечують рухливість та можуть покривати всю клітину або утворювати пучки чи ряди, залежно від виду. Самими відомими та найбільш поширеними є інфузорії, що належать до роду *Paramecium*. Як і багато інших інфузорій *Paramecium* використовують війки як для рухливості, так і для добування їжі шляхом поглинання твердих частинок, таких як бактеріальні клітини, через воронкоподібну ротову борозенку. Війки, що вистилають ротову порожнину канавки, направляють поживні частки по канавці до стравоходу. Потрапляю-

чи в стравохід, поживний матеріал замикається у вакуолі шляхом фагоцитозу, де травні ферменти його розкладають.

Серед протистів інфузорії унікальні тим, що мають два типи ядер, мікроядро та макроядро. Гени в макронуклеусі регулюють основні функції клітини, такі як ріст і живлення, тоді як мікроядра беруть участь у статевому розмноженні, що відбувається шляхом часткового злиття двох клітин *Paramecium* і обміну мікроядрами. Геном парамеції налічує близько 40 000 генів, що майже вдвічі більше, ніж у людини.

Багато видів парамецій, як і інших протистів, є хазяїнами для ендосимбіотичних бактерій, архей або еукаріотів (зелені водорості), які забезпечують вітамінами або іншими факторами росту клітину-хазяїна. Деякі анаеробні війчасті протисти також містять ендосимбіонти. Наприклад, війчасті протисти в задній кишці термітів містять ендосимбіотичні метаногенні археї. Самі інфузорії також можуть бути симбіонтами.

Деякі інфузорії є паразитами тварин, хоча такий спосіб життя у них менше поширений, ніж у деяких інших груп протистів. Наприклад, інфузорії *Balantidium coli* переважно є кишковими паразитами домашніх тварин, але іноді інфікують кишковий тракт людини, викликаючи симптоми, схожі на дизентерію.

Динофлагеляти – це різноманітна група рухливих морських і прісноводних організмів, які набули здатності до фотосинтезу через вторинний ендосимбіоз. Еукаріотичні джгутики передають клітині обертові рухи, що дає назву динофлагелятам (*dinos* грецькою – «крутитися»). Динофлагеляти мають два джгутики різної довжини та по різному вставлені в клітину. Поперечний джгутик прикріплюється збоку, тоді як поздовжній джгутик бере початок від латеральної борозни клітини та тягнеться вздовж клітини.

Деякі динофлагеляти живуть вільно, тоді як інші живуть у симбіозі з коралами, що утворюють коралові рифи. Динофлагеляти отримують захищене середовище проживання в обмін на постачання коралам фотосинтезованих органічних сполук. Ряд вільноживучих видів здатні до біолюмінесценції, яка призводить до «ігристого» ефекту світіння, яке часто можна спостерігати в прибережній зоні моря.

Декілька видів динофлагелят токсичні та можуть спричиняти шкоду своїм «цвітінням». Наприклад, щільні суспензії клітин *Gonyaulax* називають «червоними припливами», що часто супроводжуються загибеллю риби та нейротоксичним отруєнням людей після вживання мідій, які накопичують клітини *Gonyaulax*.

Апікомплексани (*Apicomplexans*) є нефототрофними облігатними паразитами, які викликають важкі захворювання людини, такі як малярія (*Plasmodium*), токсоплазмоз (*Toxoplasma)* і кокцидіоз (*Eimeria*). Для цих організмів характерна відсутність рухливості в зрілій стадії та осмотрофне поглинання поживних речовини як у бактерій. Апікомплексани утворюють

структури, що називаються спорозоїтами, які функціонують для передачі паразита до нового хазяїна. На одній вершині спорозоїту розташований комплекс з органел, що забезпечують проникнення в клітину хазяїна.

Апікомплексани також містять апікопласти – вироджені хлоропласти, у яких відсутні пігменти та фотосинтетична здатність, але є декілька власних генів. Ймовірно апікопласти утворені з клітин червоних водоростей, поглинених апікомплексами за вторинного ендосимбіозу. З часом, цей хлоропласт дегенерував та перестав відігравати фототрофну роль у клітині апікомплексану.

Хазяїнами апікомплексанів можуть бути як хребетні, так і безхребетні. У деяких випадках відбувається чергування хазяїнів. Важливими апікомплексами є кокцидії, які є паразитами птахів і види *Plasmodium* – малярійні паразити.

Супергрупа Екскавати (*Excavates*)

Екскавати – це різноманітна група протистів, що включає як хемоорганотрофи, так і фототрофи, деякі види є анаеробами. Група Екскавати включає віддалено споріднених організмів з суперечливим філогенезом. Дипломонади та парабазаліди – джгутикові протисти, у яких відсутні мітохондрії та хлоропласти, живуть у безкисневих середовищах існування, таких як кишечник тварин, симбіотично, або як паразити, і отримують енергію шляхом бродіння. Обидві групи мають відносно недавнього спільного предка. Деякі дипломонади викликають серйозні та поширені хвороби риб, свійських тварин і людини.

Дипломонади мають два ядра однакового розміру та мітосоми – зменшені мітохондрії, позбавлені білків-транспортерів електронів і ферментів циклу трикарбонових кислот. Дипломонади лямблії *Giardia* мають відносно малий для еукаріот геном, що містить мало інтронів і не має генів для багатьох метаболічних шляхів. Ці характеристики, ймовірно, пояснюють паразитичний та анаеробний спосіб життя організму. *Giardia intestinalis*, також відома як *Giardia lamblia*, викликає лямбліоз, одну з найбільш поширених діарейних хвороб.

Парабазаліди – це анаеробні еукаріоти, у яких функцію мітохондрій виконують гідрогеносоми. Це органели, що еволюціонували з мітохондрій, виробляють АТФ шляхом бродіння, а продуктами є H_2 і ацетат. Парабазаліди живуть у кишковому та статевому трактах хребетних і безхребетних як паразити або коменсали.

Trichomonas vaginalis рухаються за допомогою пучка джгутиків і викликають широко поширене захворювання, що передається статевим шляхом. Геноми парабазалід унікальні серед еукаріот тим, що у більшості з них відсутні інтрони (некодуючі послідовності), характерні для геномів еукаріотів. Геном *T. vaginalis* напрочуд великий для паразитичного організму (близько 160 млн п. н.), і включає гени, отримані від бактерій шляхом гори-

зонтального переносу. Велика частина генома *T. vaginalis* містить повторювані послідовності ДНК і транспозонові елементи, що ускладнює геномний аналіз. Трихомонади містять близько 60 000 генів, що вдвічі більше, ніж у геномі людини та близько до верхньої межі для еукаріотичних геномів.

Кінетопластиди є добре вивченою групою Екскаватів, яка отримала назву через наявність кінетопласту – скупчення ДНК в одній великій мітохондрії, що повязана з базальним тільцем джгутика. Кінетопластиди живуть переважно у воді та живляться бактеріями. Деякі види – паразити тварин і викликають серйозні захворювання людини та хребетних тварин.

Кінетопластиди роду *Trypanosoma*, що інфікують людину, невеликі, довжиною близько 20 мкм, тонкі та мають форму півмісяця. Трипаносоми мають один джгутик, що бере свій початок у базальному тільці. Він розташований під мембраною клітини та огинає клітину збоку. Як джгутик, так і мембрана беруть участь у рухливості клітини, що дозволяє ефективно рухатись навіть у в'язких рідинах, наприклад, крові.

Trypanosoma brucei викликає африканську сонну хворобу – хронічне та смертельне захворювання людини. Паразит живе переважно в крові, але на пізніх стадіях захворювання вражає центральну нервову систему, що спричиняє характерні неврологічні симптоми захворювання. Паразит передається від хазяїна до хазяїна мухою цеце, яка зустрічається лише в деяких частинах Африки. Після потрапляння до мухи паразит розмножується в кишковому тракті, переходить в слинні залози комахи, з яких він переноситься до нового хазяїна шляхом укусу мухою.

До інших кінетопластид-паразитів людини відноситься *Trypanosoma cruzi* – збудник хвороби Чагаса, і представники роду *Leishmania* – збудники шкірного та системного лейшманіозу. Збудник хвороби Чагаса передається через укус комахи «жука-цілувальника», а лейшманіозу – через укус піщаної мухи.

Евгленіди. Ще однією добре вивченою групою екскават є евгленіди. На відміну від кінетопластид ці рухливі мікроорганізми є непатогенними хемотрофами та фототрофами. Більшість евгленід мають два джгутики, спинний і черевний. Їх активна рухливість дозволяє мешкати як в освітлених, так і в темних прісноводних та морських середовищах, мають хлоропласти, що підтримують фототрофний ріст. У темряві клітини роду *Euglena*, які є типовими евгленідами, можуть втрачати свої хлоропласти та існувати як хемоорганотрофи. Багато евгленід також можуть харчуватися бактеріями шляхом фагоцитозу.

Група Гаптофіти

Гаптофіти – група одноклітинних протист фототрофів, що вільно мешкають у водному середовищі. Ключовий рід – *Emiliania*. Члени цієї групи численні та поширені в океанах, де вони мають важливий вплив на біосферу. Усі гаптофіти мають декілька спільних структурних особливих

ознак, включно з наявністю двох джгутиків, двох хлоропластів, а також унікальної структури, що називається гаптонема. Гаптофіти в якийсь момент свого життєвого циклу мають жорсткі пластинки на їх зовнішній поверхні, морфологія яких може значно відрізнятися між видами.

Хоча всі гаптофіти фототрофні, деякі отримують енергію також поїдаючи дрібніші організми або детрит. Гаптонома, за якою названа група, використовується саме під час харчування, полегшує прикріплення та уникнення хижаків.

Коколітофори – одна з основних груп гаптофітів, що виділяється своєю здатністю утворювати складні мінералізовані пластини з карбонату кальцію (коколіти). Коколітофори є одними з найбільш поширених одноклітинних фототрофних еукаріотів в океані. Кокколітофори можуть давати до 10% первинної продукції у фотичній зоні, а також утворювати масивні цвітіння, що займають площу в сотні тисяч квадратних кілометрів.

Коколіти посилюють фотосинтез шляхом ослаблення або фокусування клітиною сонячного світла та захищають клітину від поїдання або від нападу бактерій та вірусів. Виробництво кокколітних пластин має великий вплив на вуглецевий цикл Землі, оскільки клітини зрештою тонуть, експортуючи вуглець на морське дно у формі кальциту. Тому коколітофори є «біологічним насосом», що видаляє CO_2 з атмосфери та відкладає його на морське дно, де він зрештою утворює відкладення крейди у багатьох регіонах світу, наприклад, у знаменитих Білих скелях Дувра в Англії.

Супергрупа Амебозої (*Amoebozoa*)

Амебозої – велика група наземних і водних протистів, які використовують лопатеподібні псевдоподії для руху та годування, на відміну від ниткоподібних псевдоподій ризарій. Основними групами амебозой є гімнамеби, ентамеби, плазмодіальні та клітинні слизовики. Основні роди *Amoebozoa – Gymnamoeba, Entamoeba, Physarum, Dictyostelium*. Філогенетично амебозої відокремились від лінії, що зрештою призвела до утворення ліній грибів і тварин.

Гімнамеби та Ентамеби (*Gymnamoebas* і *Entamoebas*). Це протисти, які вільно мешкають у воді та ґрунті. Вони використовують псевдоподії для пересування за допомогою процесу, що називається амебоїдний рух і живляться бактеріями, іншими протистами та частинками органічного матеріалу шляхом фагоцитозу.

Амебоїдний рух є результатом потоку цитоплазми, яка тече в менш в’язкий кінчик клітини шляхом найменшого опору. В перетіканні цитоплазми беруть участь мікрофіламенти, розташовані безпосередньо під клітинною мембраною. Амеба є звичайним організмом у воді ставків. Вони варіюють за розміром від 15 мкм до понад 750 мкм у діаметрі.

На відміну від гімнамеб, ентамеби є паразитами хребетних і безхребетних. Звичайним місцем їх проживання є ротова порожнина або кишко-

вий тракт тварин. Патогенна для людини анаеробна *Entamoeba histolytica* викликає амебну дизентерію, виразку кишкового тракту, що призводить до кривавої діареї. Цей паразит утворює цисти, які передаються від людини до людини через фекальне забруднення води, їжі та посуду.

Слизовики (*Physarum)*. Раніше слизовики об'єднували в групу з грибами, оскільки вони проходять подібні життєві цикли та утворюють плодові тіла зі спорами. Слизовики рухливі та можуть досить швидко рухатися по твердій поверхні. Слизовики поділяються на дві групи: плазмодіальні слизовики (безклітинні слизовики), чиї вегетативні форми є масами протоплазми невизначеного розміру та форми, що називається плазмодієм, і клітинні слизовики, вегетативні форми яких є одиничними амебами.

Слизовики живуть в основному на рослинних рештках в ґрунті, де вони споживають інші мікроорганізми, особливо бактерії. Слизові гриби можуть зберігатися у вегетативному стані протягом тривалого часу, але з часом утворюють диференційовані спороподібні структури, що можуть залишатися в стані спокою, а потім проростати знову та переходити в активний амебоїдний стан.

Плазмодіальні слизовики, такі як *Physarum*, існують у вегетативній фазі як маса протоплазми, що пересувається та містить багато диплоїдних ядер. Цей плазмодій активно пересувається шляхом амебоїдного руху. Після цієї фази може утворювати спорангій, що містить гаплоїдні спори. За сприятливих умов спори проростають і утворюють рій гаплоїдних джгутикових клітин, які зливаються та дають початок диплоїдному плазмодію.

На відміну від плазмодіальних родичів, клітинні слизовики – це окремі гаплоїдні клітини, які утворюють диплоїди лише за певних умов. Добре вивчена клітинна слизова пліснява *Dictyostelium discoideum* проходить нестатевий життєвий цикл, під час якого вегетативні клітини агрегують, мігрують у вигляді клітинної маси та зрештою утворюють плодові тіла, в яких клітини диференціюють та утворюють спори.

Під час голодування клітини *Dictyostelium* агрегують і утворюють псевдоплазмодій, в якому клітини не зливаються. Агрегація запускається утворенням циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ). Перші клітини *Dictyostelium*, які виробляють цАМФ, приваблюють сусідні клітини та зрештою агрегують у рухливу масу клітин, що називають слизнем.

Формування плодового тіла починається, коли слизень стає нерухомим. Утворюється структура з ніжкою та головкою. Клітини ніжки утворюють целюлозу, що забезпечує жорсткість ніжки, а клітини головки диференціюють в спори. Згодом спори вивільняються та розсіюються, причому кожна спора утворює нову амебу.

На додаток до цього нестатевого процесу *Dictyostelium* може виробляти статеві спори. Вони утворюються, коли дві амеби зливаються та утворюють одну гігантську амебу. Формується товста целюлозна стінка навколо

ції клітини та утворюється макроциста, що може залишатися в стані спокою протягом тривалого часу. Зрештою, диплоїдне ядро піддається мейозу з утворенням гаплоїдних ядер, що об'єднуються в нових амеб, які можуть знову ініціювати нестатевий цикл.

Супергрупа Опістоконти (*Opisthokonta*)

Опістоконти – обширна група еукаріотів, що включає царства грибів і тварин, а також споріднених з ними мікроорганізмів.

Гриби – це велика, різноманітна та широко розповсюджена група нефототрофних еукаріотичних мікроорганізмів, які утворюють жорсткі клітинні стінки з хітину. Описано приблизно 100 000 видів грибів. Вони утворюють філогенетичний кластер, який є групою мікроорганізмів, найбільш тісно філогенетично пов'язаних з тваринами (див. рис. 3.4). Більшість видів грибів є мікроскопічними та наземними. Вони населяють ґрунт або мертвий рослинний матеріал і відіграють вирішальну роль у розкладанні органічної речовини. Значна частина видів грибів є збудниками захворювань рослин та тварин, у тому числі людини. Деякі види грибів утворюють симбіотичні асоціації з рослинами та полегшують отримання рослиною мінеральних речовин з ґрунту. Багато представників грибів приносять користь людям завдяки здатності до бродіння та синтезу антибіотиків.

Гриби є хемоорганотрофами, виявляють прості потреби в харчуванні, більшість з них аероби, живляться шляхом виділення позаклітинних ферментів, що гідролізують полімерні матеріали, такі як полісахариди або білки до мономерів.

Більшість грибів багатоклітинні, утворюють мережу гіфів. Грибні гіфи часто з поперечними стінками, що ділять їх на окремі клітини. У деяких випадках вегетативна клітина гіфа гриба містить багато ядер, такий стан називається ценоцитом. Гіфи утворюють компактний, макроскопічно видимий субстратний та повітряний міцелій.

На гіфах повітряного міцелію утворюються спори – конідії. Конідії є нестатевими спорами, часто забарвлені в чорний, зелений, червоний, жовтий або коричневий колір. Деякі гриби формують макроскопічні репродуктивні структури, що називають плодовими тілами, з мільйонами спор, які поширюються вітром, водою або тваринами.

На відміну від міцеліальних грибів дріжджі ростуть поодинокими клітинами. Більшість клітинних стінок грибів складається з хітину – полімеру N-ацетилглюкозаміну.

Гриби розмножуються за допомогою росту і поширення гіфів, безстатевим утворенням спор (конідій), простим поділом клітин шляхом брунькування (у дріжджів). Деякі гриби утворюють спори в результаті статевого розмноження. Спори розвиваються в результаті злиття або одноклітинних гамет, або спеціалізованих гіфів – гаметангіїв. Як варіант, статеві спори можуть виникнути в результаті злиття двох гаплоїдних клітин з утворенням

диплоїдної клітини, яка піддається мейозу та мітозу з утворенням гаплоїдної спори.

Гриби є більш близькими родичами для тварин, ніж будь-яка інша група еукаріотів. Останній загальний предок усіх грибів, ймовірно, існував десь між 0,45–1,50 мільярда років тому. Першими грибами вважаються *Chytridiomycota*, незвичайна група рухомих грибів, які утворюють зооспори. Відсутність джгутиків у більшості грибів вказує на те, що рухливість є ознакою, яка була втрачена в різний час у різних грибних лініях.

Традиційно, систематика грибів значною мірою грунтувалась на фенотипових ознаках. Наразі для цього стали використовувати порівняння послідовностей 18S рибосомної РНК, що в значній мірі уточнює класифікацію царства *Fungy.*

Далі наведено характеристики основних груп грибів: *Microsporidia, Chytridiomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Ascomycota* та *Basidiomycota*.

Мікроспоридії та Хітридіомікоти (*Microsporidia, Chytridiomycota*). *Microsporidia* і *Chytridiomycota* є давніми філогенетичними групами паразитичних або сапрофітних грибів. Основні роди – *Allomyces, Batrachochytrium, Encephalitozoon.*

Мікроспоридії – дрібні (2–5 мкм) одноклітинні паразити тварин і протистів. За результатами секвенування генів 18S рРНК та відсутності у них мітохондрій вважають, що мікроспоридії є дуже раннє утворення лінії *Eukarya*. Мікроспоридії – облігатні паразити багатьох тварин-хазяїнів, у тому числі людей, тоді як *Chytridiomycota* – це переважно водні гриби, які є або паразитами, або сапрофітами.

Комплексне секвенування генів і білків показало, що мікроспоридії є грибами, які тісно пов'язані з *Chytridiomycota*. Мікроспоридії пристосувалися до паразитичного способу життя. Вони існують як спори поза межами хазяїна. Перебуваючи поряд з хазяїном, вони подовжують спіральну полярну трубочку, що пронизує цитоплазматичну мембрану клітини хазяїна. Спороплазма проникає в клітину-хазяїна де розмножується та спори вивільняються в навколишнє середовище.

Як і більшість облігатних паразитів, мікроспоридії зазнали значного зменшення генома, втративши при цьому багато ознак, що дозволяли їм жити поза клітиною-хазяїном. У мікроспоридій *Encephalitozoon*, наприклад, не має ні мітохондрій, ні комплекса Гольджі. Крім того, їх клітини мають дуже малий геном – лише 2,9 млн п. н. і лише близько 2000 генів (це на 1,5 млн п. н. і на 2600 генів менше, ніж у *Escherichia coli*). У геномі *Encephalitozoon* відсутні гени основних метаболічних шляхів, таких як цикл трикарбонових кислот. У людей *Encephalitozoon* викликає хронічні виснажливі захворювання кишечника, легенів, очей, м'язів і деяких внутрішніх органів.

Chytridiomycota або хітриди є однією з найдавніших ліній грибів, а їх назва вказує на будову плодового тіла, що містить зооспори. Ці спори незвичайні серед спор грибів тим, що вони завдяки джгутикам рухливі та ідеально підходять для розповсюдження у водному середовищі.

Відомо, що багато видів хітридів існують як окремі клітини, тоді як інші утворюють гіфи та колонії. Вони включають як вільноживучі форми, що розкладають органічний матеріал, такі як *Allomyces*, так і паразити тварин, рослин і протистів. Хітрид *Batrachochytrium dendrobatidis* викликає хітридиомікоз жаб. Ці хітриди інфікують епідерміс жаби, що призводить до втрати іонів через мембрану та осмотичного дисбалансу. Хітриди були причетні до масового вимирання жаб і деяких інших земноводних у всьому світі.

Мукоромікота та Гломеромікота *(Mucoromycota, Glomeromycota)*. *Mucoromycota* відноситься до зигоміцетів, грибів, що виробляють зигоспори. Основний рід *Rhizopus.* Мукоромікоти відомі насамперед своєю роллю у псуванні харчових продуктів, зустрічаються в ґрунті та на гнилому рослинному матеріалі, часто мають життєвий цикл, що включає статеві зигоспори.

Поширеним представником є звичайна цвіль чорного хліба *Rhizopus nigricans.* Цей гриб проходить складний життєвий цикл, що включає як безстатеве, так і статеве розмноження. У безстатевій фазі міцелій утворює спорангії, всередині яких утворюються гаплоїдні спори. Після вивільнення ці гаплоїдні спори розсіюються та зрештою проростають, що дає початок вегетативному міцелію. У статевій фазі міцеліальні гаметангії зливаються та утворюють клітину з двома ядрами, яка згодом перетворюється на зигоспору, що може залишитися в стані спокою. За сприятливих умов зигоспора проростає, утворюючи або диплоїдний міцелій, або спорангій, який виробляє гаплоїдні спори.

Більшість видів *Rhizopus* і споріднених зигоміцетів нешкідливі сапрофіти, спори яких потрапляють у повітря і утворюють колонії на продуктах харчування та стінах будинку. Однак деякі види є патогенними для людини. При вдиханні спори патогенних видів *Rhizopus* можуть викликати серйозні інфекції легенів, носових пазух, очей, носа та рота.

Glomeromycota – це відносно невелика та унікальна група облігатно симбіотичних грибів, в якій усі відомі види утворюють асоціації з рослинами – ендомікоризи. Основний рід *Glomus.* Більше 80% видів наземних рослин утворюють асоціації, в яких гіфи грибів потрапляють у рослинну клітину та допомагають рослині отримувати фосфат з ґрунту в обмін на фіксований вуглець від рослини. Гриби, які утворюють структури, що називаються арбускулами, проникають в клітини рослини-хазяїна та спеціалізуються на обміні поживними речовинами. Гломероміцети розмножуються тільки безстатевим шляхом. Гіфи – переважно ценоцитні. Безстатеві спори

ендомікоризних грибів *Glomus* використовують для інокуляції сільськогосподарських рослин.

Аскомікота (*Ascomycota*). Аскомікоти або аскоміцети є найбільш різноманітною групою грибів, які варіюють від одноклітинних видів до видів, що ростуть у вигляді гіфів, таких як звичайна цвіль. Основні роди – *Saccharomyces, Candida, Aspergillus.*

Аскоміцети зустрічаються у водних і наземних середовищах. Вони отримали свою назву від формування асків – клітин, у яких два гаплоїдні ядра з різних типів спарювання зливаються, утворюючи диплоїдне ядро, що зрештою піддається мейозу з утворенням гаплоїдних аскоспор. Окрім цього, аскоміцети розмножуються безстатево шляхом утворення конідій на кінчиках спеціалізованих гіф – конідієносців. Як сапрофітні, так і патогенні дріжджі, такі як *Candida albicans*, широко розповсюджені в природі.

Клітини сахароміцетів (н. п., пекарські дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*) та інших одноклітинних аскоміцетів – сферичні, овальні або циліндричні. Зазвичай поділ клітин відбувається шляхом брунькування. У процесі брунькування нова клітина утворюється як наріст на старій клітині. Брунька поступово збільшується та відділяється від батьківської клітини.

Дріжджі поширені в місцях, багатих на цукор, таких як фрукти, овочі, квіти та кора дерев. Сахароміцети зазвичай є факультативними аеробами, які ростуть і без доступу кисню за рахунок процесів бродіння. Деякі дріжджі живуть у симбіозі з тваринами, особливо комахами, а деякі види є патогенними для тварин, зокрема людини. Дріжджі *S. cerevisiae* є моделлю для вивчення еукаріотів.

Дріжджі роду *Saccharomyces* можуть розмножуватися статево шляхом зливання двох клітин та утворення зиготи, в якій відбувається мейоз і з часом утворюються аскоспори. *S. cerevisiae* може рости вегетативно (нестатевим шляхом). *S. cerevisiae* утворює два різні типи гаплоїдних клітин. Вони позначаються α (альфа) і *a*, та кодуються відповідно генами α і *a*, аналогічними чоловічим та жіночим гаметам, що регулюють вироблення пептидних гормонів α-фактор і *a*-фактор, відповідно, що виділяються дріжджовими клітинами під час спарювання. Утворена зигота розмножується вегетативно шляхом брунькування, але в умовах голодування вона зазнає мейозу та утворює аскоспори.

Базидіомікота (*Basidiomycota*). Це велика група грибів, що налічує понад 30 000 відомих видів. Деякі з них – їстівні, наприклад *Agaricus* (печериця), інші, наприклад, *Amanita* (мухомор), є сильно отруйними. Інші базидіоміцети – дощовики, сажка, іржа та важливий патоген людини *Cryptococcus*. Визначальною характеристикою *Basidiomycota* є базидія, структура, в якій шляхом мейозу утворюються гаплоїдні базидіоспори. Термін базидія (маленький постамент) дає назву цій групі.

Протягом більшої частини свого існування гриб живе в формі простого гаплоїдного міцелію, що вегетативно росте в ґрунті, листовому опаді або гниючих деревах. У фазі статевого розмноження базидіоміцет утворює видиму структуру гриба – плодове тіло. У цьому процесі міцелії різних типів спарювання зливаються та утворюють дикаріотичний (два ядра на клітину) міцелій, що росте швидше та витісняє батьківський гаплоїдний міцелій. За сприятливих умов (після періодів вологої та прохолодної погоди), дикаріотичний міцелій швидко розвивається над землею в плодове тіло.

Дикаріотичні базидії розташовані на нижній стороні базидіокарпію на плоских пластинках, що кріпляться до капелюшка гриба. Потім два ядра базидії зливаються та утворюють базидію з диплоїдними ядрами. Після двох мейотичних поділів формуються чотири гаплоїдні ядра в базидії, що перетворюються на базидіоспори, які розносяться вітром та проростають за сприятливих умов і ростуть як гаплоїдний міцелій.

Базидіоміцети сажки та іржі – патогени рослин. Сажки є збудниками зернових та інших культур. Рід *Ustilago* включає кілька видів, що вражають рослини кукурудзи, пшениці та інших зернових. Грибок вражає органи репродуктивної системи рослин. У кукурудзи сажка викликає розвиток зерен з утворенням масивних пухлиноподібних ядер, що надають качану набряклий і обгорілий вигляд. Іржасті гриби інфікують тканини рослин, що швидко ростуть, такі як пагони, листя і плоди. Деякі поширені види іржі включають стеблову іржу пшениці та пухирчасту іржу білої сосни, хворобу, яка може спровокувати відмирання гілок і навіть загибель усього дерева.

Супергрупа Архепластиди (*Archaeplastida*)

Супергрупа *Archaeplastida* включає червоні та зелені водорості (як мікроскопічні так і макроскопічні). Необхідно звернути увагу, що лише червоні та зелені водорості виникли шляхом первинних ендосимбіотичних процесів, тоді як інші протисти, що містять хлоропласти, були результатом вторинних ендосимбіозів. У супергрупі Архепластиди розглянемо саме червоних і зелених водоростей, велику і різноманітну групу еукаріотичних організмів.

Червоні водорості. Червоні водорості, так звані родофіти, в основному мешкають у морському середовищі, хоча кілька видів зустрічаються в прісноводних і наземних середовищах. Відомі як одноклітинні, так і багатоклітинні види родофітів, і деякі з них є макроскопічними.

Червоні водорості містять хлорофіл *a*. Їхні хлоропласти не мають хлорофілу *b*, але містять фікобіліпротеїни, що є основними світлозбиральними пігментами ціанобактерій. Червонуватий колір багатьох червоних водоростей зумовлений фікоеритрином, допоміжним пігментом, що маскує зелений колір хлорофілу. Цей пігмент присутній разом з фікоціаніном і алофікоціаніном у структурах, що називаються фікобілісомами, компонентами світлозбиральних антен ціанобактерій.

Більшість видів червоних водоростей, що мешкають у морському середовищі, багатоклітинні і позбавлені джгутиків. Деякі з них є джерелом агару, що використовується в мікробіології та карагінану – загущувача та стабілізатора для харчових продуктів.

Полісифонія *(Polysiphonia)* – рід ниткоподібних і розгалужених червоних водоростей, що зустрічаються по всьому світу в морських середовищах переважно біля берега, де вони ростуть, прикріплені до каменів, штучних поверхонь, таких як причали. Відомо близько 200 видів цього роду. Вони мають складний життєвий цикл, в якому відбувається чергування поколінь. У цьому циклі гаплоїдні чоловічі та жіночі гамети, що виділяються з диплоїдного багатоклітинного організму розвивається в гаплоїдні чоловічі та жіночі багатоклітинні організми. Чоловіча водорость вивільняє гаплоїдні клітини сперми, що зливається зі спеціалізованою репродуктивною структурою на жіночій водорості. Утворюється диплоїдна зигота, яка розвивається в багатоклітинну форму та після мейозу вивільняє чоловічі та жіночі гамети для завершення життєвого циклу.

Окрім багатоклітинних червоних водоростей, таких як *Polysiphonia*, відомі також одноклітинні види. Однією з таких груп є члени порядку *Cyanidiales*, які включають роди *Cyanidium, Cyanidioschyzon* і *Galdieria*. Вони мешкають в кислих і багатих металами гарячих джерелах при температурах від 30 до 60 °C і pH 0,5-4,0. У цих екстремальних умовах не можуть існувати інші фототрофні мікроорганізми.

Клітини *Cyanidioschyzon merolae* надзвичайно малі для еукаріотів (1–2 мкм у діаметрі) і геном їх (приблизно 16,5 млн п. н) є одним із найменших, відомих для фототрофних еукаріотів. Молекулярний аналіз генома *Galdieria* показав дивовижний результат – цей еукаріотичний фототроф містить принаймні 75 генів, отриманих шляхом горизонтального перенесення від різних прокаріотів. Деякі з переданих ключових генів кодують захист від сольового стресу, токсичних металів, відповідають за міцність цитоплазматичної мембрани та здатність *Galdieria* до росту у темряві.

Зелені водорості. Основними родами є *Chlamydomonas* та *Volvox*. Зелені водорості або хлорофіти мають хлоропласти, що містять хлорофіли *a* і *b*, що надають їм характерного зеленого кольору. За складом фотосинтетичних пігментів зелені водорості подібні та філогенетично близькі до рослин. Існує дві основні групи зелених водоростей: хлорофіти, прикладами яких є мікроскопічні *Chlamydomonas* і *Dunaliella*, і харофіти, такі як макроскопічні організми *Chara,* які найбільш тісно пов'язані з наземними рослинами.

Більшість зелених водоростей населяють прісні води, а інші зустрічаються у вологому ґрунті або ростуть у снігу, який вони забарвлюють у рожевий колір. Інші зелені водорості живуть в симбіозі з грибами та утворюють лишайники. Морфологія хлорофітів різноманітна – від одноклітинних до ниткоподібних та колоніальних. Існують навіть багатоклітинні види,

прикладом яких є морська водорість *Ulva*. Більшість зелених водоростей мають складний життєвий цикл із стадіями статевого та нестатевого розмноження.

Одним із найменших відомих еукаріотів є зелена водорість *Ostreococcus tauri*, поширений одноклітинний вид морського фітопланктону. Клітини мають діаметр приблизно 2 мкм, і найменший геном серед відомих фототрофних еукаріотів – приблизно 12,6 млн п. н. *O. tauri* став модельним організмом для дослідження еволюції зменшення генома та спеціалізації еукаріотів.

На колоніальному рівні організації у зелених водоростей знаходиться *Volvox*. Ця водорість утворює колонії, що складаються з кількох сотень джгутикових клітин. Деякі з них відповідають за рухливість, тоді як інші спеціалізуються на розмноженні. Клітини в колонії вольвокса з'єднані між собою тонкими тяжами цитоплазми, що дозволяє всій колонії плавати скоординовано. *Volvox* є моделлю для дослідження генетичних механізмів, що контролюють багатоклітинність і розподіл функцій між клітинами багатоклітинних організмів.

Деякі колоніальні зелені водорості є перспективними як джерела біопалива. Наприклад, колоніальна зелена водорість *Botryococcus braunii* виділяє довголанцюгові (C_{30}–C_{36}) вуглеводні, що мають консистенцію сирої нафти. Близько 30% сухої маси клітин *B. braunii* складається з цих сполук, і тому до них та інших водоростей підвищений інтерес біотехнологів, як до відновлюваних джерел енергії. Дослідження показали, що деякі відомі запаси нафти походять із зелених водоростей, таких як *B. braunii*, що осіли на дні водойм у давні часи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мікробіологія: підручник : Том 1. / М. Г. Сергійчук, Л. М. Сківка, Т. М. Сергійчук та ін.; – К.: ФОП Масляков, 2020. – 500 с.
2. Мікробіологія: підручник : Том 2. / М. Г. Сергійчук, Л. М. Сківка, Т. М. Сергійчук та ін.; – К.: ФОП Масляков, 2020. – 348 с.
3. Мікробіологія : підручник для студентів вищ, навч. закл. / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С. Білінська. – Львів : Видавничий центр ЛНУ ім. І. Франка, 2009. – 360 с.
4. Мікробіологія : підручник для студентів вищ, навч. закл. / Н. І. Філімонова, Л. Ф. Сілаєва, О. М. Дика та ін.; за заг. ред. Н. І. Філімонової. – 2-ге вид. – Харків: НФаУ: Золоті сторінки, 2019. – 676 с.
5. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія : підручник для студ. вищих мед. навч. закладів / В. П. Широбоков, С. І. Климнюк, В. А. Понятовський та ін.; за ред. В. П. Широбокова. – 3-тє вид. – Вінниця: Нова Книга, 2021. – 920 с.
6. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія: підручник. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
7. Практикум з мікробіології : підручник для студентів вищ, навч. закл. / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, Г. В. Яворська, І. С. Білінська, Б. М. Борсукевич. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2014 с. – 436 с.
8. Практична мікробіологія : навчальний посібник / С. І. Климнюк, І. О. Ситник, В. П. Широбоков та ін.; за заг. ред.: В. П. Широбокова, С. І. Климнюка. – Вінниця : Нова Книга, 2018. – 576 с.
9. Brock Biology of Microorganisms / M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckle, W. M. Sattle, D. A. Stahl. – XVI ed. – Pearson Education, 2021. – 1129 p.
10. Foundations in Microbiology – Basic Principles / K. P. Talaro, B. Chess, – McGraw Hill, 2024. – 947 p.
11. Laboratory Fundamentals of Microbiology / J. C. Pommerville. – 12 ed. – Jones& Bartlett Learning Company, 2022. – 950 p.
12. Microbiology: an introduction / G. J. Tortora, B. R. Funke, C. L. Case. 13 ed. – Pearson Education, 2021. – 964 p.
13. Microbiology Principles and Explorations / J. G. Black, L. J. Black. – 10 ed. – Virginia Arlington: Marymount University, 2018. – 896 p.
14. Microbiology. Laboratory Manual / J. G. Cappuccino, C. Welsh. – 12 ed. – Pearson Education, 2020. – 561 p.
15. Nester's microbiology: a human perspective, Ninth edition / G. Anderson Denise, N. Salm Sarah, P. Allen Deborah, W. Nester Eugene. – McGraw-Hill Education, N.Y., 2019. – 1401 p.
16. Prescott's Microbiology / M. J. Willey, K. M. Sandman, D. H. Wood. – 12 ed. – McGraw-Hill Education, 2023. – 1024 p.
17. Culture collections over the world / D. Smith // Int. Microbiol. – 2003. – V. 6. – P. 95–100.

ЗМІСТ

ВСТУП 3

РОЗДІЛ 1
МІКРОБІОЛОГІЯ ЯК НАУКА 6
1.1. Світ мікроорганізмів 6
1.2. Історія становлення та розвитку мікробіології 10
1.3. Основні галузі мікробіології 11

РОЗДІЛ 2
СИСТЕМАТИКА МІКРООРГАНІЗМІВ 18
2.1. Положення мікроорганізмів в системі живої природи 18
2.2. Таксономія 20
2.3. Класичний підхід 24
2.4. Молекулярно-біологічний підхід 25
2.5. Технологія філогенії генів 16S рРНК 27
2.6. Молекулярно-біологічна ідентифікація 29
2.7. Колекції мікроорганізмів 30

РОЗДІЛ 3
БІОЛОГІЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ 33
3.1. Домен *Bacteria* 34
3.2. Домен *Archaea* 35
3.3. Домен *Eukarya* 36
3.4. Царство *Vira* 39

РОЗДІЛ 4
ФУНКЦІОНАЛЬНА АНАТОМІЯ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ 44
4.1. Структури прокаріотичної клітини та їх функції 47
4.1.1. Клітинна мембрана 47
4.1.2. Мембрани архей 48
4.1.3. Внутрішньоцитоплазматичні мембрани 49
4.1.4. Клітинна стінка бактерій 49
4.1.5. Клітинна стінка архей 53
4.1.6. S-шар 54
4.1.7. Цитоскелет і цитоплазма 55
4.1.8. Нуклеоїд 55
4.1.9. Рибосоми 56
4.1.10. Капсули, слиз та чохли 57
4.1.11. Ендоспори та інші форми бактерій, що покояться 58
4.1.12. Пілі 60
4.1.13. Джгутики та рухливість 61
4.1.14. Архаели 64
4.1.15. Рухливість спірохет 64
4.1.16. Рухливість по поверхні 65

4.1.17. Бактерії зі складним циклом розвитку 66
4.1.18. Включення 68
4.2. Структури еукаріотичної клітини та їх функції 70
4.2.1. Клітинна мембрана 71
4.2.2. Клітинна стінка 71
4.2.3. Рибосоми 71
4.2.4. Ядро 72
4.2.5. Ендоплазматичний ретикулум 72
4.2.6. Апарат Гольджі 73
4.2.7. Лізосоми та вакуолі 74
4.2.8. Мітохондрії 74
4.2.9. Гідрогеносоми 75
4.2.10. Хлоропласти 75
4.2.11. Цитоскелет 76
4.2.12. Війки та джгутики 76
4.2.13. Ендосимбіотична гіпотеза 78

РОЗДІЛ 5
РІСТ І КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ 79
5.1. Ріст і розмноження 79
5.2. Поживні речовини та поживні середовища 81
5.3. Накопичувальні та чисті культури мікроорганізмів 85
5.4. Періодичне культивування 85
5.5. Безперервне культивування 87
5.6. Ріст на поверхні. Біоплівки 88
5.7. Ріст мікроорганізмів у природному середовищі 89
5.8. Вплив фізичних і хімічних факторів на ріст мікроорганізмів 91
5.8.1. Температура 91
5.8.2. Відношення мікроорганізмів до кисню 93
5.8.3. Показник кислотності середовища 95
5.8.4. Активність води 97
5.8.5. Гідростатичний тиск 101
5.8.6. Електромагнітне випромінювання 102
5.8.7. Контроль росту мікроорганізмів 104

РОЗДІЛ 6
МЕТАБОЛІЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ 107
6.1. Типи метаболізму 107
6.2. Ферменти 110
6.3. Відновлювальна сила 110
6.4. Енергетичні молекули 111

6.5. Схема обміну речовин хемоорганогетеротрофного мікроорганізму ... 113
6.6. Розщеплення високомолекулярних субстратів позаклітинними гідролазами ... 114
6.7. Транспортування речовин у клітину ... 114
6.8. Катаболізм гексоз до пірувату та субстратне фосфорилювання ... 117
6.9. Декарбоксилювання піровиноградної кислоти ... 119
6.10. Цикл трикарбонових кислот ... 120
6.11. Генерування трансмембранного потенціалу протонів ... 121
6.12. Утворення АТФ (окисне фосфорилювання) ... 123
6.13. Біосинтез сполук та збирання структурних компонентів ... 127
6.14. Вилучення з клітини продуктів метаболізму та шкідливих речовин ... 128

РОЗДІЛ 7
ХЕМООРГАНОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ: БРОДІННЯ ТА СУБСТРАТНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ... 130
7.1. Спиртове бродіння ... 131
7.2. Молочнокисле бродіння ... 134
7.3. Пропіоновокисле бродіння ... 136
7.4. Мурашинокисле (змішане) бродіння ... 138
7.5. Бутиратнокисле бродіння ... 139
7.6. Бродіння без фосфорилювання на рівні субстрату ... 140

РОЗДІЛ 8
ХЕМООРГАНОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ: ДИХАННЯ ТА ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ... 142
8.1. Аеробне дихання ... 143
8.2. Анаеробне дихання ... 146
8.2.1. Нітратне дихання ... 148
8.2.2. Сульфатне дихання ... 150
8.2.3. Сіркове дихання ... 153
8.2.4. Залізне дихання ... 153
8.2.5. Фумаратне дихання ... 154
8.2.6. Карбонатне дихання ... 154
8.3. Неповне окиснення ... 156
8.4. Мікробна біолюмінесценція ... 157
8.5. Метилотрофія ... 159
8.6. Використання багатовуглецевих субстратів ... 160

РОЗДІЛ 9
ХЕМОЛІТОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ 164
9.1. Нітрифікуючі мікроорганізми 165
9.2. Бактерії, що окиснюють відновлені сполуки сірки 169
9.3. Металокиснюючі мікроорганізми 171
РОЗДІЛ 10
ФОТОТРОФНИЙ МЕТАБОЛІЗМ 174
10.1. Фототрофні організми 175
10.2. Організація та функціонування фотосинтетичного апарату 175
10.3. Хлорофіл і бактеріохлорофіл 177
10.4. Допоміжні пігменти 178
10.5. Фотосинтетичні мембрани, хлоропласти та хлоросоми 179
10.6. Реакційний центр, антена та система переносу електронів 181
10.7. Аноксигенний фотосинтез 183
10.8. Оксигенний фотосинтез 184
10.9. Фотосинтез у галоархей 186
РОЗДІЛ 11
КОНСТРУКТИВНИЙ МЕТАБОЛІЗМ 189
11.1. Асиміляція двоокису вуглецю мікроорганізмами 190
11.2. Гетеротрофна фіксація CO_2 195
11.3. Використання інших одновуглецевих сполук 195
11.4. Асиміляція сполук азоту 196
11.5. Фіксація молекулярного азоту 197
11.6. Асиміляція фосфору мікроорганізмами 199
11.7. Мікробна асиміляція сірки 200
11.8. Мікробна асиміляція заліза 200
11.9. Біосинтез амінокислот 202
11.10. Біосинтез нуклеотидів 203
11.11. Синтез біополімерів 203
11.12. Біосинтез полісахаридів і глюконеогенез 203
11.13. Біосинтез жирних кислот і ліпідів 204
11.14. Вторинні метаболіти та їх біосинтез 205
РОЗДІЛ 12
РЕГУЛЯТОРНІ МЕХАНІЗМИ ПРОЦЕСІВ МЕТАБОЛІЗМУ 206
12.1. Просторовий розподіл ферментів та метаболітів 207
12.2. Контроль активності ферментів 208
12.3. Контроль синтезу ферментів 210
12.4. Репресія та індукція 211
12.5. Механізм атенуації 216
12.6. Регуляторні РНК 217

12.7. Двокомпонентні системи регулювання 217
12.8. Регуляція хемотаксису 218
12.9. Контроль транскрипції в архей 218
12.10. Обмін сигналами між клітинами 219
12.11. Контроль факторів вірулентності 221
12.12. Регулювання поділу клітини 221

РОЗДІЛ 13
ГЕНОМ І ГЕНОТИПОВА МІНЛИВІСТЬ 223
13.1. Генетичні елементи 223
13.1.1. Хромосома 223
13.1.2. Плазміди 229
13.1.3. Мобільні генетичні елементи 230
13.2. Мутації 232
13.3. Генетична рекомбінація 235
13.4. Горизонтальне перенесення генів та їх рекомбінація 236
13.5. Способи обміну генетичною інформацією у прокаріотів 237
13.5.1. Трансформація 238
13.5.2. Кон'югація 241
13.5.3. Трансдукція 248
13.6. Обмін генетичною інформацією та інші генетичні події в архей 252
13.7. Молекулярні механізми захисту від чужої ДНК 253
13.8. Молекулярні механізми набуття антибіотикорезистентності ... 255

РОЗДІЛ 14
ЕВОЛЮЦІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ 257
14.1. Походження клітинного життя 259
14.2. Останній універсальний спільний предок 260
14.3. Історія життя, записана в ДНК 262
14.4. Горизонтальне перенесення генів і дерево життя 263
14.5. Походження та еволюція еукаріотичної клітини 264
14.6. Механізми створення генетичної мінливості та еволюції мікроорганізмів 269
14.7. Походження видів мікроорганізмів 272
14.8. Еволюція вірусів 273

РОЗДІЛ 15
ЕКОЛОГІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ 274
15.1. Середовища існування 275
15.2. Рівень поживних речовин і швидкість росту 277
15.3. Конкуренція та співпраця 277
15.4. Екологічні групи мікроорганізмів 278
15.5. Планктон і біоплівка як спосіб життя 278

15.6. Характеристка водного середовища 280
15.7. Мікроорганізми прісних водойм 282
15.8. Мікроорганізми морських екосистем 284
15.9. Віруси морських бактерій і архей 291
15.10. Мікробіота глибоководних морських відкладів 293
15.11. Хемолітотрофні екосистеми 294
15.12. Мікробіологія наземного середовища 298
15.13. Роль мікроорганізмів у самоочищенні природних екосистем 302

РОЗДІЛ 16
МІКРООРГАНІЗМИ ТА БІОГЕОХІМІЧНІ ЦИКЛИ 303
16.1. Цикл вуглецю 304
16.2. Цикл азоту 307
16.3. Цикл фосфору 309
16.4. Цикл сірки 310
16.5. Цикл заліза 311
16.6. Мікроорганізми та глобальні зміни клімату 313

РОЗДІЛ 17
ВЗАЄМОВІДНОСИНИ МІЖ ОРГАНІЗМАМИ 317
17.1. Типи симбіотичних зв'язків 318
17.2. Симбіози між мікроорганізмами 322
17.3. Взаємодія мікроорганізмів з рослинами 326
17.4. Взаємодія мікроорганізмів з комахами 334
17.5. Біолюмінесцентні симбіонти 340
17.6. Симбіози хемолітотрофних бактерій в екосистемах гідротермальних джерел 343
17.7. Фототрофні симбіози з тваринами 346
17.8. Симбіоз мікроорганізмів з жуйними тваринами 348

РОЗДІЛ 18
МІКРОБІОМ ЛЮДИНИ 353
18.1. Нормальна мікробіота 353
18.2. Мікробіота шкіри 356
18.3. Мікробіота дихальних шляхів 358
18.4. Мікробіота ока та зовнішнього вуха 359
18.5. Мікробіота сечостатевого шляху 359
18.6. Мікробіота шлунково-кишкового тракту 360
18.6.1. Ротова порожнина 360
18.6.2. Стравохід та шлунок 362
18.6.3. Тонка кишка 363
18.6.4. Товста кишка 363
18.6.5. Розвиток мікробіоти з віком людини 365

18.6.6. Мікробіом і гомеостаз організму людини 368
18.7. Дисбіоз 374
18.8. Корекція складу мікробіоти кишківника 378
РОЗДІЛ 19
ПАТОГЕННІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ 381
19.1. Інфекційні хвороби 381
19.2. Перенесення та проникнення збудника до хазяїна 382
19.3. Фактори патогенності бактерій та їх характеристика..... 386
19.4. Біоплівки забезпечують захист патогенних мікроорганізмів 391
19.5. Резистентність до захисних механізмів хазяїна 392
19.6. Острови патогенності кодують фактори вірулентності 393
19.7. Токсини 394
19.8. Епідеміологія 398
19.9. Біотероризм 399
РОЗДІЛ 20
БАКТЕРІЇ-ЗБУДНИКИ ЗАХВОРЮВАНЬ ЛЮДИНИ 401
20.1. Бактерії, що передаються повітряно-крапельним шляхом 401
20.2. Бактерії-збудники, що переносяться членистоногими 409
20.3. Бактеріальні збудники прямого контакту 410
20.4. Збудники, що передаються статевим шляхом 418
20.5. Збудники, що передаються фекально-оральним шляхом 420
РОЗДІЛ 21
АНТИБІОТИКИ ТА АНТИМІКРОБНІ ПРЕПАРАТИ 426
21.1. Тестування ефективності дії 427
21.2. Продуценти антибіотиків 428
21.3. Класифікація антибіотиків 429
21.4. Механізми дії та мішені 430
21.5. Резистентність до антибіотиків 432
21.6. Антибактеріальні препарати 436
21.6.1. Антибіотики, що блокують утворення клітинної стінки 436
21.6.2. Антибіотики, що інгібують синтез білка 438
21.6.3. Антибіотики, що інгібують синтез нуклеїнових кислот 441
21.6.4. Інші механізми дії антибактеріальних препаратів 442
21.7. Антибіотики, спрямовані на еукаріотичні мікроорганізми 442
21.8. Антивірусні препарати 444
21.9. Резистентність як загроза громадському здоров'ю 446

РОЗДІЛ 22
ПРИКЛАДНА МІКРОБІОЛОГІЯ ТА МІКРОБНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ 448
22.1. Мікробіологія харчових продуктів 448
22.1.1. Використання молочнокислих бактерій 448
22.1.2. Використання дріжджів 451
22.2. Мікробні біотехнології 455
22.2.1. Продуценти 456
22.2.2. Створення виробничих штамів продуцентів 458
22.2.3. Сировина 462
22.2.4. Ферментери 463
22.2.5. Ферментація 465
22.2.6. Іммобілізація 467
22.2.7. Продукти мікробних біотехнологій 467
22.2.8. Мікробні паливні елементи 473
22.2.9. Біовилуговування металів 474
22.3. Прикладна екологічна мікробіологія 477
22.3.1. Очищення та санітарний аналіз питної води 477
22.3.2. Мікробні технології очищення стічних вод 478
22.3.3. Біологічна деструкція, біоремедіація, біоаугментація 481
22.3.4. Біодеградація пластику 485
22.4. Мікроорганізми в аграрному виробництві 486
22.5. Біокорозія промислових та побутових об'єктів і матеріалів 487
ДОДАТОК
Короткий опис основних груп мікроорганізмів 489
ЛІТЕРАТУРА 523

Навчальне видання

Іваниця Володимир Олексійович

МІКРОБІОЛОГІЯ

ПІДРУЧНИК

Електронне видання мережевого використовування

В авторській редакції

Комп'ютерна графіка – М. М. Чабан
Дизайн обкладинки – Н. В. Коротаєва
Верстка – С. О. Остапенко

Затв. авт. 20.08.2025.
Системні вимоги: операційна система сумісна з програмним забезпеченням
для читання файлів формату PDF.
Обсяг 34,6 МБ. Зам. № 2938.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.
вул. Університетська, 12, м. Одеса, 65082, Україна
Тел.: (048) 723 28 39, e-mail: druk@onu.edu.ua