

Н. Д. Иерусалимский

О С Н О В Ы
Ф И З И О Л О Г И И
М И К Р О Б О В

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

Н. Д. Иерусалимский

ОСНОВЫ
ФИЗИОЛОГИИ
МИКРОБОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
Москва 1963

ПРЕДИСЛОВИЕ

Микробиологическая наука никогда не ограничивалась изучением какой-либо одной группы микроскопических живых существ. В сферу ее внимания попадали все те организмы, от бактерий и до высших грибов включительно, жизнедеятельность которых представляет практический или научно-познавательный интерес. В связи с этим область микробиологических исследований год от года расширяется. В дополнение к пищевой, медицинской и почвенной микробиологии за последние 10—20 лет возникли новые разделы микробиологической науки. В частности, микроорганизмы приобрели большую ценность в качестве продуцентов таких физиологически активных веществ, как ферменты, антибиотики, аминокислоты и витамины. Все чаще используются микробы в качестве тонких и специфических реагентов при работах по синтезу стероидов и других химических соединений. Сильно возросло практическое значение микробиологии насекомых, микробиологии нефти и серных руд. Микробиологические исследования заняли видное место в комплексе работ по космической биологии. Все охотнее обращаются к микробиологическим объектам при выяснении путей биосинтеза белков и роли нуклеиновых кислот в явлениях наследственности. Микроорганизмами начали интересоваться представители не только биологических, но и небιологических специальностей.

В связи со сказанным особое значение приобрела физиология микроорганизмов, знание которой необходимо как для управления их ростом и жизнедеятельностью в практических целях, так и с целью получения кондиционированного материала для последующих биохимических и биофизических исследований.

Цель настоящей книги — дать в самой сжатой и простой форме основы современной физиологии микроорганизмов, чтобы облегчить дальнейшее углубление в эту область знания. Книга рассчитана на работников различных микробиологических производств, студентов, аспирантов и научных сотрудников, специализирующихся в области технической, сельскохозяйственной или медицинской микробиологии, а также биологов и химиков-органиков, интересующихся вопросами микробиологии.

Наряду с материалами, почерпнутыми из литературных источников, книга включает в себя данные, полученные в лаборатории автора, особенно в той части, где речь идет о влиянии условий среды на рост, жизнедеятельность и развитие микроорганизмов. При этом выдвинут ряд теоретических положений, которые обычно отсутствуют или слабо освещаются в руководствах по физиологии и биохимии микробов. Сделана, в частности, попытка уточнить вопрос о характерных особенностях живого; предложена новая классификация типов азотно-витаминного питания микробов, развито представление об основном обмене у микроорганизмов, который пока еще не всеми признается; более четко разграничены понятия удельной скорости роста и скорости размножения клеток, изучен вопрос о периодах развития культуры, существующих наряду с общеизвестными фазами роста, освещен вопрос о физиологических стадиях жизненного цикла микроорганизмов и пр.

Ввиду небольшого объема книги, приложенный к ней список содержит лишь самые необходимые литературные источники. Цитированная литература распадается на две категории. В нее входят, во-первых, те работы, из которых взяты приведенные в тексте фактические данные. Во-вторых, в список включен ряд монографий и руководств, необходимых для более подробного ознакомления с теми или иными разделами физиологии микроорганизмов. В частности, развитие микробиологической науки и история вопроса о биохимии обмена веществ отражены в работах следующих авторов: Исаченко (1951), Кретовича (1961); Мейселя (1950), Одинцовой (1959), Омелянского (1953), Пастера (1937), Скороходова (1948).

Проблема возникновения жизни и ее качественные особенности освещены в трудах Энгельса (1953 а, б), в двух работах Тимирязева (1948) и монографии Опарина (1957).

Вопросы цитологии микроорганизмов освещены в «Анатомии бактерий» (1960), сборнике «Живая клетка» (1962) и книгах Мейселя (1950), Беккер (1963), Хоукер (Hawker et al., 1960).

Для более глубокого ознакомления с физиологией и биохимией микроорганизмов рекомендуются монографии и руководства: Белозерского (1961), Губарева (1961), Ключивера и Ван-Ниля (1959), Кретовича (1961), Таусона (1950), Шапошникова (1960), Клифтона (Clifton, 1957).

Данные о роли окислительно-восстановительного потенциала и рН в обмене веществ микроорганизмов изложены в книге Работновой (1957).

Проблема генетики и адаптации микроорганизмов представлена в сборниках «Адаптация у микроорганизмов» (1956), «Микробная генетика» («Microbial Genetics», 1960) и в книге Вагнера и Митчелла (1958).

Более подробно ознакомиться с отдельными группами микроорганизмов, их практическим значением и ролью в круговороте веществ можно по работам: Беккер (1963), Виноградского (1952), Имшенецкого (1953), Исаченко (1951), Кузнецова, Иванова и Ляликовой (1962), Мишустина (1956), Рубан (1961), Шапошникова (1948) и в сборнике «Онтогенез вирусов» (1956).

Наука бурно развивается. То, что еще недавно казалось бесспорной истиной, в свете сегодняшних данных может выглядеть устаревшим и неправильным. Поэтому автор будет искренне благодарен за все замечания и учтет их в своей дальнейшей работе.

ВВЕДЕНИЕ**Значение микробов в природе
и производственной практике**

Физиология является наукой о питании, росте и прочих жизненных отправлениях организмов, в данном случае — микроорганизмов. Как таковая, она должна сочетать морфологические исследования с биохимическими анализами и лабораторный эксперимент — с наблюдениями в естественной обстановке. Физиология стремится не только познать закономерности жизненных процессов, но и сознательно ими управлять. «Физиолог не может довольствоваться пассивной ролью наблюдателя» — писал по этому поводу К. А. Тимирязев (1948, стр. 331).

Все живые существа, в том числе и одноклеточные, состоят из разнообразных структурно оформленных органов, выполняющих определенные функции в общем комплексе жизненных явлений. В основе физиологических функций лежит непрерывный обмен веществ, включающий в себя питание и выделение. Поэтому изучение закономерностей обмена веществ между организмом и средой является основным путем к овладению работой этой «живой машины». Говоря о неожиданной утрате микробами их ценных качеств, В. Н. Шапошников (1939, стр. 279) справедливо отмечает, что в этих случаях «правильнее... винить не организм за то, что он «выродился», а экспериментатора за то, что он не нашел нормальных условий культуры».

Вопрос об обмене веществ микроорганизмов особенно важен еще потому, что по своему значению в природе и практике человека микробы являются чем-то вроде живых химических реактивов. В смысле интенсивности своей биохимической деятельности они не имеют себе равных. Бактериальная клетка может переработать за сутки количество пищи, превышающее в 30—40 раз ее собственный вес. Ни одно другое существо не обладает столь чудовищным «аппетитом». Необходимо к тому же еще

учесть необычайно быстрое размножение микроорганизмов. Биомасса некоторых бактерий удваивается за полчаса и, следовательно, через каждые 5 часов численность их возрастает приблизительно в 1000 раз ($2^{10}=1024$). Если принять средний вес бактериальной клетки равным $0,2 \times 10^{-9}$ мг, то не трудно будет подсчитать, что через 16 часов потомство одной клетки превысит 4 миллиарда особей, а общий вес их составит около 1 мг. Через следующие 5 часов из этого 1 мг бактериальной биомассы образуется 1 г, еще через 5 часов — 1 кг. Такое бурное нарастание биомассы микробов имеет место в действительности. Примером могут служить производства, где выращиваются вакцинные культуры бактерий или пекарские дрожжи.

Учитывая бурный рост микробов и необычайную интенсивность их обмена веществ, легко понять, почему эти ничтожные по своим размерам существа выполняют столь огромную роль в круговороте веществ на нашей планете. В почве, илах и воде за счет деятельности микроорганизмов непрерывно протекают процессы распада растительных и животных остатков до минеральных веществ, синтез и разложение гумуса, улавливание атмосферного азота и углекислоты и превращение их в органические вещества. В 1 г почвы может одновременно жить несколько миллиардов микробных клеток, а общий вес их биомассы на гектар пахотного слоя измеряется сотнями килограммов.

С жизнедеятельностью микроорганизмов связано также образование горючих газов в залежах нефти, окисление и восстановление серных руд, формирование железных и марганцевых отложений в водоемах, накопление селитры в почвах пустынь и много других химических превращений, протекающих в природе. Характеризуя роль микробов в круговороте веществ, С. Н. Виноградский писал: «...они являются живыми носителями бесчисленно разнообразных реактивов, можно даже сказать — воплощенными реактивами, без которых немислимы были бы многие из необходимых процессов, составляющих этот круговорот» (цит. по Омелянскому, 1953, т. II, стр. 37).

Все более возрастает значение микробов в качестве действующего начала при промышленном производстве химических соединений, которые трудно или вовсе невозможно получать путем чисто химического синтеза. Достаточно напомнить о производстве разнообразных антибиотиков, протеолитических и амилолитических ферментов, ряда витаминов (рибофлавин, аскорбиновая кислота, эргостерин, витамин B_{12}), стимуляторов роста растений (гиббереллинов), грибных алкалоидов, различных бродильных продуктов, белковых кормовых препаратов и пр.

За последние годы микроорганизмы все чаще используются для так называемой трансформации химических соединений. При помощи их можно осуществлять очень тонкие изменения в молекуле синтезируемых веществ, затрагивающие только 1—



Антониус Левенгук (1632—1723)

2 атома, и недоступные для современной химической технологии. От неживых химических реактивов микробы отличаются высокой точностью и специфичностью своей деятельности. В частности, их применяют теперь для получения кортико-стероидных гормонов. Оказалось выгодным получать микробиологическим путем и некоторые аминокислоты, потому что при их химическом синтезе образуются рацемические смеси, которые потом трудно разделить, а кроме того, получается много побочных продуктов.

В своей работе «Микроорганизмы как химические реактивы», опубликованной почти сорок лет тому назад, В. Л. Омелянский (1953, т. II, стр. 30) предсказывал «бактериальной химии» блестящее будущее. «Пришло время осуществить, наконец, в деятельной форме давно назревший союз химии и бактериологии», — говорил он по этому поводу. Мы видим, что пожелания Омелянского начинают уже сбываться.

В связи с высокой химической активностью микробов и их ничтожно малыми размерами, история микробиологии в корне отличается от истории наук, посвященных высшим организмам. С древнейших времен человек имел дело с животными и растениями, используя их для своего питания, приручая полезных животных и защищаясь от хищников. Но вопрос о биохимических процессах, протекающих в этих организмах, мало его волновал.

Наоборот, человек испытывал на себе результаты биохимической деятельности микробов за много веков до того, как он узнал о самом их существовании. История донесла до нас мрачные воспоминания об эпидемиях чумы и других болезней, косивших население целых городов. С незапамятных времен использовал человек деятельность микробов в промышленности, в связи с чем история возникновения бродильных производств переплетается с религиозными мифами и преданиями. По античной мифологии, искусство виноградарства и виноделия было передано грекам богом Дионисом (Вакхом), прибывшим из Индии на колеснице, запряженной леопардами. В Библии описана сцена опьянения Ноя, спасшегося после всемирного потопы. Там же даются сведения о хлебопечении. Кефирные зерна на Востоке называются «даром Пророка». Судя по письменам и рисункам, найденным в египетских пирамидах, уже в древнем Египте процветало пивоварение. Есть и ряд других указаний на то, что искусство приготовления вина и уксуса было известно в глубокой древности.

Однако виновники явлений — то грозных, то полезных для человека — в течение тысячелетий оставались неизвестными. Положение вещей изменилось лишь после того, как в XVII веке появилось новое орудие исследования — микроскоп.

Первый, кому посчастливилось увидеть этих неведомых существ, был Антониус Левенгук (A. van Leeuwenhoek, 1632—1723) — прародитель микробиологической науки. За лин-

зой своего примитивного микроскопа он открыл новый мир мельчайших «зверьков» (*animalcula*). «В моем рту их больше, чем людей в Соединенном королевстве» (т. е. Голландии), — писал он с удивлением.

В течение полутора веков после Левенгука было описано немало разнообразнейших живых существ, видимых только вооруженным глазом (рис. 1). Но микроскопические размеры этих существ долго мешали установить причинную зависимость между ними и вызываемыми ими биохимическими превращениями. Первые, еще несмелые указания на роль микробов в инфекционных заболеваниях и бродильных процессах появились только в начале XIX столетия. Окончательно это было доказано Луи Пастером (L. Pasteur, 1822—1895), который по справедливости признается отцом современной научной микробиологии.

С историей развития науки о микробах тесно связаны дискуссии, продолжавшиеся сотни лет и оказавшие немалое влияние как на теоретические представления, так и на методику микробиологических исследований. Это, во-первых, дискуссии о самопроизвольном зарождении и, во-вторых, дискуссии о ферментах.

Дискуссии о самопроизвольном зарождении

Вопрос о происхождении мира живых существ издавна привлекал к себе глубокое внимание. Согласно религиозным учениям, в том числе и тем, которые легли в основу христианства, живые существа были когда-то сотворены богом. Но наряду с этим христианская церковь признавала самопроизвольное зарождение живых существ из неживой природы. В частности, по упомянутому

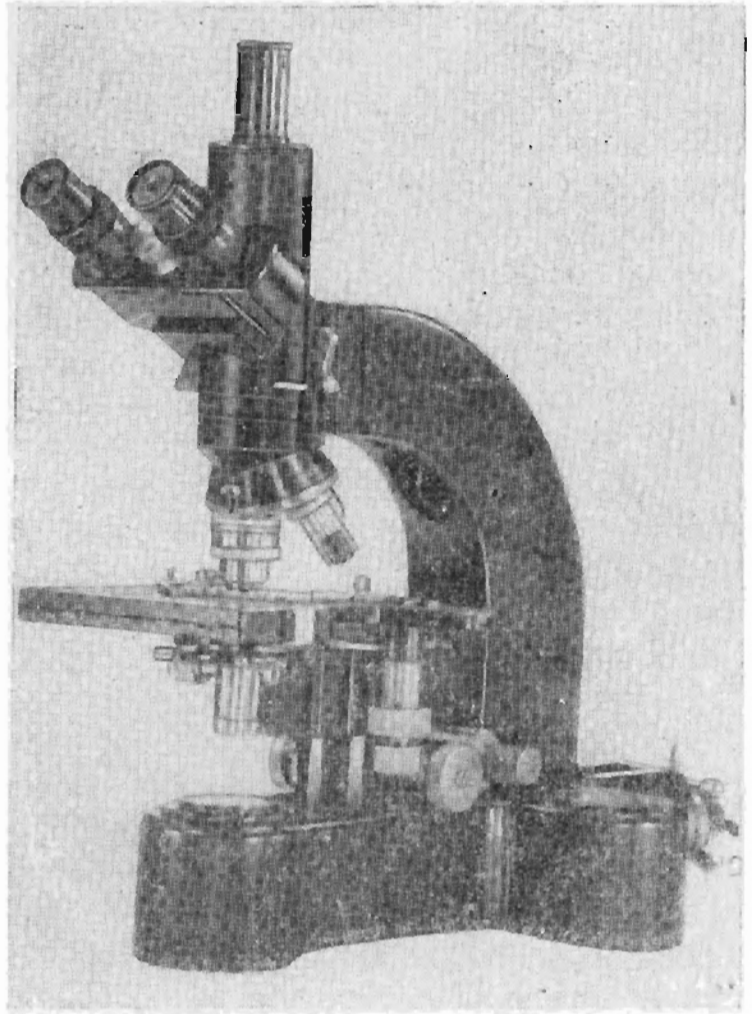


Рис 1 Современный бинокулярный микроскоп с особым тубусом для фотокамеры

выше мифу о всемирном потопе, в Ноевом ковчеге было только 14 пар животных; остальные живые организмы, по мнению учителей церкви, сами собой зародились после потопа из почвы, ила, гниющих отбросов и т. п. материалов. Аристотель — властитель дум ученых средневековья — считал самозарождение бесспорным фактом. В старинных книгах есть рисунки, изображающие превращение плодов особого дерева в гусей и плодов другого дерева — в ягнят. Знаменитый алхимик XVI века Ван-Гельмонт дал рецепт искусственного получения мышей. По его совету в глиняный горшок надо насыпать зерно, заткнуть тряпкой и поставить на несколько дней в укромное место, после чего в горшке появятся молодые мыши. Опыт, вероятно, удавался (если, конечно, в доме водились мыши).

По мере развития науки приходилось все более суживать круг организмов, способных самопроизвольно зародиться. В XVII веке эта способность приписывалась только насекомым. Однако итальянский ученый Реди с помощью простых приемов доказал, что «черви» (точнее — личинки мух) не зарождаются из мяса, а развиваются из яиц, отложенных туда мухами. Он накрывал мясо кисеей; при этом мясо сгнивало, но насекомые в нем не появлялись.

В XVIII веке способность к самопроизвольному зарождению признавалась лишь за микроорганизмами. Излишне было бы перечислять всю аргументацию сторонников и противников этого явления. Достаточно будет вкратце упомянуть, что защитники самозарождения описывали внезапное появление микроскопических существ в мясном настое, отварах бобов, сена и других органических материалов. Их оппоненты утверждали, что микроорганизмы или уже находились в самих исходных материалах или попадали позднее из воздуха. Для доказательства своих взглядов они прибегали к более длительному прогреванию настоев и к более тщательной изоляции их от окружающего воздуха. Из числа таких исследователей упоминаются Спалланцани и Мартин Тереховский, работавшие в XVIII веке, и выступившие в начале следующего века Шванн, Шульце, Шредер и Душ. В ответ на возражения своих противников, что сильное нагревание вредно отзывается на составе жидкости и воздуха в запаянном сосуде, они стали пропускать воздух в сосуд через серную кислоту, а позднее — через вату. Так возник метод термической стерилизации, а ватные пробки с тех пор вошли в обиход бактериологических лабораторий.

К сожалению, упомянутые опыты нередко кончались неудачей: в простерилизованной жидкости прорастали уцелевшие бактериальные споры, в частности, споры сенной палочки (которая как раз и получила свое название от того материала, из которого готовились настои). Поэтому дискуссии не прекращались.



Луи Пастер (1822—1895)

Чтобы положить им конец, Французская академия наук в 1860 г. объявила о присуждении крупной премии тому, кто докажет или опровергнет самопроизвольное зарождение. На призыв откликнулся ряд ученых, в том числе Л. Пастер. Его противниками выступили сторонники самозарождения — Пуше, Жоли и др. В ходе жаркой дискуссии противникам пришлось разработать много новых технических приемов, принятых на вооружение микробиологическими лабораториями, в частности, методику

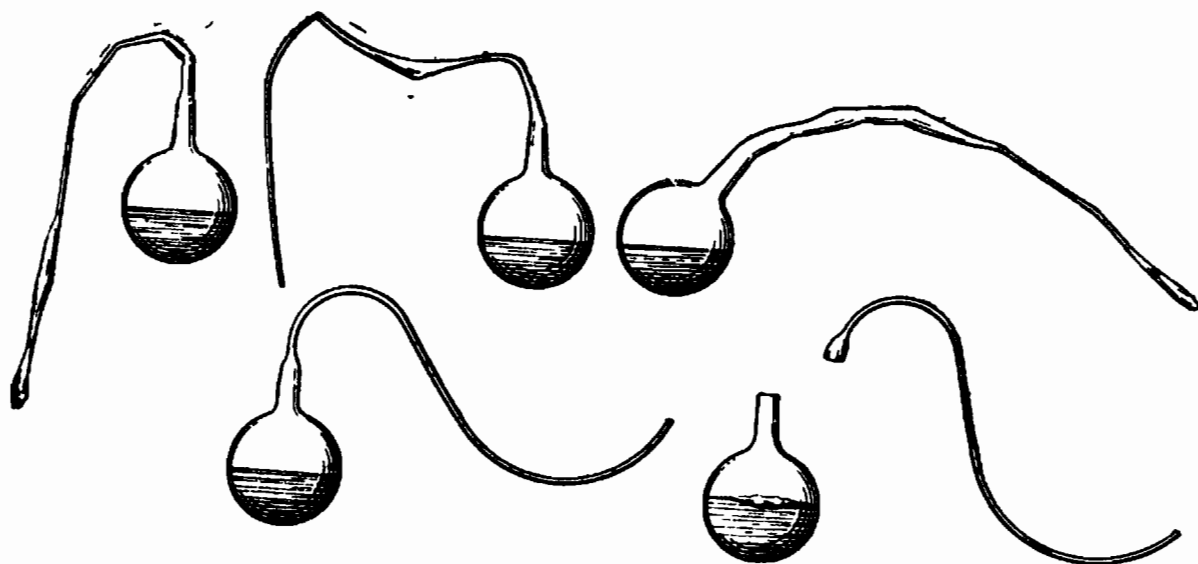


Рис 2 Колбы Пастера. В колбе с отломанным капилляром выросла микробная пленка, остальные остались стерильными

стерильного взятия проб воздуха в запаянные и эвакуированные стеклянные баллоны. Особенно убедительными по своей простоте и остроумию были следующие опыты Пастера. Он кипятил органический настой в стеклянной колбе, горлышко которой затем вытягивалось в тонкий изогнутый капилляр (рис. 2). Микробные клетки, которые находились в воздухе, поступавшем в колбу во время ее охлаждения, прилипали к влажным стенкам капилляра и внутрь не попадали. Но стоило только отломать кусочек капилляра и бросить его внутрь колбы, как там начинали бурно развиваться микроорганизмы. Этим самым было доказано, что ни жидкость, ни воздух не утратили свойства поддерживать жизнь. Пастер вышел победителем, и премия была присуждена ему.

В конце XIX века снова появились сторонники самопроизвольного зарождения в лице Бастиана, Фреми и Трекюля. Но Пастер и на этот раз сумел доказать ошибочность их взглядов, показав, в частности, что асептически взятая стерильная жидкость (например, кровь) не загнивает, если даже ее не подвергать нагреванию.



С И Виноградский (1856—1953)

Исследования Пастера, доказавшие возможность избавляться от всех нежелательных нам микробов, получили огромный практический резонанс. Английский хирург Листер (J. Lister) ввел в употребление антисептики, благодаря чему сразу же резко сократилось количество воспалительных осложнений после операций. Зародилось санитарно-гигиеническое направление в медицине и пищевой промышленности.

Эти исследования послужили также предпосылкой для создания метода чистых культур, ставшего важнейшим оружием микробиологии. Без метода чистых культур было бы невозможно ни углубленное изучение микроорганизмов, ни использование их в промышленности. Наибольшие заслуги в его разработке принадлежат Роберту Коху (R. Koch, 1843—1910) — одному из основоположников современной медицинской микробиологии. Вместе с некоторыми другими авторами в 70—80-х годах прошлого столетия он начал применять плотные среды (картофель, яичный белок, желатину и пр.), на поверхности которых микробные клетки размножались и образовывали изолированные



Д. И. Ивановский (1861—1920)

колонии, что очень облегчало их выделение. Особенно счастливой находкой оказались среды с агар-агаром — полисахаридом из морских водорослей, который ранее применялся лишь для кулинарных целей.

Эти методы стали необходимыми для точного исследования патогенных бактерий.

Несколько позже С. Н. Виноградский (1856—1953) предложил метод селективных культур, а Бейеринк (M. W. Beijerinck) — сходный с ним метод накопительных культур. Создание жестких условий среды, при которых могут размножаться и накапливаться только определенные формы микроорганизмов, облегчает выделение их из смешанных популяций. С помощью этого метода были обнаружены автотрофные бактерии и другие ранее неизвестные группы микробов, что положило начало почвенной и геологической микробиологии.

Пропуская сок больных растений через фильтры, задерживающие бактериальные клетки, Д. И. Ивановский в 1892 г. открыл

фильтрующиеся вирусы. Вскоре после этого Н. Ф. Гамалея и Д'Эррель (D'Herrelle) нашли бактериофаги — вирусы, поражающие бактерии. Но увидеть вирусы удалось лишь после изобретения электронного микроскопа (рис. 3 и 4). Обнаружение всех этих примитивных живых существ, не обладающих клеточной организацией, послужило для некоторых исследователей поводом к тому, чтобы говорить о возможности их самопроизвольного зарождения. Например, совсем еще недавно, в 50-х годах нашего столетия, эту идею развивали некоторые советские исследователи. Однако тщательная проверка их данных неизменно вскрывала методические ошибки, приводящие к неправильным заключениям.

Необходимо заметить, что опыты Пастера доказывали только то, что во всех исследованных случаях микробы не зарождались заново, а проникали откуда-то извне. Они не разрешали вопроса о первичном происхождении жизни на нашей планете, да это и не было их целью. Несмотря на это, в свое время французские клерикалы попытались использовать данные Пастера в качестве подтверждения догмата о сотворении живых существ господом богом. Между тем по справедливому замечанию Тимирязева (1948, стр. 268), «даже в восемнадцатом веке люди искренне верующие были сторонниками произвольного зарождения», приписывая его значительно более сложным организмам — насекомым, лягушкам, грызунам и пр. Следовательно, религия при желании может мирно уживаться с теорией самозарождения. Не поняв уловок клерикалов либеральная пресса той эпохи сочла своим долгом безоговорочно отстаивать самозарождение микроорганизмов, не всегда при этом делая «должное различие между Пастером и его непризванными покровителями, между научным фактом и его эксплуатацией в видах преследования той же науки» (Тимирязев, 1948, стр. 269). Это ошибочное мнение разделяли и некоторые советские исследователи.

Не за горами уже то время, когда удастся, наконец, искусственно синтезировать белки, наделенные некоторыми свойствами живого.

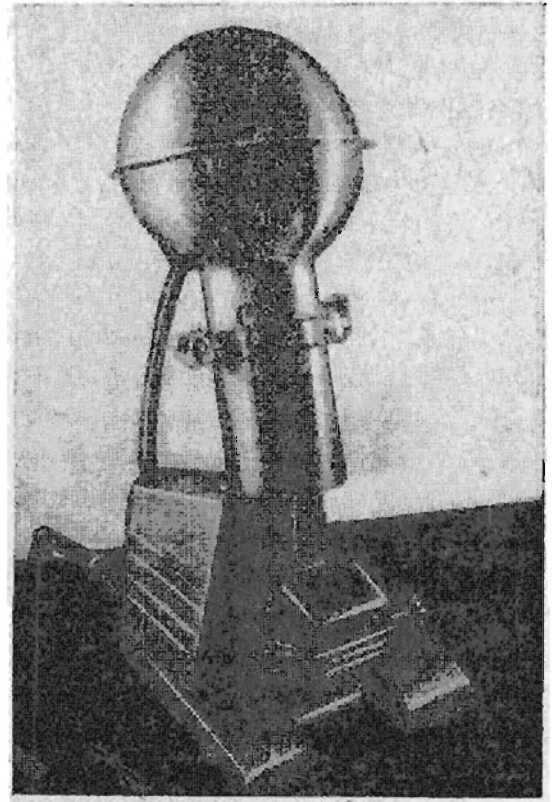


Рис 3. Настольный электронный микроскоп (США)

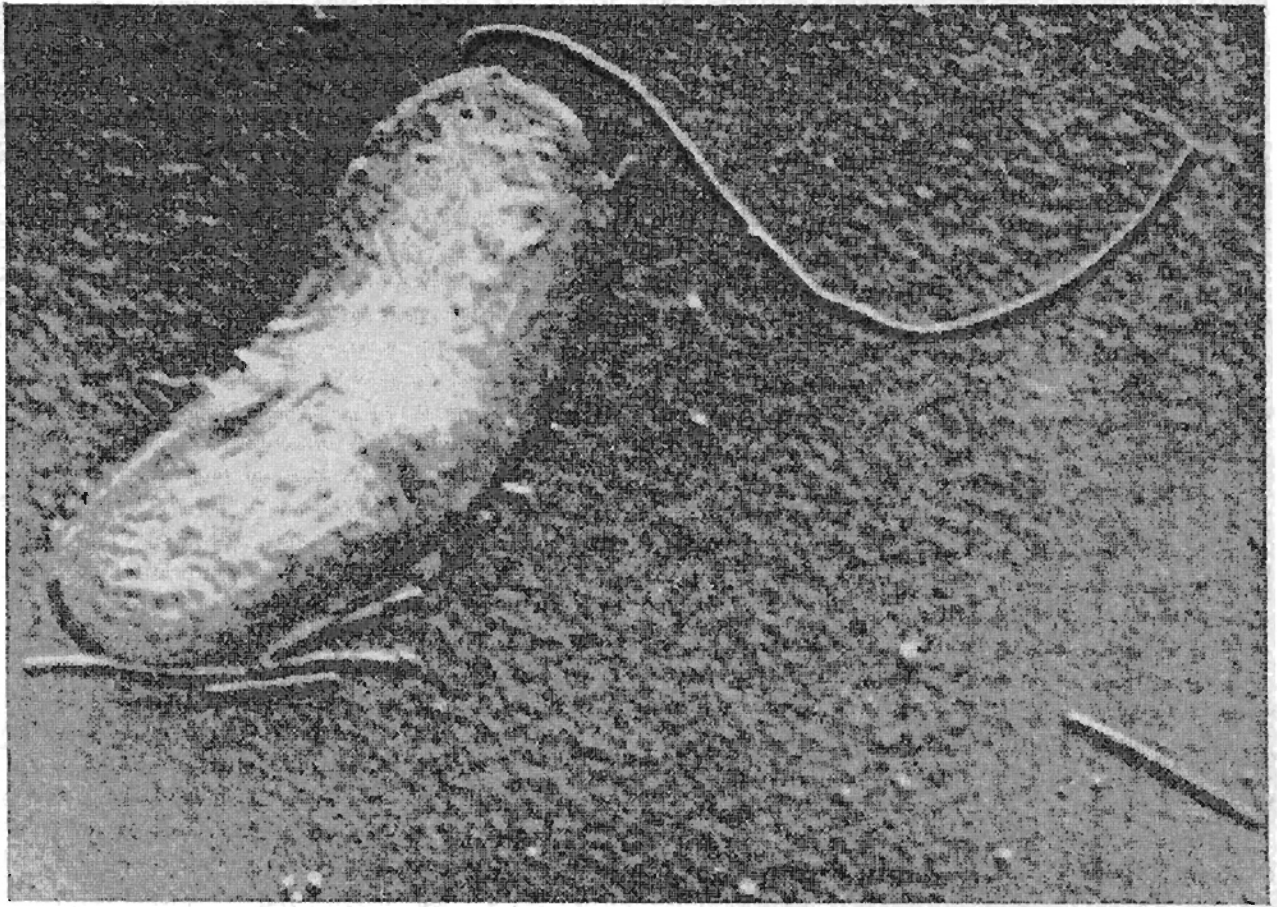


Рис 4 Бактериальная клетка со жгутиком и случайно прилипшие к ней частицы растительного вируса. Электронный микроскоп, $\times 22\ 000$.
Фото А. Е. Проценко

Для всякого прогрессивного исследователя несомненно также, что примитивные формы жизни когда-то возникли естественным путем из неживой материи, а затем в течение многих миллионов лет развивались дальше и совершенствовались. Но могут ли зародиться эти первобытные, низкоорганизованные существа в современную эпоху и не будут ли они тут же уничтожены более совершенными формами жизни густо заселившими нашу планету? Большинство современных биологов считает такой анахронизм невозможным.

Вопрос возникновения жизни хорошо освещен в книге А. И. Опарина (1957), а также в трудах Международного симпозиума, проведенного в Москве в 1957 г. («Возникновение жизни на Земле», 1959). Имеются веские данные, подкрепленные экспериментально, в пользу того, что органические вещества типа углеводов существовали задолго до появления жизни. Под влиянием ультрафиолетового освещения и электрических разрядов они вступали в реакцию с аммиаком, сернистыми и др. соединениями, образуя аминокислоты. Из последних в дальнейшем таким же естественным путем могли синтезироваться полипептиды и белки.

В воде, насыщенной органическими веществами, со временем образовались «коацерваты», т. е. капельки, содержащие внутри высокомолекулярные соединения и окруженные полупроницаемой перепонкой, через которую в них диффундируют снаружи органические вещества, вызывая увеличение объема — рост коацерватов. Все это явилось предпосылкой для появления простейших живых существ, обладающих свойством питаться, расти и размножаться путем деления.

Вопрос о путях возникновения жизни приобрел теперь особый интерес в связи с космическими исследованиями. Надо думать, что жизнь возникла сама собой на всех тех планетах, где сложились подходящие для этого условия. Но похоже ли живое население других планет на обитателей нашей Земли? И возможны ли вообще организмы, способные жить в тех условиях, которые имеются, например, на поверхности Марса?

В связи с этим в настоящее время усилилась работа по исследованию микробного населения нашей собственной планеты. Оказалось, что в суровых природных условиях (как например, почвы пустынь) существуют очень неприхотливые микроорганизмы, способные переносить разреженную атмосферу, пониженную влажность и резкую смену температур, подобные марсианским. Видимо, мы еще мало знаем всех своих микроскопических соседей на Земле. А неприхотливость некоторых из них поистине изумительна. Что можно сказать, например, о тионовых бактериях, развивающихся в 5%-ном растворе медного купороса и таком же растворе серной кислоты; или о десульфурierenden бактериях, для которых питательным веществом служит углекислота, а источником жизненной энергии — процесс окисления газообразного водорода сульфатом?

Дискуссии о ферментах

Группа алхимиков XV века, выступавшая под псевдонимом «Базилиус Валентинус», рассматривала брожение виноградного сока как таинственный процесс самоочищения вина. В результате брожения в жидкости накапливается «душа вина» — *spiritus vini* (отсюда произошло вполне материальное название «винный спирт»), на дно же выпадает ненужный отброс, фекалии — *faeces vini*. Алхимики и не подозревали, что этот осадок винных фекалий был не что иное, как сами дрожжи — основной возбудитель всего процесса.

Упомянувшийся выше алхимик Ван-Гельмонт позднее заметил, что осадок вина может вызвать брожение, если его перенести в свежий виноградный сок. Он назвал этот осадок «ферментом». Фермент в его понимании был каким-то неопределенным действующим началом, способным вызвать самые разнообразные превращения, но отнюдь не живым существом.

Такие превратные представления не должны нас удивлять, так как в ту эпоху микробы еще не были обнаружены. Но и после их открытия потребовалось более сотни лет, прежде чем в 30-х годах XIX столетия Каньяр-де-Латур, Шванн и Кютцинг пришли к убеждению, что спиртовое и уксусное брожения вызываются живыми одноклеточными существами — дрожжами и уксусными

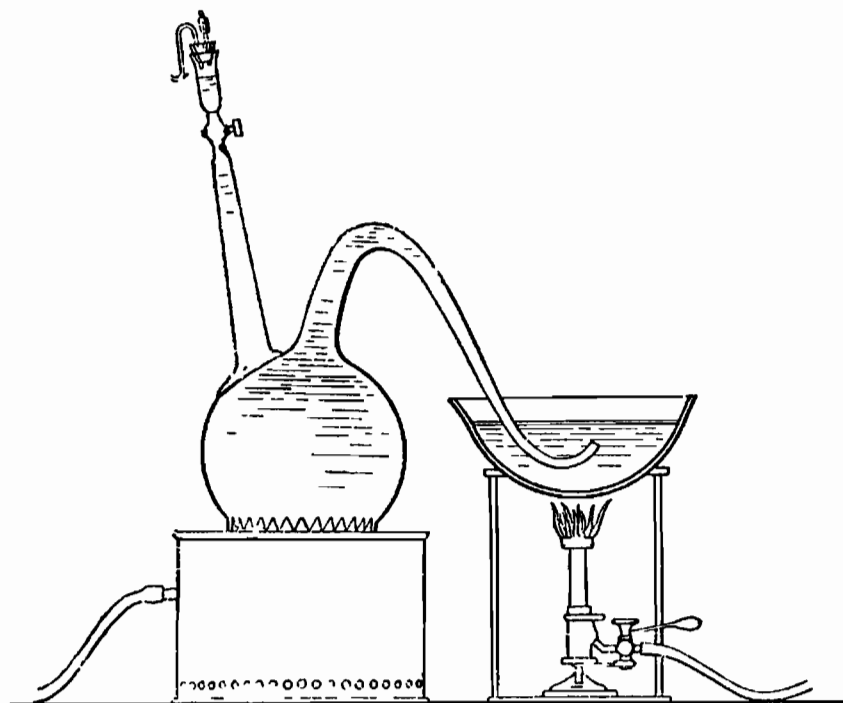


Рис 5 Прибор Пастера для исследования брожений

бактериями. Вскоре затем Давен указал, что причиной сибирской язвы являются микроскопические живые существа, обнаруживаемые в крови больных животных.

Эти выступления были встречены недоверчиво и даже насмешливо. В ту эпоху начала быстро развиваться органическая химия. Незадолго до того Вёлер синтезировал мочевины, впервые тем самым доказав возможность искусственного получения органических веществ. Это произвело огромное впечатление, поскольку раньше считалось, что такие вещества могут образовываться только в живых организмах. Неудивительно, что симпатии большинства ученых склонялись на сторону химической теории брожения, развиваемой Берцелиусом и Либихом. Согласно этой теории, причиной брожения служат неживые вещества — ферменты, которые, распадаясь, вызывают разложение сахара и других субстратов. Микробам же отводилась только роль паразитов, обитающих в вине и уксусе.

Будучи по образованию химиком, Пастер тем не менее стал горячим сторонником биологической природы брожений и различных болезней. Хорошо известны его многолетние споры с Ли-

бихом по данному вопросу. Борьба Пастера за «биологические права» микробов началась с вышеупомянутых исследований по проблеме самопроизвольного зарождения, которыми он показал, что современные микроорганизмы не являются какими-то безродными существами, внезапно возникающими из гниющих субстратов, а наравне со всеми другими организмами имеют своих предков и свою историю.

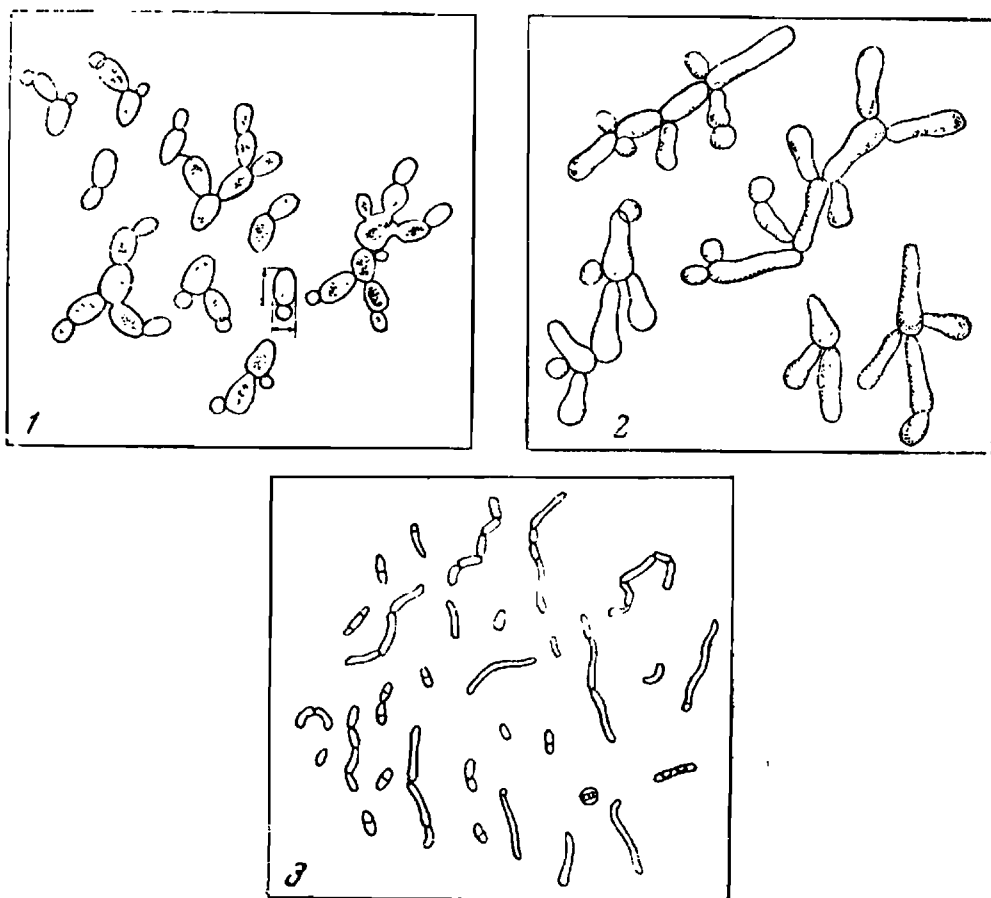


Рис. 6—8. Зарисовки Пастера бродящих дрожжей (1), аэробных дрожжей (2) и маслянокислых бактерий (3)

Еще больше усилий приложил Пастер для доказательства того, что истинными виновниками бродильных процессов являются живые клетки микроорганизмов. Разнообразными экспериментами он убедительно доказал ведущую роль микроорганизмов в молочнокислом брожении, в окислении спирта до уксусной кислоты, в превращении сахара в спирт и другие продукты (рис. 5). «Брожение — это жизнь без воздуха», — говорил Пастер (1937). Дрожжи и плесневые грибы переключаются с дыхания на брожение при недостатке кислорода, а возбудители маслянокислого брожения, впервые им открытые, вообще не способны развиваться в аэробных условиях (рис. 6—8).

Не в меньшей степени прославил свое имя Пастер исследованиями над патогенными микробами. Он не только установил, что инфекционные процессы являются результатом жизнедеятельности

тельности соответствующих микроорганизмов, но и разработал теорию и принципы лечебно-профилактических прививок.

В своих работах с бродильными организмами Пастер впервые применил синтетические питательные среды, заложив тем самым основы учения о питании микроорганизмов.

Таким образом, благодаря трудам Пастера слились воедино два самостоятельных потока исследований, один из которых выражался в описании микроскопических существ, а другой — в изучении химии бродильных процессов. Было установлено, что микробы являются причиной многих химических превращений. После этого микробов стали именовать «организованными ферментами» в отличие от известных ранее растворимых ферментов — желудочного сока, диастаза (экстракта солода) и пр.

Дискуссии о ферментах на этом не закончились. Современник Пастера М. Траубе высказал предположение, что истинной причиной брожений является не столько жизнедеятельность самой клетки, сколько содержащиеся в ней специальные вещества — химические ферменты. Против такой возможности Пастер в принципе не возражал. Однако ни он, ни Траубе не сумели выделить из клеток эти ферменты.

Честь открытия такого рода веществ принадлежит братьям Бухнер (E. Buchner, H. Buchner). В 1897 г. им удалось вызвать спиртовое брожение с помощью сока из разрушенных дрожжевых клеток (рис. 9). Успешные опыты по бесклеточному брожению проводили позднее А. Н. Лебедев, Л. А. Иванов и другие исследователи. Выделяемые из клеток растворимые ферменты было предложено называть «энзимами». В настоящее время названия «ферменты» и «энзимы» употребляются как синонимы, термин же «организованные ферменты» применительно к микробам не употребляется.

Открытие бесклеточного брожения дало повод некоторым авторам говорить о торжестве идей Либиха над биологической теорией Пастера. С этим мнением трудно согласиться. Ферменты, если даже их извлечь из клетки, все же остаются не чем иным, как продуктом ее жизнедеятельности. Кроме того, первоначальное предположение, будто бы в бесструктурном клеточном соке

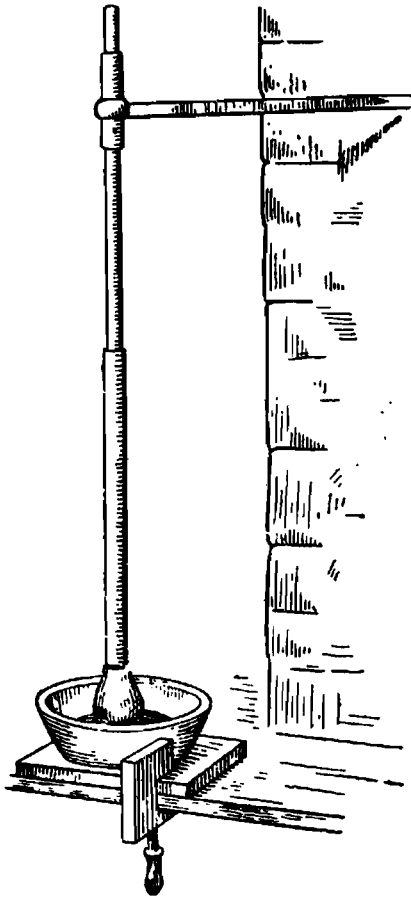


Рис. 9. Ступка Э. Бухнера для растирания дрожжей с трепелом. Диаметр ступки 40 см; вес пестика и железного прута, к которому он прикреплен, — 8 кг. По Buchner E., Buchner H., Nahn M., 1903

может протекать нормальное брожение, оказалось неточным. Против него еще в 30-х годах выступал С. П. Костычев (1930). По его мнению, после разрушения клеток должно происходить нечто подобное тому, что случится на взорванном химическом заводе. Стройный порядок явлений нарушается. В реакцию вступают вещества, которые в организованной клетке не встречаются друг с другом, и образуются продукты, в ней отсутствующие. Вместо биосинтетических процессов бурно разворачиваются процессы распада и посмертного окисления.

Действительно, при работе с бесклеточными препаратами удается обнаруживать «дыхание» у самых строгих анаэробов, для которых при жизни кислород был ядом. Такое чисто химическое поглощение кислорода не имеет ничего общего с физиологическим актом дыхания. Некоторых промежуточных продуктов, найденных в опытах с поврежденными клетками (например, метилглиоксаля), при нормальном брожении не бывает. Бесклеточное брожение не сопровождается биосинтезом веществ протоплазмы, идет вяло и постепенно прекращается.

Необходимо вместе с тем признать, что работа с разрушенными или убитыми клетками позволила расшифровать промежуточные ступени не только брожения, но и многих других биохимических процессов. Указанный метод исследования оказался очень плодотворным. Именно с его помощью и было установлено, что спиртовое брожение вызывается не каким-то одним ферментом, как думали раньше. В брожении участвует не менее 12 различных ферментов, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

Как согласовать эти выводы с первоначальными представлениями, согласно которым брожение может идти в жидком растворе «зимазы» (гипотетического фермента брожения)? Такие неправильные взгляды возникли потому, что получаемый из дрожжей сок, по-видимому, не бесструктурен. В нем сохраняются отдельные клеточные структуры, на которых могут протекать несовместимые между собой химические превращения, катализируемые разными ферментами. Следовательно, бесклеточное брожение — не простая энзиматическая реакция. Скорее оно является примером того, что отдельные части организма могут некоторое время функционировать после его смерти. Случаи переживания органов хорошо известны в биологии.

Для изучения молекулярных и субклеточных основ жизненных процессов в настоящее время охотно прибегают к разрушению (дезинтеграции) клеток с последующим выделением из них отдельных фракций путем центрифугирования (рис. 10). Выделив из клеток рибосомы, можно наблюдать *in vitro* биосинтез белка. Таким же путем исследуются теперь этапы дыхательных процессов, протекающих в митохондриях (рис. 11). Биохимические превращения в изолированных клеточных органоидах вскоре

затухают. Этим они отличаются от процессов, протекающих в живых клетках, интенсивность которых с течением времени не только не ослабевает, но, наоборот, усиливается в связи с нарастанием клеточной биомассы.

Для исследовательских целей пригодны как те, так и другие методы. Изучая нормальную физиологию микроорганизмов, не-

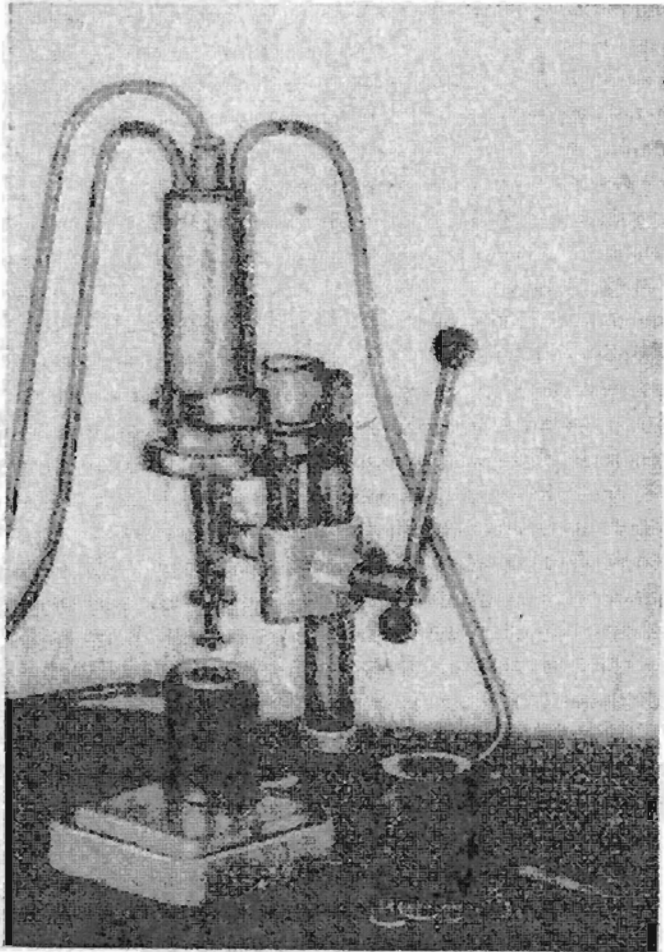


Рис 10 Современный ультразвуковой дезинтегратор непрерывного действия (США)

обходимо работать с неповрежденными клетками. При этом клетки необязательно должны размножаться — можно пользоваться и методом «покоящихся культур». В этом случае берут взвесь вполне жизнеспособных клеток, но делают ее достаточно густой, чтобы иметь возможность быстро определить физиологические отправления клеток, пока их численность и условия среды не успели еще заметно измениться. Чтобы задержать размножение клеток, иногда из среды исключают какой-нибудь компонент, например источник азота. В покоящихся культурах происходит не только распад и окисление веществ, но и усвоение их микроорганизмами. Чем выше жизнеспособность клеток, тем надежнее результаты таких исследований.

Напротив, при изучении отдельных биохимических процессов клетки необходимо разрушить, чтобы извлечь из них соответствующие ферменты. Метод дает тем более четкую картину, чем лучше освобожден исследуемый фермент от всяких балластных веществ. Идеальный случай — это работа с химически чистыми энзимами. Метод применим не только по отношению к индивидуальным ферментам (как например, гидролазы или оксидазы), но и к целым ферментным системам, локализованным на определенных клеточных структурах. О работе с изолированными из клеток рибосомами и митохондриями упоминалось выше.

Наименее убедительны данные опытов, в которых довольствуются тем, что повреждают клетки ядовитыми веществами,

ацетоном, высушиванием и другими неблагоприятными воздействиями. В таких поврежденных клетках одновременно протекают многочисленные биохимические превращения, что мешает составить правильное представление об интересующем исследователя индивидуальном процессе. Трудно при этом судить и о нормальной физиологии клетки, так как ее обмен веществ искажа-

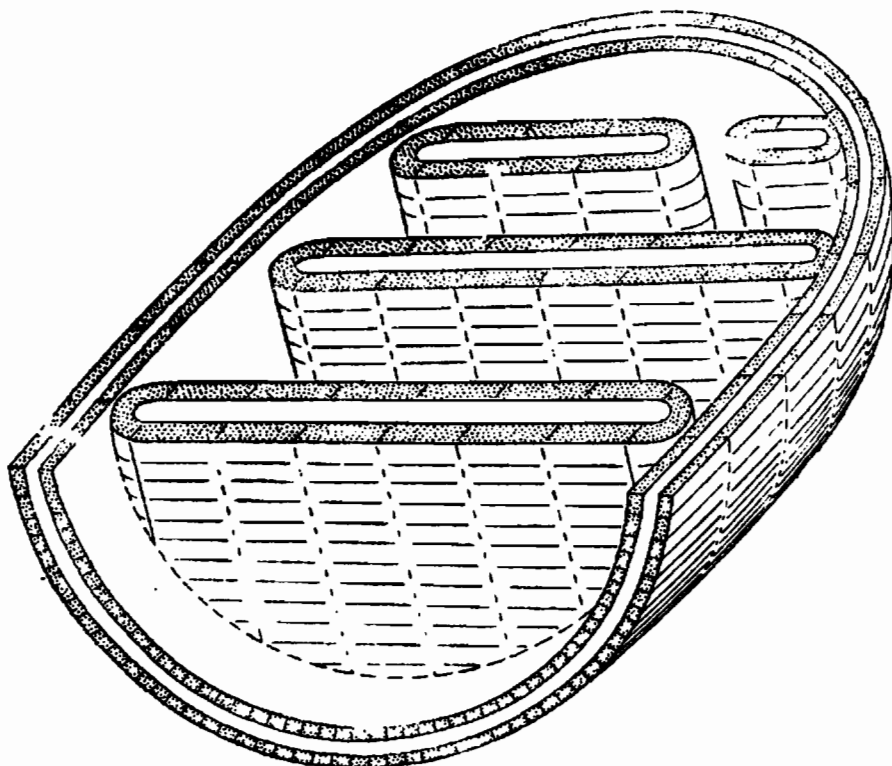


Рис. 11. Схема строения митохондрии (в разрезе). Показана трехслойная оболочка и внутренние перегородки, на которых расположены определенные ферментные системы

ется и возникают всякого рода физиологические артефакты. На возможность ошибок, связанных с этим методом, неоднократно указывал в своих работах В. Н. Шапошников (1939, 1948, 1960 и др.).

Строение клеток

Процесс разложения сахара при спиртовом брожении складывается из 13 последовательных этапов. Чтобы молекула сахара могла окислиться до углекислоты и воды, должно быть пройдено еще большее число промежуточных ступеней. Особенно же сложны те превращения, в итоге которых синтезируются компоненты протоплазмы—белки, нуклеиновые кислоты, липоиды и пр. Из сказанного следует, что в живой клетке должны одновременно протекать самые разнообразные и притом многоэтапные

процессы: окисление и восстановление, синтез и распад, перенос метильных радикалов, фосфорилирование, гидролиз и т. п. Пространственная разобщенность и ступенчатый характер таких биохимических превращений обеспечиваются организацией, присущей клетке.

В бесструктурных растворах жизнь невозможна — в них могут иметь место только простейшие enzymатические реакции.

В связи с этим следует вкратце упомянуть о роли органоидов клетки в ее обмене веществ и питании.

На рис. 12 показана схема строения клетки. Снаружи клетка окружена оболочкой (или стенкой), защищающей ее от неблагоприятных внешних воздействий. Нередко эта стенка бывает ослизнена и сильно утолщена. Слизистые капсулы, окружающие клетки некоторых бактерий, достигают огромной величины и намного превосходят по весу сами бактерии. Большие капсулы образуют некоторые укусуные бактерии (например, *Acetobacter xylinum*), а также *Leuconostoc mesenteroides* — микроорганизм, развивающийся на сахарных заводах, под влиянием которого сахарный раствор нередко превращается целиком в слизистую массу.

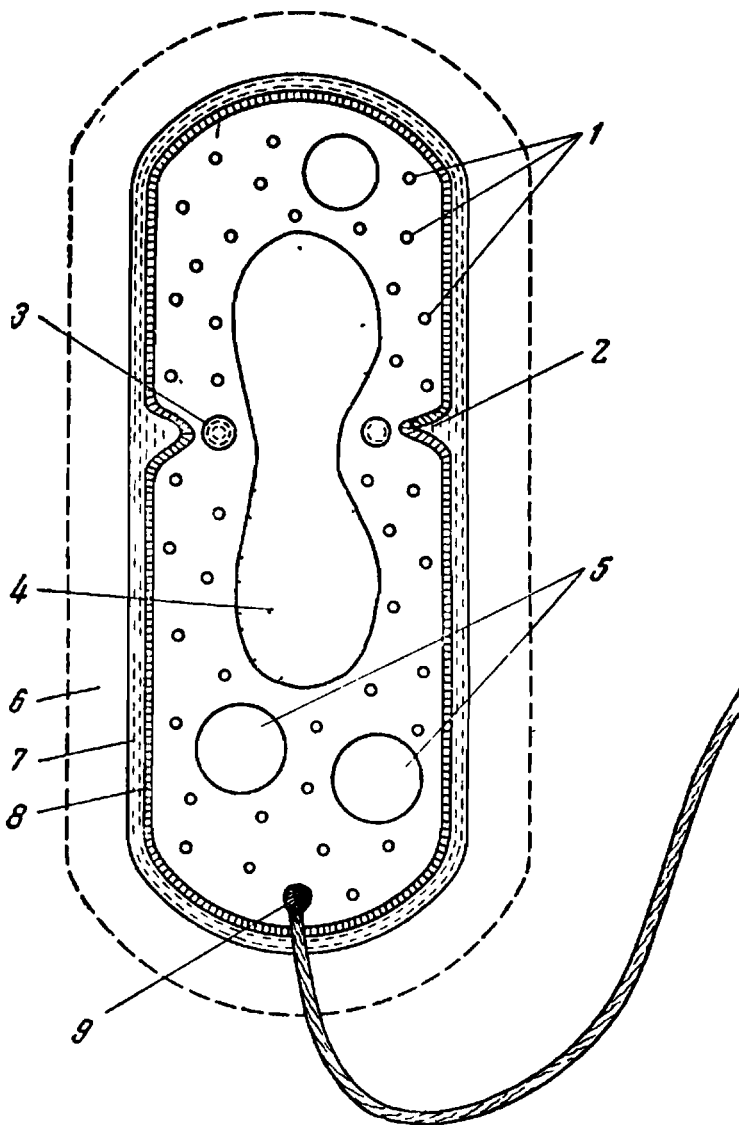


Рис. 12. Схема строения бактериальной клетки

1 — рибосомы; 2 — начавшееся образование поперечной перегородки; 3 — периферийные тельца; 4 — нуклеоид; 5 — запасные отложения; 6 — слизистая капсула; 7 — стенка клетки; 8 — внутренняя оболочка (мембрана); 9 — жгутик, от которого начинается жгутик

Под оболочкой расположена протоплазма, покрытая тонкой перепонкой (мембраной), регулирующей проницаемость, т. е. поглощение клеткой одних веществ и задержку других. Мембрана содержит в себе большое количество жироподобных (липидных) веществ.

В протоплазме клеток находится много разных включений. Некоторые из них представляют собой отложения запасных ве-

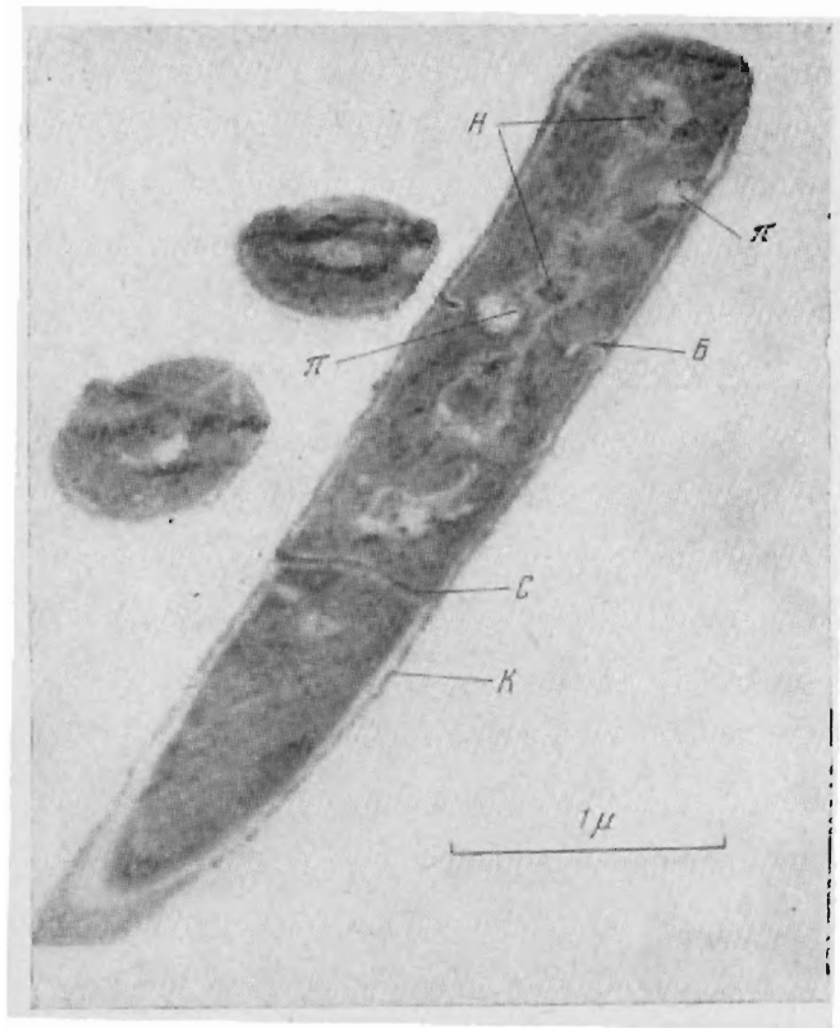


Рис 13 Ультратонкий срез клеток *Bac. cereus* (электронный микроскоп).

Н — нуклеоиды, *П* — периферийные тельца, *Б* — начало образования и *С* — образовавшаяся поперечная перегородка, *К* — клеточная стенка (По Шарпан и Hillier, 1953)

ществ. Таковы, например, отложения гликогена, жира, волютина и пр. В протоплазме анаэробных бацилл перед спорообразованием накапливается близкий к крахмалу полисахарид — гранулёза. В клетках серобактерий можно наблюдать капельки серы. У фотосинтезирующих организмов встречаются кристаллики щавелевокислого кальция. Бывают и другие отложения, в том числе белковые.

Другие внутриклеточные включения представляют собой органоиды, активно участвующие в обмене веществ. В частности, в протоплазме рассеяно множество мелких зернышек, богатых рибонуклеиновой кислотой (РНК). Их называют рибосомами. Рибосомы являются тем основным местом, где происходит биосинтез белков.

Некоторые органоиды служат местом для осуществления энергетических процессов. К ним относятся митохондрии живот-

ной клетки и хондриосомы в клетках микробов. Дыхательные процессы, равно как и анаэробный бродильный распад веществ, происходят главным образом в этих включениях.

В клетках растений имеются пластиды — те органоиды, где протекает фотосинтез. В них содержится хлорофилл. У зеленых бактерий хлорофилл распределен диффузно.

Клетки высших растений, дрожжей, протистов и других организмов имеют внутри вакуоли, заполненные раствором разных веществ. У бактерий и актино-



Рис 14 Клетка, выдавленная из оболочки со жгутиками, $\times 10\ 000$ (электронный микроскоп)

мицетов они, как правило, отсутствуют. Вакуоли представляют собой нечто вроде склада полуфабрикатов. В них временно собираются промежуточные продукты обмена веществ, которые затем снова уходят в протоплазму, где подвергаются дальнейшим превращениям. Когда обмен веществ затухает, вакуоли увеличиваются в размерах и в них накапливается много веществ, оставшихся непереработанными. Например, вакуоли покоящихся клеток дрожжей содержат в изобилии волютин — сложное запасное вещество, включающее в себя азот и фосфор. Большие зерна волютина выпадают в стареющих клетках молочнокислых, дифтерийных и некоторых других бактерий.

Важнейшим органоидом клетки является ядро — основной носитель наследственных свойств, особенно при половом способе размножения (при вегетативном размножении клеток, путем деления или почкования, многие свойства передаются потомству через цитоплазму). Принято считать, что содержащиеся в ядре дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) определяют специфику строения рибонуклеотидов, которые в свою очередь служат «матрицей» для тех или иных белковых молекул, синтезируемых в рибосомах.

Настоящее дифференцированное ядро, обладающее хромосомами и претерпевающее при делении сложный цикл превращений (кариокинез, митоз), присутствует только в клетках более высокоорганизованных организмов. Дрожжи имеют дифференцированное ядро, однако оно делится амитотически. Клетки плесневых грибов многоядерны. Вопрос о ядре у бактерий и актиномицетов

продолжает вызывать разногласия. Некоторые авторы приписывают ядрам бактерий карпокинетическое деление. Напротив, другие исследователи вообще отрицают у бактерий наличие дифференцированного ядра; по их мнению, ядерное вещество в бактериальной клетке находится в расплывчатом (диффузном) состоянии. Большинство современных бактериологов занимает промежуточную позицию. Они



Рис 15 Ультратонкий срез спорообразующей клетки *Bac cereus* (электронный микроскоп) По Чапман, 1950

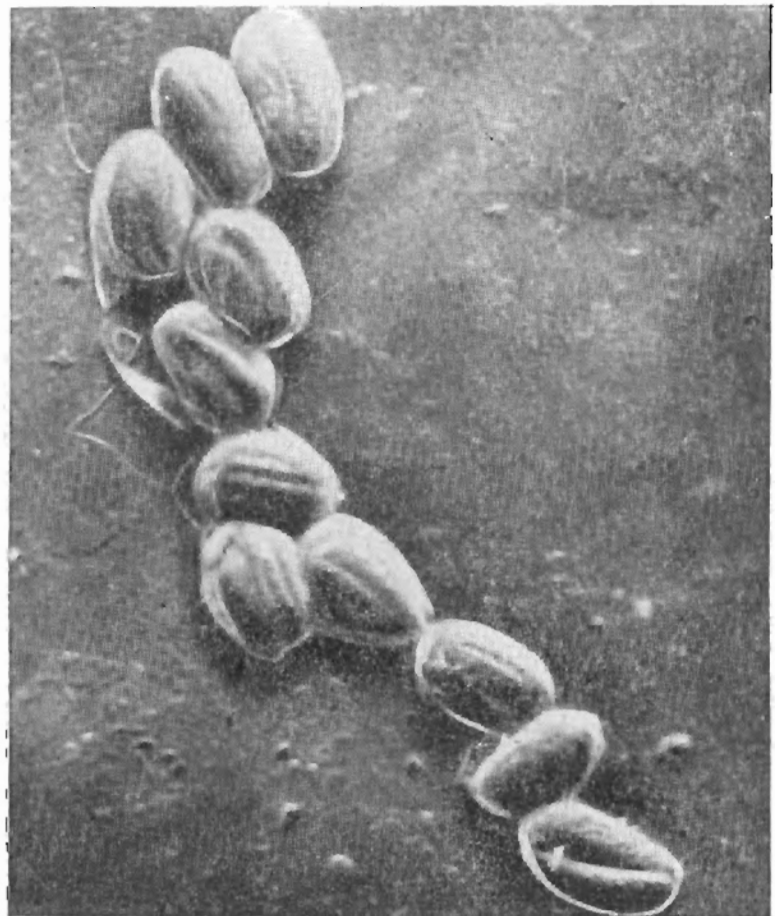


Рис 16 Электронномикроскопический снимок спор *B licheniformis*, $\times 10\,000$. По Bradley и Williams, 1957

полагают, что у бактерий есть обособленная ядерная вакуоля (или несколько ядерных вакуолей), где сосредоточена ДНК. Эти ядерные вакуоли являются только физиологическими аналогами ядра. Устросты они очень просто, не имеют постоянных структур и делятся путем простого перешнуровывания — амитотически. В качестве иллюстрации строения бактериальной клетки на рис. 13—16 показаны электронографии ультратонкого среза клетки, ее оболочки и спор.

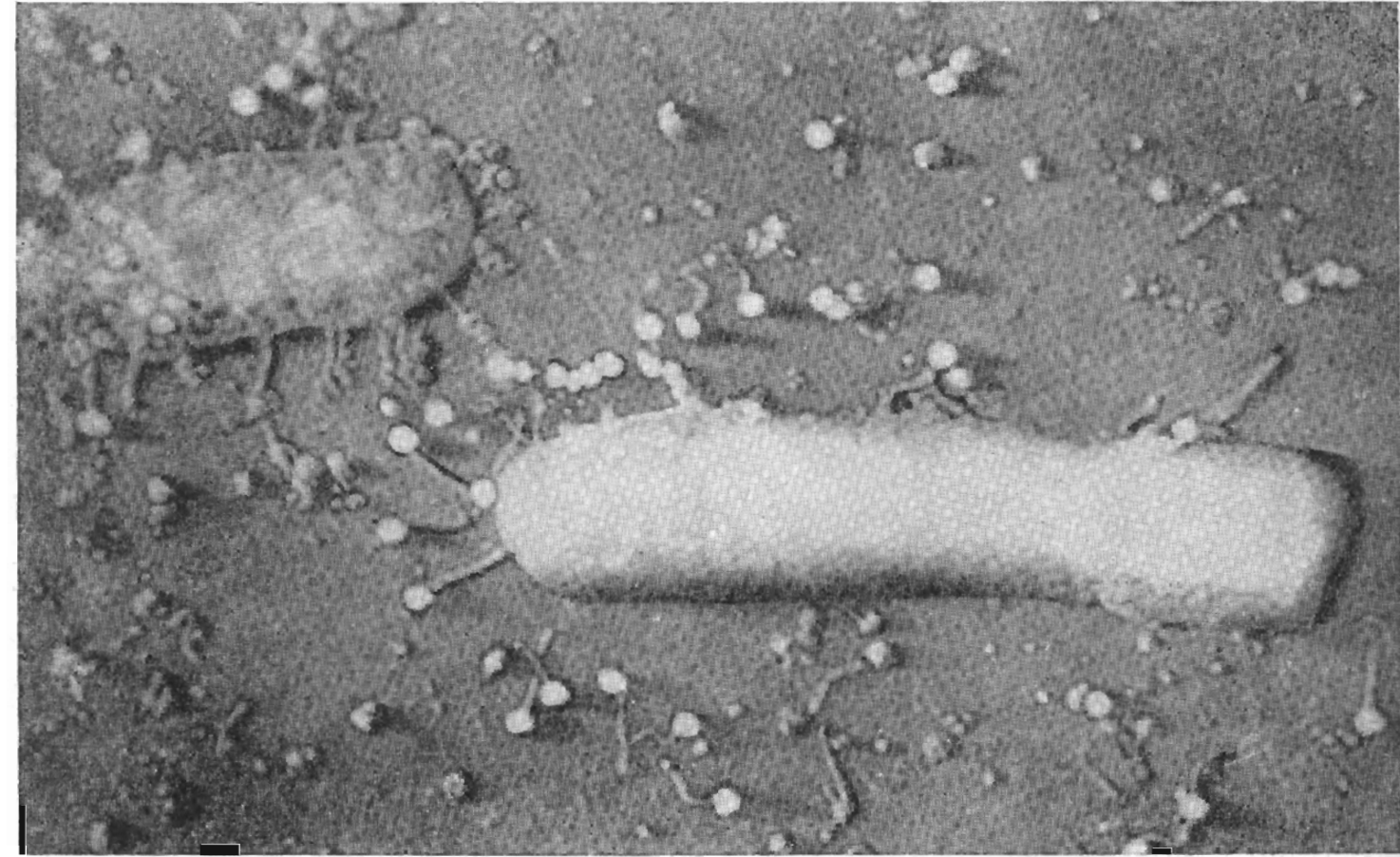


Рис. 18. Бактериальная клетка, разрушенная фагами (электронный микроскоп). По Пенсо, сборник «Онтогенез вирусов», 1955

Рис. 17. Бактерии, пораженные фагом. К одной клетке фаги начали прикрепляться своими «хвостами», вторая клетка уже заполнена фаговыми частицами (электронный микроскоп). По Пенсо, сборник «Онтогенез вирусов», 1956

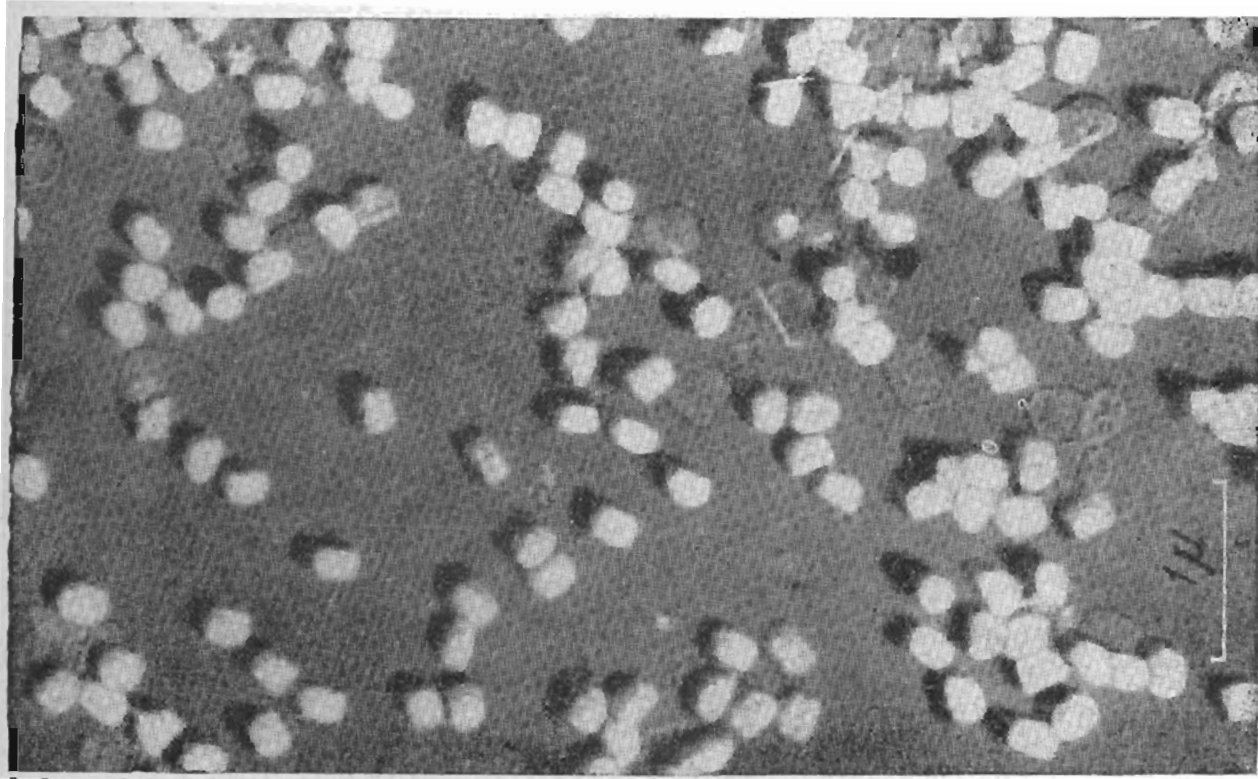


Рис. 19. Частицы вируса оспы кролика. $\times 17\ 000$.
Электронномикроскопический снимок
по Zwartouw и др., 1962

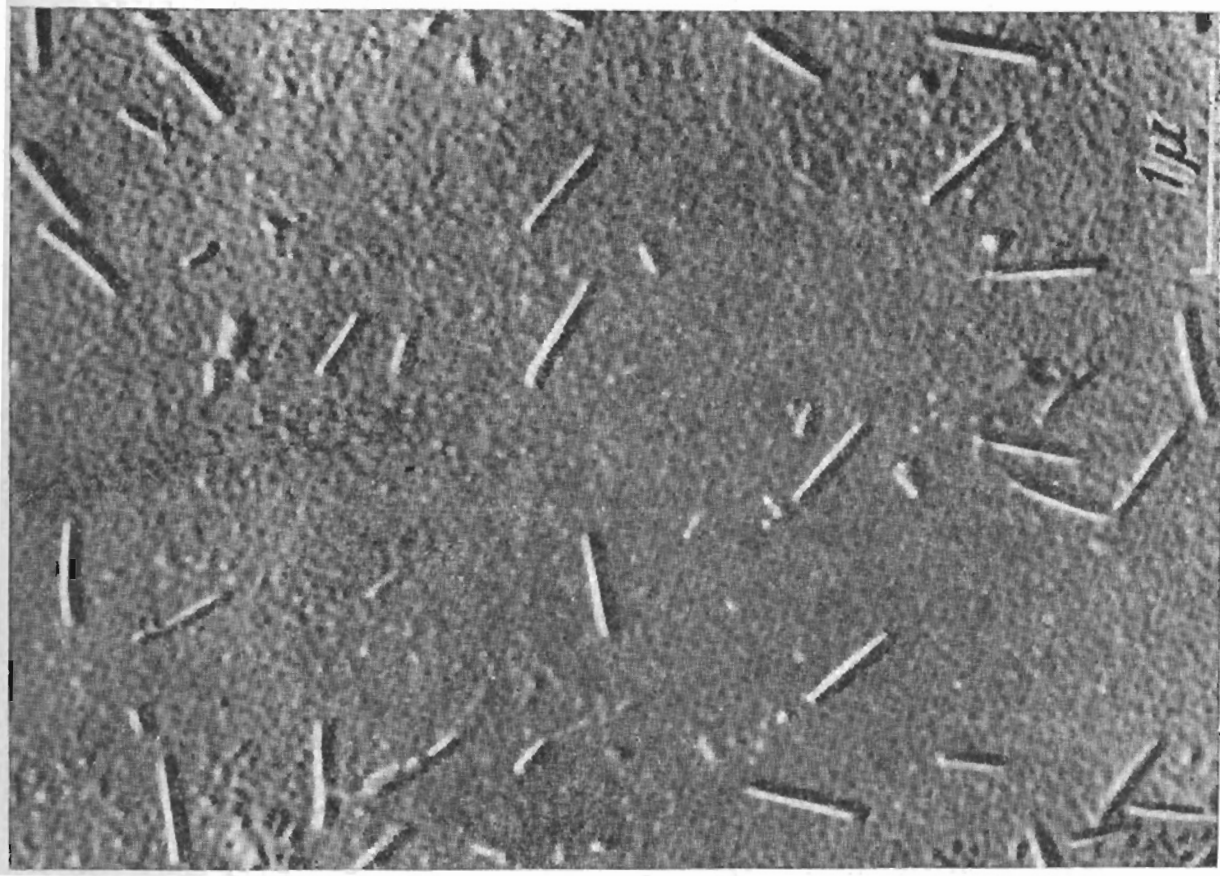


Рис. 20. Частицы вируса белой огуречной мозаики,
 $\times 20\ 000$. Электронномикроскопический препарат
А. Е. Проценко

Проще всего построены частицы вирусов и фагов. Правда, бактериофаги и актинофаги обладают известной структурой. Обычно они состоят из круглой или продолговатой головки с прямым тонким выростом с одной стороны. Этим «хвостом» фаги присоединяются к микробной клетке. Затем по нему, как по тонкому каналцу, содержимое головки фага переходит внутрь клетки (рис. 17 и 18).

Определенной структурой наделены также риккетсии и вирусы животных (рис. 19). Довольно сложны они и по своему химическому составу. Несмотря на это, фаговые и вирусные частицы трудно признать за настоящую клетку.

Некоторые вирусы насекомых (например, вирус желтухи шелкопряда) и все вирусы растений устроены еще проще. При рассмотрении в электронный микроскоп они представляют собой продолговатые палочки (рис. 20). Эти палочки состоят из цепочки РНК, одетой снаружи белком. Следовательно, простейшие вирусы лишены даже столь важного атрибута клетки, как ядерная нуклеиновая кислота (ДНК). Вопрос о природе таких простейших вирусов остается дискуссионным. В то время как одни авторы считают их за элементарные живые существа, другие видят в них неживые образования — продукт жизнедеятельности клеток высших организмов, в которых они обитают.

Признаки и особенности живого

Выше нам уже приходилось касаться некоторых свойств живых организмов, которыми они отличаются от мертвой природы. Вопрос этот крайне важен, и поэтому для лучшего понимания обмена веществ на нем следует остановиться более подробно.

Развитие биологических наук, особенно физиологии, позволило во второй половине прошлого столетия сформулировать некоторые основные особенности живых существ. К. А. Тимирязев в 1870 г. писал: «Основное свойство, характеризующее организмы, отличающее их от неорганизмов, заключается в постоянном деятельном обмене между их веществом и веществом окружающей среды» (1948, стр. 334). Подобного рода высказывания можно также найти у Сеченова, Клода Бернара и других естествоиспытателей того времени. Однако непревзойденные по четкости формулировки характерных черт жизни, бесспорно, принадлежат Ф. Энгельсу. По его словам, «жизнь — это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является *постоянный обмен веществ с окружающей их внешней природой*, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь» (1953а, стр. 244).

В этом определении содержатся сразу три признака живого: во-первых, связь жизни с наличием белка; во-вторых, указание на свойственный живым телам обмен веществ; в-третьих, то, что обмен веществ является обязательным условием их существования.

С того времени, когда были написаны эти слова, прошло немало лет, накопилось много новых научных данных. В свете современных знаний следовало бы сказать, что активным носителем жизни являются не простые белки, а протеиды, которые содержат в себе кроме белка еще нуклеиновые кислоты или другие небелковые химические компоненты.

В том, что носителем жизни служат именно белки, нет ничего удивительного. Они чрезвычайно подходят для этого как по химическим, так и физическим своим особенностям. Молекулярный вес белков измеряется десятками и сотнями тысяч. Они дают студенистые, полужидкие растворы. Благодаря коллоидным свойствам протоплазматических белков, в клетках образуются разобщенные между собой структуры, на которых могут одновременно протекать самые различные биохимические превращения. Молекулярное строение белков неисчерпаемо разнообразно. Не только каждый вид живых существ, но и каждый отдельный энзиматический процесс наделен особым белком. Именно это обстоятельство и придает жизненным явлениям свойственную им специфичность и многообразие.

Таковыми же высокомолекулярными полимерами, крайне разнообразными по своему химическому строению, являются нуклеиновые кислоты — вторая группа жизненно важных компонентов протоплазмы.

Возможна ли жизнь в отсутствие белков и нуклеотидов? Обнаружить живое существо, лишенное этих веществ, в условиях нашей планеты до сих пор не удалось. Но никто не может поручиться за то, что происходит на далеких планетах при необычных для нас температурах и химическом составе среды. Не связана ли там жизнь с какими-то иными веществами, столь же высокомолекулярными и разнообразными по составу, как белки? Возможность этого не исключена.

Не всякое белковое тело можно назвать живым. Некоторые белки являются только запасными питательными веществами или же опорно-механическими образованиями (подобно омертвевшим белкам копыт и рогов). Но и биологически полноценные протеиды — это всего лишь субстрат, в котором протекают жизненные процессы. А жизненные процессы в конечном счете сводятся к биохимическим превращениям, составляющим в своей совокупности обмен веществ.

Непрерывный обмен веществ — второй, не менее важный признак живого. Когда он прекращается, останавливается и жизнь. Необходимо, однако, учитывать, что приостановка жиз-

ненного процесса еще неравнозначна смерти. При этом невольно напрашивается сравнение с часами. Если остановить маятник, часы не будут показывать время, однако их можно снова пустить в ход. Другое дело, когда в механизме часов произойдут какие-то поломки и они полностью выйдут из строя.

Нечто подобное наблюдается и у живых организмов. Без некоторых частей своего тела они могут существовать (высшие животные — без отдельных конечностей, клетка — без отложений резервных веществ и т. п.). Другие органы и органоиды обязательны для жизни, например, нервная система у животных или ядерный и рибосомный аппарат у одноклеточных организмов.

Когда по тем или иным причинам прекратится обмен веществ, жизнь остановится, но смерть может наступить не сразу. Организм будет находиться между жизнью и смертью до тех пор, пока не произойдет непоправимых разрушений каких-то его компонентов, без которых невозможна жизнь. Только с этого момента смерть окончательно вступает в свои права. Известно, например, что теплокровные животные способны несколько минут пребывать в состоянии «клинической смерти» (имея в виду прекращение сердцебиения и дыхания), после чего их удается оживить. Если такое состояние продлится слишком долго, возникнут необратимые изменения в наиболее чувствительном месте организма — в мозговых клетках. Тогда вернуть его к жизни уже нельзя. Однако отдельные части организма переживут его смерть и сохранят жизнеспособность (например, у трупов некоторое время продолжают расти волосы и ногти).

Сходное явление наблюдается и у одноклеточных существ. Под влиянием вредных воздействий (например, ультрафиолетового облучения) жизнь микробных клеток прекращается — при высеве на агар с питательной средой они не прорастают. Но смерть некоторых клеток оказывается мнимой. Подержав их в условиях голодания, или подвергнув особым воздействиям (выставив, например, после ультрафиолетового облучения на обычный дневной свет), мы сможем вернуть клетки к жизни и заставить их размножаться. Именно поэтому нередко предпочитают говорить не о гибели клеток, а об их «инактивации», и восстановление жизненных функций при особом «лечебном» режиме называют «реактивацией». Этот вопрос интересен не только с познавательной точки зрения, но и крайне важен в практическом отношении. Далеко не безразлично, погибнут ли микробы окончательно или же только покажутся нам мертвыми и при определенных условиях снова проявят свою жизненную активность; последнее особенно важно, когда дело касается патогенных бактерий.

Наблюдая за жизнедеятельностью клеток, подвергнутых рентгеновскому облучению или другим вредным воздействиям, можно заметить, что нарушение их отдельных жизненных от-

правлений происходит в определенной последовательности (рис. 21). Прежде всего клетки теряют способность осуществлять нормальный цикл развития, т. е. превращаться в покоящиеся споры или половые гаметы.

При более высоких дозах вредных факторов нарушается функция клеточного деления. Клетки увеличиваются в размерах и вытягиваются в длинные нити, лишённые перегородок. Это

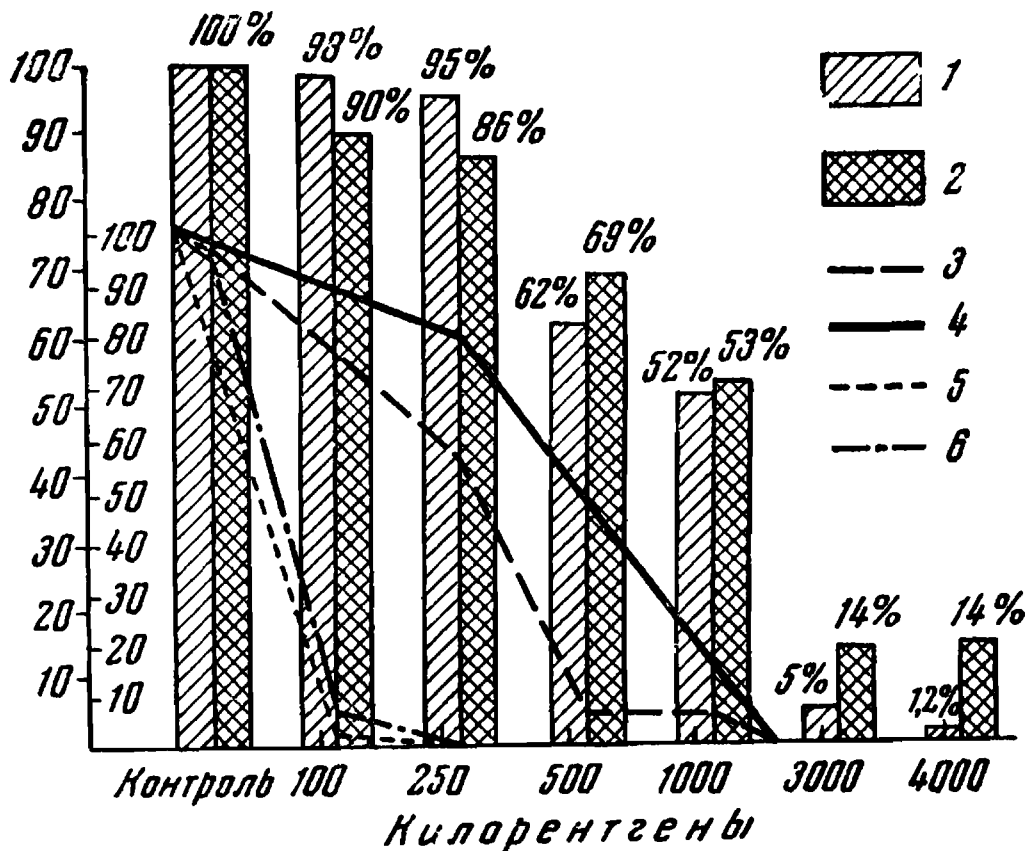


Рис 21. Подавление различных жизненных функций микробной клетки ионизирующими излучениями

1 — поглощение кислорода, 2 — выделение CO₂; 3 — поглощение P³², 4 — поглощение метионина S³⁵, 5 — размножение, 6 — рост

По М. Н. Мейселю, 1955

может происходить как под влиянием облучения, так и под влиянием химических ядов — антибиотиков, антисептиков и пр.

Способность к росту более устойчива. Необходимо значительно усилить воздействия, чтобы прекратить рост клетки. Но и после того, как клетка перестает увеличивать свою биомассу, в ней продолжают идти отдельные физиолого-биохимические процессы: потребление некоторых питательных веществ, выделение углекислоты и пр. Наиболее устойчива дыхательная функция. Поглощение кислорода в аппарате Варбурга наблюдается даже после того, как клетки будут механически разрушены. Впрочем, вряд ли можно называть такое посмертное поглощение кислорода «дыханием», хотя это нередко делают.

Обмен веществ с окружающей природой происходит и в неживых телах. Не только такие органические материалы, как бумага или древесина, но даже гранитные скалы реагируют на внешние воздействия, разрушаясь под влиянием влаги, кислорода и других химических факторов. Имеется, однако, глубокое принципиальное различие между биологическим обменом веществ и химическими превращениями, протекающими в неживых телах. Последние тем дольше сохраняются, чем слабее их обмен веществ с окружающей природой, чем лучше они от нее изолированы. Напротив, биологические объекты не могут существовать и развиваться без обмена веществ с внешней средой. Вскоре после того, как питание прекратится, в организме наступают необратимые изменения и он умирает. С этого момента биологический обмен веществ сменяется чисто химическим, который, если его не остановить, приводит к распаду и разрушению. Возьмем в качестве примера растения. Чтобы уберечь их от гибели, нужно поддерживать в них постоянный обмен веществ, снабжая растения водой и питательными солями. Но для сохранения убитых растений необходимо, наоборот, затормозить идущие в них химические реакции, удалив из растений влагу. Именно так и поступают, в частности, при изготовлении гербария или при сушке сена.

Таковы три важнейших признака живых организмов: 1) наличие белков (точнее говоря, протеидов); 2) непрерывный обмен веществ с окружающей средой; 3) значение этого обмена в качестве обязательного условия существования.

Можно указать и на ряд других их свойств, связанных с только что описанными. Особенно важно подчеркнуть самостоятельный ход жизненных процессов. По этому поводу Энгельс (1953б, стр. 77—78) писал, что живое белковое тело развивается и изменяется, «не вследствие какого-либо процесса, которому оно подвергается извне, как это бывает и с мертвыми телами. Напротив, жизнь, обмен веществ, происходящий путем питания и выделения, есть самосовершающийся процесс, присущий, прирожденный своему носителю — белку...». «Механическая, физическая реакция... исчерпывает себя с каждым актом реакции. Химическая реакция изменяет состав реагирующего тела и возобновляется лишь тогда, когда прибавляется новое количество его. Только *органическое* тело реагирует *самостоятельно*... притекающая пища действует лишь после того, как она ассимилирована, а не непосредственным образом, как на низших ступенях... новая реакция должна быть *опосредствована* им» (Энгельс, 1953а, стр. 238).

Действительно, в результате химических реакций количество исходных веществ уменьшается, а количество продуктов возрастает. Это относится и к самоускоряющимся цепным реакциям, масштабы которых с течением времени увеличиваются. Автока-

талитический характер имеют, например, процессы распада взрывчатых веществ или атомные реакции. Но все они в конечном счете приводят к полному разрушению исходных материалов.

Жизненные процессы напоминают собой цепные реакции. Если в питательную среду засеять несколько бактериальных клеток, то каждые 30—60 минут их количество будет удваиваться, и, следовательно, с течением времени суммарный прирост клеток за единицу времени будет увеличиваться в геометрической прогрессии. Мы видим такое же автокаталитическое ускорение процесса, как и при взрыве. Однако в результате его клетки не только не исчезнут, но, наоборот, количество их возрастет во много тысяч раз.

Самостоятельный ход жизненных процессов может служить критерием для распознавания причин некоторых явлений. Например, в конце прошлого века было обнаружено явление бактериофагии: взвесь бактериальных клеток неожиданно лизировалась, раствор становился прозрачным. Лизис клеток, казалось бы, мог происходить под влиянием каких-то химических веществ типа ферментов. В таком случае капелька растворившейся культуры, перенесенная в свежую суспензию клеток, оказала бы более слабое литическое действие, а при переносе небольшой части второй культуры в новую клеточную популяцию эффект лизиса должен был бы сойти на нет.

В действительности этого не наблюдалось. Наоборот, перенося капельку лизированной культуры в новую культуру, можно было получить не менее сильный лизис, причем такие последовательные пассажи удавалось повторять сколько угодно раз. Это обстоятельство явно говорило в пользу того, что литический агент увеличивается в количестве, т. е. самовоспроизводится. На этом основании его следовало признать живым.

Беским аргументом в пользу живой природы растительных вирусов является присущая им самостоятельность. Достаточно перенести небольшое количество сока больного растения в лист здорового, чтобы вызвать в нем накопление вируса. Очень важно, что один и тот же вирус (например, вирус табачной мозаики) может поражать растения, принадлежащие не только к разным видам, но даже к разным семействам. Если бы вирус являлся только продуктом жизнедеятельности больного растения, то тогда было бы трудно понять, как может он сохраняться, а тем более накапливаться в неограниченных количествах в клетках других растений, при совсем иных физиолого-биохимических условиях. Отсюда можно сделать вывод, что вирус способен активно сохранять свои специфические особенности при различных условиях среды, т. е. обладает известной самостоятельностью, характерной для живых тел.

В отличие от неживых тел, пассивно подчиняющихся действию внешних сил, живой организм активно реагирует на воздействия среды, опосредствуя их и преобразуя. Клеточная оболочка избирательно пропускает внутрь одни вещества и задерживает другие. В связи с этим, например, концентрация йода в протоплазме некоторых морских водорослей бывает в сотни раз выше, а концентрация кремния значительно ниже, чем в окружающей воде. Клетка обладает своего рода «физиологической буферностью»: при изменении рН, окислительно-восстановительного потенциала или осмотического давления внешней среды, физико-химические условия внутри клетки остаются постоянными или, во всяком случае, изменяются несравненно слабее, чем вне ее. На более сильные воздействия среды клетка отвечает перестройкой своего обмена веществ, направленной на то, чтобы сохранить жизнеспособность при изменившихся условиях. Для иллюстрации сказанного достаточно будет напомнить о способности многих организмов переключаться с дыхания на брожение, об образовании клеткой адаптивных ферментов, об усилении в ней синтеза витаминов и аминокислот в случае недостатка таковых в окружающей жидкости и пр.

Такого рода физиологические перестройки возможны, конечно, только в пределах наследственной нормы реакций, сложившейся у организма в процессе эволюционного приспособления к определенному комплексу окружающих условий. В отсутствие этих условий организм не сможет развиваться: он либо погибнет, либо, в лучшем случае, будет пребывать в покоящемся состоянии (споры бактерий). В этом проявляется еще одна важная особенность живых существ, отличающая их от неживой природы. Мы имеем в виду приспособленность каждого организма к определенной среде обитания или, как иногда говорят,— единство организма и среды. Вряд ли нужно приводить много примеров такого единства — они общеизвестны. В горячих источниках могут существовать только термофильные микроорганизмы, в глубоких слоях почвы, где отсутствует кислород,— анаэробные бактерии, в теле животных и растений — паразитирующие микробы и т. д.

«Организм без внешней среды, поддерживающей его существование, невозможен, поэтому в научное определение организма должна входить и среда, влияющая на него» (Сеченов, 1861).

И наконец, одним из самых характерных свойств живых существ является их целесообразная организация. К мертвым телам понятие целесообразности вообще не применимо. Разве можно искать какой-то скрытый смысл в узорах, образуемых на стеклах замерзшей водой, если даже они напоминают листья растений, или в причудливых очертаниях выветренных скал? Но при изучении формообразовательных и физиологических процессов в организме мы вправе ставить вопрос не только о том, как

и почему они происходят, но и зачем они нужны. Все, что протекает в живых существах, прямо или косвенно направлено к поддержанию их жизни и (что еще важнее) к воспроизведению ими потомства, необходимого для сохранения вида. Целесообразность возникла в итоге эволюционного развития. Она вытекает из самой сущности естественного отбора, который отметал всё менее приспособленное и накапливал полезные свойства. В результате развития, по словам Тимирязева (1948, стр. 345), «...слагаются формы... поразительно прилаженные, приспособленные к их среде и отправлению, представляющие то, что мы называем гармонией, совершенством, целесообразностью. Все отдельные химические и механические процессы как бы направлены к одной определенной цели — к образованию целесообразной формы».

Рассматривая взаимосвязь физико-химических и биологических явлений, Энгельс (1953а, стр. 204) писал: «Физиология есть, разумеется, физика и в особенности химия живого тела, но вместе с тем она перестает быть специально химией...». Действительно, путем сочетания процессов, каждый из которых в отдельности подчиняется физическим или химическим законам, создается нечто качественно новое, что уже не может быть выражено языком физики и химии. В пояснение укажем, что механические свойства строительного материала не предрешают того, будет ли он лежать бесформенной грудой или же превратится в стройное здание, отвечающее определенному назначению. Для того, чтобы судить о художественных достоинствах картины, обязательно знать химический состав красок, которыми она написана. К оценке архитектурных или художественных произведений нужно, очевидно, подходить с совсем иной меркой. То же самое можно сказать по поводу живых организмов: для понимания целесообразного устройства и гармонического взаимодействия частей «живой машины» необходимы не физико-химические, а биологические критерии.

В настоящее время успешно развивается кибернетика — наука об автоматическом управлении различными процессами. Показательно, что эта наука, посвященная целенаправленно работающим автоматам, не может обойтись одними электротехническими понятиями и вынуждена прилагать к машинам термины, заимствованные из биологии: «запоминание», «образ», «обучение машин» и т. д.

Необходимо, однако, заметить, что даже лучшие современные автоматы выглядят пока крайне несовершенными по сравнению не только с мозгом человека, но и с простейшей формой жизни — клеткой. Всякий организм представляет собой систему многочисленных и разнообразных органов, т. е. структурных образований, предназначенных для выполнения определенных функций. Это касается и многоклеточных организмов, и отдель-

ных клеток, которые также наделены своими микроскопическими органоидами. По отношению к внешним воздействиям клетка ведет себя, как самонастраивающаяся машина с изумительно слаженной и гибкой работой. Способность клетки легко отзываться и приспосабливаться к условиям среды дает нам в руки ключ к исследованию ее физиологических потенций, а следовательно, и к их регулированию. Изучение проблемы питания микроорганизмов является первым шагом к разработке принципов управления жизнедеятельностью клетки—к науке, которую можно было бы назвать «кибернетикой клетки».

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КЛЕТОК

Химические элементы

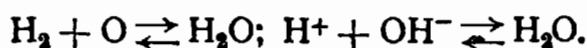
На вопрос о том, из чего состоят микробы, пришлось бы дать несколько странный ответ: они состоят главным образом из воды. Действительно, сухие вещества клетки не превышают 15—25% от общего ее веса. Среди них главное место принадлежит четырем «органогенам» (углероду, азоту, водороду и кислороду) — элементам, которые при сжигании клеток во время анализа улетают в форме газообразных соединений. Остающиеся в виде золы элементы составляют 2—14% к сухому весу клетки. Их принято называть «зольными».

Соотношение отдельных химических элементов может колебаться в довольно заметных пределах в зависимости от систематического положения организма и условий его роста. В среднем углерод составляет 46—50% к сухому весу клетки, кислород — около 30%, азот — 7—14%, водород — 6—8%. Среди зольных элементов на первом месте стоит фосфор, достигающий иногда половины веса всей золы. Вслед за ним идет калий, затем натрий, магний, сера, кальций, хлор и железо. Остальные элементы содержатся в очень малых количествах, и их называют «микрорезидентами». К ним относятся марганец, цинк, молибден, бор, хром, кобальт и многие другие.

Не случайно, что среди элементов, входящих в состав клетки, ведущее место занимает углерод. Атомы углерода отличаются способностью соединяться в чрезвычайно большие комплексы, молекулярный вес которых может достигать нескольких миллионов. Растворы таких высокомолекулярных веществ имеют студенистый, коллоидный характер, что как раз и требуется для протоплазмы с ее тонкими структурами. Углерод химически подвижен — его валентности легко меняют свой знак с положительного на отрицательный и обратно. Число углеродсодержащих веществ почти безгранично по всему разнообразию. Недаром крупнейшая из химических наук — органическая химия — занимается только этими веществами. По своей способности образо-

вывать гигантские полимеры на углерод похож лишь кремний. Поэтому не исключено, что в основе жизни, существующей где-то в далеких мирах, лежат не углеродистые соединения, а соединения кремния или кремний-органические вещества.

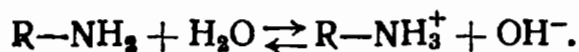
Соединения углеродных атомов являются остовом всех органических веществ — той тканью или канвой, в которую вплетаются другие химические элементы, как бы вышивая на ней узор жизни. Среди этих элементов водород и кислород выступают неразлучной, но враждебной парой. Это — два антагониста, два противоположных начала. Водород — восстановитель, кислород — окислитель. Ион водорода (H^+) придает раствору кислые свойства, кислород в форме гидроксила (OH^-) создает щелочность. В результате взаимодействия этих двух антиподов (при взрыве гремучего газа, при нейтрализации кислот щелочью) образуется вода — одно из самых нейтральных и инертных соединений:



Но скрытые в молекуле воды два противоположных начала могут вновь проявиться, вступив в реакцию с находящимися вокруг них веществами. Именно поэтому вода, как и оба ее компонента, играют столь важную роль в жизненных явлениях.

Название четвертого органогена — азота — в переводе на русский язык означает «безжизненный». Применительно к одному из важнейших для жизни элементов такое название может показаться странным. Но дело в том, что азот с трудом вступает в химические соединения и легко из них опять освобождается. Недаром он всегда содержится в порохе, динамите и других взрывчатых веществах, обуславливая своим присутствием быстрый распад (взрыв) этих веществ. Наличие азота в составе органических веществ повышает их реактивоспособность. Белок, обязательным элементом которого он является, представляет собой одно из самых неустойчивых химических соединений.

В живых клетках азот содержится по преимуществу в восстановленной форме ($-NH_2$, $-NH-$, $=N-$). Амины ведут себя, как щелочи, образуя в процессе диссоциации гидроксильные ионы:



Органические соединения с окисленным азотом обладают токсичностью (например, антибиотик хлоромицетин).

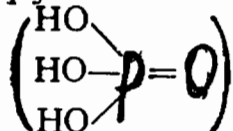
Роль серы в веществах живого тела несколько напоминает роль азота. Она фигурирует там только в восстановленном состоянии ($-SH$, $-S-$, $-S-S-$). Переход сульфгидрильных групп в дисульфидные (и обратно) играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах:



Органические соединения с окисленной сульфо-группой вредно действуют на клетку. К числу их относятся, например, стрептоцид и другие сульфамидные препараты. Но неорганические сульфаты, где атомы серы находятся также в окисленном состоянии, прекрасно усваиваются организмом.

Кислород, водород, азот и сера являются чем-то вроде ближайших соратников углерода — как бы «свитой» этого властителя жизни. Лишь они могут быть связаны с ним непосредственно. Остальные химические элементы присоединяются к углероду только через их посредство.

Среди зольных элементов важная роль принадлежит фосфору. В клетке фосфор находится в виде фосфорной кислоты



соединяясь с другими атомами по типу эфирной

связи, через кислородный мостик (—O—). Он входит в состав важнейших компонентов протоплазмы: нуклеиновых кислот, многих коферментов, фосфолипидов и пр. Некоторые фосфорорганические соединения являются своеобразными аккумуляторами энергии. Возможность вовлечения сахаров и других веществ в биохимические превращения обуславливается тем, что к ним временно присоединяются фосфаты, повышая их энергетический потенциал.

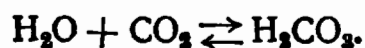
Железо является обязательной частью гемоглобина и геминных ферментов: цитохромов, цитохромоксидазы, пероксидазы, каталазы. Их центральное ядро состоит из четырех пиррольных колец, связанных между собой углеродными мостиками. Такого рода соединения называются порфиринами. Атом железа соединен с атомами азота пирролов посредством обычных и дополнительных химических связей. На рис. 22 дана общая формула порфиринов, где буквами R обозначены те или иные боковые радикалы.

К числу жизненно важных порфиринов принадлежат также хлорофиллы, в том числе бактериохлорофиллы (рис. 23). От других порфиринов они отличаются не только боковыми группами, но и тем, что вместо железа в них находится магний. Наряду с этим магний в качестве кофактора участвует во многих энзиматических реакциях, связанных с фосфорилированием и дефосфорилированием — т. е. с переносом фосфорной кислоты от одних органических соединений к другим.

Третий тип жизненно важных порфиринов — это производные витамина B₁₂, точнее говоря, его коэнзимная форма. Коэнзим, содержащий этот витамин, участвует в переносе одноуглеродных радикалов и синтезе нуклеиновых оснований. Вместо железа или магния в B₁₂ находится кобальт.

Все другие элементы также выполняют вполне определенную роль в обмене веществ. Так, цинк служит кофактором ряда

энзиматических процессов и входит в состав карбоангидразы — фермента, катализирующего реакцию:



Марганец в качестве кофактора участвует в окислительных превращениях некоторых моно- и дикарбоновых кислот. Медь содержится в некоторых дыхательных ферментах.

Роль других химических элементов менее изучена. В частности, калий, занимающий по своему весу значительное место среди зольных элементов, не входит, по-видимому, в состав органических веществ и присутствует на поверхности клеточных

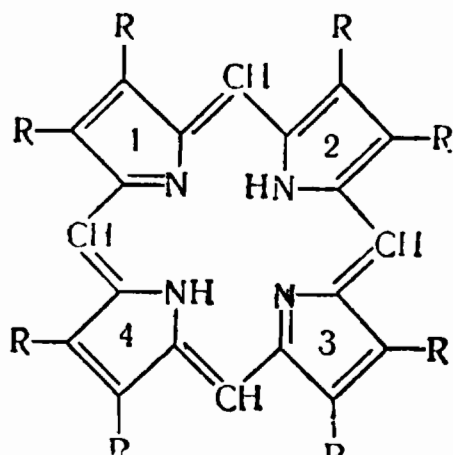


Рис. 22. Порфирин

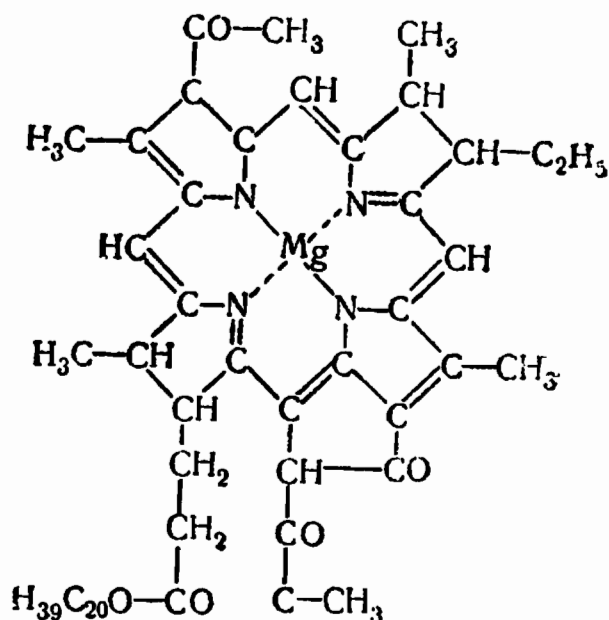


Рис. 23. Бактериохлорофилл

структур в ионной форме (K^+). Возможно, значение калия определяется тем, что он обладает небольшой радиоактивностью. По поводу использования энергии радиоактивного распада для жизненных процессов ничего еще достоверно не известно. Но, учитывая широкое распространение радиоактивных элементов на нашей планете, мы не видим ничего невероятного в том, что организмы в процессе эволюции приспособились как-то утилизировать эту энергию.

Органические вещества

Знание элементарного состава протоплазмы не дает достаточного представления о свойствах того субстрата, в котором протекают жизненные процессы. Вполне понятно, что углерод в виде угля или алмаза не может играть какой-либо роли в обмене веществ клетки. Важные для жизни окислы фосфора в чистом виде представляют собой смертельный яд. По-видимому, все определяется химической структурой молекул, содержащих данные химические элементы.

Уже в прошлом веке стало очевидным, что основным субстратом жизни является белок. Значение белка как носителя жизни было сформулировано еще Энгельсом.

Белок составляет 50—80% от сухого веса микробной клетки. Количество белка оказывается более низким только в тех случаях, когда клетка заполнена большим количеством жира, гликогена и других запасных отложений или же окружена толстой слизистой капсулой.

Однако прежние представления о белке как основе жизни в настоящее время пришлось несколько уточнить. Простые белки (протеины) чаще всего являются запасными отложениями, примером чего могут служить алейроновые зерна в растениях или белок куриного яйца. Физиологически активные белки по большей части относятся к типу сложных белков — протеидов, в которых белок соединен с небелковой (простетической) группой. Существует много разных протеидов. Важнейшие из них составляют следующие три категории: нуклеопротеиды, липопротеиды и ферменты.

1. Нуклеопротеиды, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты. Различают два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая (ДНК), которая представляет собой главную часть клеточного ядра, и рибонуклеиновая кислота (РНК), расположенная главным образом в цитоплазме, роль которой выражается в регулировании синтеза белков, а следовательно, и роста клетки. Нуклеиновые кислоты построены из пуриновых и пиримидиновых оснований, пентоз (рибозы или дезоксирибозы) и молекул фосфорной кислоты. Более подробно о них будет сказано в дальнейшем.

2. Липопротеиды. К ним принадлежат белки, простетической группой которых служат жиры (липиды) или жироподобные вещества (липоиды). Липопротеиды не смешиваются с водой, пропитывающей протоплазму. Внутри клетки они находятся в виде отдельных включений — телец, имеющих полужидкую консистенцию. К числу таких внутриклеточных структур относятся, например, митохондрии. На поверхности цитоплазмы липопротеиды образуют мембрану, регулирующую поступление веществ внутрь клетки. К числу неактивных липоидов принадлежат жиры и воск. У некоторых бактерий, например туберкулезных, количество последних достигает 30%. К активным липоидам принадлежат фосфолипиды — сложные эфиры высших спиртов и кислот, содержащие азот и фосфор, а также стероиды.

3. Ферменты (энзимы). По современным представлениям, ферменты являются белковыми соединениями. За немногими исключениями, все они имеют простетические группы (иногда называемые «активными группами»). Белковая часть фермента (апофермент) обуславливает его специфичность, т. е.

возможность его воздействия на определенные вещества. Простетическая группа осуществляет химическую реакцию. Ферменты, действующие на разные субстраты, могут обладать одинаковыми активными группами. Иногда простетические группы бывают очень прочно связаны со своим белком. Они легко от него отделяются, а некоторые могут вступать во временную связь с разными белками. Такие свободно существующие небелковые катализаторы биохимических превращений называются коферментами (коэнзимами).

Коэнзимы и простетические группы многих ферментов построены по типу нуклеотидов: они содержат какие-либо органические основания, чаще всего гетероциклические, которые через посредство углеводов соединены с фосфорной кислотой. Впрочем, в некоторых из них отсутствует либо углевод, либо фосфорная кислота.

Вторая категория ферментов имеет в качестве активной группы геминные производные. Как уже было сказано выше, сюда принадлежат главным образом окислительные ферменты.

И наконец, есть ферменты, простетические группы которых имеют иной состав.

Перечисленные выше протеиды составляют большую часть клеточного содержимого. Они являются тем основным субстратом, в котором протекают все жизненные процессы.

Кроме этих активных протеидов клетка содержит запасные и защитные вещества, а также низкомолекулярные промежуточные продукты обмена (аминокислоты, сахара и пр.). К запасным веществам относятся жировые отложения, гликоген, гранулёза, свойственная некоторым анаэробным бактериям, и волютин — запасное вещество, содержащее полифосфаты и азот. В мицелии грибов имеется крахмал. У автотрофных бактерий могут встречаться своеобразные резервные отложения в виде капелек серы. В клетках некоторых микробов, как и в растительных клетках, встречаются кристаллики органических солей или резервных белков. К числу защитных веществ принадлежат вышеупомянутые воскообразные вещества и полисахариды, окружающие клетку снаружи.

Иногда количество внеклеточных полисахаридов достигает огромных размеров. Например, бактерии *Leuconostoc*, которые иногда появляются на сахарных заводах, могут превратить целый чан сахарного раствора в студнеобразную массу, состоящую из полисахаридов (декстранов и левуланов) и тем нанести значительный вред. Оказалось, однако, что некоторые из таких полисахаридов пригодны в качестве заменителей крови, поэтому соответствующие бактерии стали теперь выращиваться в производственном масштабе.

Количество запасных и защитных веществ может колебаться в широких пределах без ущерба для жизнеспособности клеток.

В связи с этим при валовых анализах микробной биомассы нередко приходят к неожиданному заключению, будто бы хорошо питавшиеся клетки содержат меньше белка. В действительности это означает, что такие клетки очень богаты небелковыми резервными отложениями. Поэтому при учете роста клеток правильнее ориентироваться не на сухой вес, а на содержащиеся в клетках активные компоненты, главным образом белки и нуклеотиды. Об их количестве обычно судят по содержанию в клетке азота.

Белки

Белки — высокомолекулярные, коллоидные, азотсодержащие вещества (например яичный белок), известны очень давно. Но разобраться в их физическом строении удалось только за последние десятилетия. Первая классификация белков основывалась на их растворимости: альбумины — растворимы в воде, глобулины — в слабых растворах солей, проламины — в 60—80%-ном спирте. Глютелины и казеин растворяются в слабых щелочах и кислотах. Склеропротеины, представляющие собой затвердевшие, ороговевшие белки, ни в чем не растворимы. К ним относятся белки копыт, рогов, шерсти, сухожилий. Они имеют чисто механическое назначение.

Проламины и глютелины, а отчасти также глобулины и альбумины являются запасными белками. Жизненно-активные белки относятся к категории глобулинов и альбуминов. Кроме того, в состав клеточного ядра наряду с нуклеиновыми кислотами входят белки основного характера: гистоны и протамины.

Приведенное здесь подразделение белков сохранилось и поныне. Но оно имеет главным образом практическое значение. Различной растворимостью белков пользуются для их выделения из животных и растительных материалов.

Благодаря огромным размерам своих молекул (о чем более подробно будет сказано ниже), белки являются типичными коллоидами. При соответствующих условиях они дают прозрачные растворы (золи), которые, однако, легко могут загустеть и перейти в состояние мутного, вязкого геля (или желя). Примером может служить раствор желатины, который при охлаждении принимает студневидный характер. Переход из золя в гель и обратно можно также вызвать легкими химическими воздействиями. Способность протоплазменных белков к такого рода обратимым переходам играет большую роль в жизни клетки.

Без предварительного обезвоживания белки при высушивании роговеют и необратимо теряют свои свойства (денатурируются). Денатурация происходит также под влиянием некоторых химических веществ, нагревания белковых растворов и других воздействий. Вначале денатурация имеет обратимый характер, позднее становится необратимой. Денатурированный белок

АМИНОКИСЛОТЫ

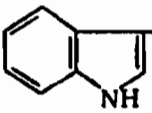
Моноамино-монокарбоновые, простые		Дикарбоновые	
Гликокол (глицин)	$\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH}$	L(+)-аспарагиновая	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ COOH
L(+)-аланин	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	L(+)-глутаминовая	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ COOH
L(+)-валин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Основные	
L(-)-лейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	L(+)-аргинин	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \\ \diagup \\ \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \end{array}$
L(+)-изолейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH}_2 \\ \diagdown \\ \text{CH} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	L(+)-лизин	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \end{array}$
То же, с группой -OH		Циклические	
L(-)-серин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	L(-)-тирозин	$\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
L(-)-треонин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{CH} \cdot \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	L(-)-фенил-аланин	$\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$
То же, содержащие S		L(-)-гистидин	$\begin{array}{c} \text{HC} = \text{C} - \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{HN} \quad \text{N} \\ \\ \text{CH} \end{array}$
L(-)-цистеин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \\ \text{SH} \end{array}$	L(-)-триптофан	$\text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ 
L(-)-цистия	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \\ \text{S}_2 \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \end{array}$	Иминокислоты	
L(-)-метионин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \\ \\ \text{S} - \text{CH}_3 \end{array}$	L(-)-пролин	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \quad \text{CH} \cdot \text{COOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$
		L(-)-оксипролин	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH} - \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \quad \text{CH} - \text{COOH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$

Рис. 24. Таблица важнейших аминокислот, входящих в состав белков

может остаться в растворе, как это происходит, например под влиянием крепких щелочей. Но обычно денатурация сопровождается свертыванием (коагуляцией) белка и выпадением его в осадок. Не следует смешивать коагуляцию с денатурацией. Белки можно осторожно осадить (коагулировать), не нарушая их нативных свойств.

Белки состоят из полипептидов, которые в свою очередь состоят из аминокислот. Известно более 20 натуральных аминокислот и их амидов, входящих в состав белковой молекулы (рис. 24). За исключением одного треонина, все они представ-

ляют собой левые изомеры аминокислот, отвечающие следующей общей формуле (где R — тот или иной радикал):



Необходимо заметить, что понятие «левый изомер» не соответствует действительному вращению плоскости поляризации при поляриметрических наблюдениях. Поэтому аминокислоты обозначаются так:

L(+) аланин, *L*(—) лейцин, *D*(—) треонин и т. д.

В этих обозначениях буква *L* указывает на принадлежность аминокислоты к левому, а *D* — к правому ряду. Знаки + и — обозначают вращение плоскости поляризации. Рацемические аминокислоты обозначаются буквами *DL*.

Аминокислоты *D* ряда обычно не усваиваются организмами и являются для них токсичными. Характерно, что многие антибиотики (граммицидин, полимиксин, актиномицин и др.), содержат в себе *D*-аминокислоты. Только немногие организмы, главным образом плесневые грибы, обладают ферментом рацемазой, которая превращает *D*-изомеры аминокислот в *L*-изомеры.

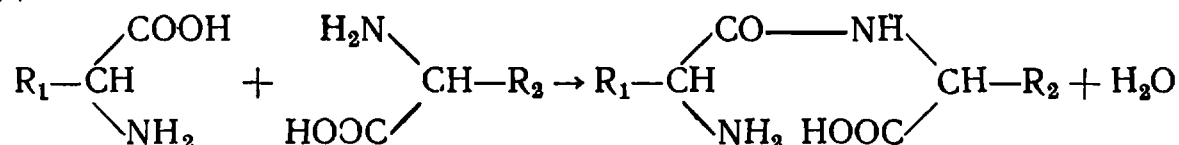
Радикалы аминокислот различны. Некоторые из них представляют собой неразветвленную углеродную цепочку. У других цепочка разветвлена. Третьи содержат в ней гидроксильные радикалы. В трех аминокислотах содержится сера. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты имеют по второму карбоксилу и поэтому являются наиболее кислыми из аминокислот.

В радикалах некоторых аминокислот (гистидина, триптофана, тирозина и фенил-аланина) содержатся циклические ядра.

Пролин и оксипролин представляют собой, в сущности, не аминокислоты, а иминокислоты.

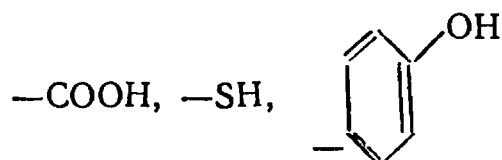
Три аминокислоты обладают резко выраженными основными свойствами: аргинин, орнитин и лизин.

Аминокислоты соединяются между собой посредством пептидной связи таким образом, что карбоксил одной аминокислоты присоединяется к аминогруппе второй, причем выделяется вода:

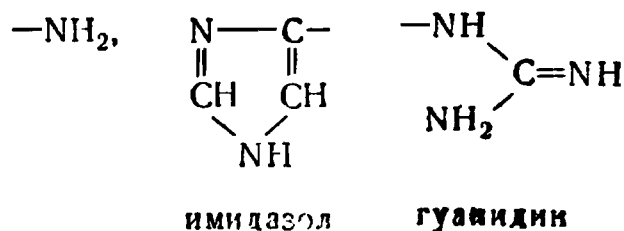


В зависимости от числа соединившихся аминокислот, возможны дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и т. д.

Радикалы аминокислот в полипептидах остаются свободными. Некоторые из радикалов имеют кислые группы:



В других присутствуют щелочные группы:



Благодаря наличию в пептидах одновременно кислых и основных групп, белки (которые, как уже сказано, состоят из пептидов) обладают амфотерностью, т. е. способностью образовывать соли и с основаниями (в качестве анионов), и с кислотами (в качестве катионов). Величина pH, при которой степень диссоциации кислых и щелочных групп одинакова, называется изоэлектрической точкой. Изоэлектрические точки разных белков не совпадают, так как зависят от преобладания в них тех или иных радикалов. В своей изоэлектрической точке белки наиболее легко выпадают в осадок.

Применяемые при микроскопировании краски представляют собой соли, которые состоят из окрашенной органической группы (хромофора) и минеральных кислот или оснований. В кислых красках, примером которых могут служить эозин, эритрозин и лихтерин, хромофор является органической кислотой. В основных красителях (метиленовая синь, тионин, сафранин и кристаллвиолет) окрашен катион. В зависимости от своей изоэлектрической точки, протоплазмальные белки окрашиваются по преимуществу либо кислыми, либо основными красками. В частности, нуклеопротеиды обладают кислыми свойствами, так как содержат фосфорную кислоту. Поэтому они хорошо соединяются с основными красками. Этим объясняется базофилия протоплазмы молодых клеток, богатых нуклеиновыми кислотами.

Белковые молекулы состоят из очень длинных пептидных цепочек, включающих в себя десятки аминокислот. Пептидные цепочки соединяются между собой посредством боковых мостиков, например, через группы $-\text{OH}$ и $-\text{SH}$ или через водородный атом за счет дополнительных связей.

В активных белках пептидные цепочки спиралевидно изогнуты, поэтому их молекулы имеют округлую форму. Такие молекулы называются «глобулярными». Рентгеноструктурный анализ позволяет определить их конфигурацию. Соотношение между длиной и поперечником колеблется от 1:2 до 1:20.

Молекулы скелетных и опорных белков представляют собой сильно вытянутые волокна. Их называют «фибрилярными».

При денатурации глобулярных белков, например, при нагревании их растворов, цепочки раскручиваются, спутываются и принимают удлиненную форму. В прежнее состояние они вер-

нуться уже не могут. Происходит примерно то же, что случится, если размотать и спутать клубок ниток.

Для определения молекулярного веса белков применялись различные способы. Наиболее точные результаты дает метод, основанный на измерении скорости оседания белка из раствора под влиянием центробежной силы. Для этих целей употребляются ультрацентрифуги, дающие до 100 000 оборотов в минуту. Вес наиболее мелких белковых молекул выражается тысячами; молекулярный вес некоторых других белков достигает 10 миллионов.

Белок	Молекулярный вес	Белок	Молекулярный вес
Фермент рибонуклеаза	12 700	Дифтерийный токсин	74 000
Миоглобин (белок мышц)	16 900	Глобулин сыворотки	176 000
Альбумин молока	17 400	Эдестин (белок конопли)	310 000
Гордеин (белок ячменя)	27 500	Фермент уреазы	480 000
Глобулин молока	35 200	Гемоцианин улитки	6 660 000
Фермент пепсин	35 500	Растительный вирус (карликовой кустистости)	10 600 000
Яичный альбумин	45 000		
Гемоглобин человека	63 000		

Молекулы наиболее крупных белков столь велики, что их удается разглядеть с помощью электронного микроскопа.

Белки различаются между собой как по суммарному аминокислотному составу, так и по порядку расположения аминокислот. В некоторых запасных белках и в желатине отсутствует ряд важных аминокислот.

Казеин молока, предназначенный для питания молодых животных, содержит все необходимые аминокислоты. В микробных клетках имеется множество белков, различающихся по своему аминокислотному составу. Однако при валовом анализе соотношение аминокислот в клетках всех микроорганизмов оказывается довольно близким, похожим на состав казеина (табл. 1).

Расчеты показывают, что даже в самых низкомолекулярных белках содержится более 100 аминокислотных остатков, в крупных же белковых молекулах количество аминокислот измеряется десятками тысяч. Например, в гемоцианине улиток их более 55 000.

Современные методы исследования позволили установить, что в расположении отдельных аминокислот наблюдается закономерная последовательность. Обычно они чередуются в определенном порядке — одни чаще, другие реже. Расположение аминокислот выяснено пока только в молекулах немногих белков. В качестве иллюстрации на схеме показан порядок аминокислот в инсулине быка. Для сравнения приведен фрагмент инсулина барана. Можно видеть, что в нем вместо серина в 9-м положении стоит глицин, а в 11-м положении вместо цистеина — валин.

Таблица 1

Аминокислотный состав некоторых белков, %

Аминокислота	Белок <i>Lactobac. fermenti</i>	Белок дрожжей	Казеин	Глиадин пшеницы	Зенин кукурузы	Желатина
Гликокол	4,4	4,2	2,0	1,0	0,0	27,0
Валин	6,8	4,6—7,1	7,0	3,0	1,9	1,2
Лейцин	7,5	6,1—8,5	9,2	6,0*	25,0*	3,9*
Изолейцин	7,0	5,5—6,2	6,1	—	—	—
Серин	—	—	6,1	0,1	1,0	3,3
Треонин	4,9	5,1—6,0	4,5	3,0	—	1,4
Цистин	0,1	0,9	0,3	2,3	0,9	0,2
Метионин	1,3	2,6—2,8	2,9	2,3	2,4	0,3
Аспарагиновая кислота	—	—	7,1	1,4	1,8	3,4
Глутаминовая кислота	11,0	14,0—14,7	22,2	46,0	31,3	5,8
Пролин	—	—	11,0	13,2	9,0	9,7
Тирозин	—	3,4—6,0	6,2	3,1	5,9	0,
Фенил-аланин	4,1	2,9—4,6	5,5	2,5	7,6	1,0
Триптофан	0,6	1,2—1,5	1,2	0,9	0,2	0,0
Гистидин	2,4	2,3—3,3	2,9	2,1	0,8	2,9
Аргинин	4,8	3,1—5,4	4,0	3,2	1,6	8,7
Лизин	6,9	6,7—9,8	8,1	0,6	0,0	5,9

* Суммарное количество лейцин + изолейцин.

В молекулах инсулина других видов животных также имеются те или иные отличия. Таким образом, наряду с общностью строения всех инсулинов, связанной с их одинаковой функцией в организме различных животных, в них имеются и свои специфические особенности.

На рис. 25 изображено строение молекулы рибонуклеазы.

Согласно математическим расчетам, из 20—22 аминокислот можно было бы сделать огромное число сочетаний и, следовательно, построить фантастически большое количество разнообразнейших белков. Чтобы представить себе это более наглядно, воспользуемся следующим сравнением. В некоторых алфавитах имеется почти столько же букв, сколько аминокислот в белках (в английском — 26, в итальянском — 21). Из них можно составить десятки тысяч различных слов. Из этих слов, в свою очередь, можно сложить неисчерпаемое множество литературных произведений разного жанра (стихов, очерков, рассказов, научных статей и пр.), не повторяющих одно другое.

Число возможных белков превышает количество, необходимое для того, чтобы не только все виды живых существ имели

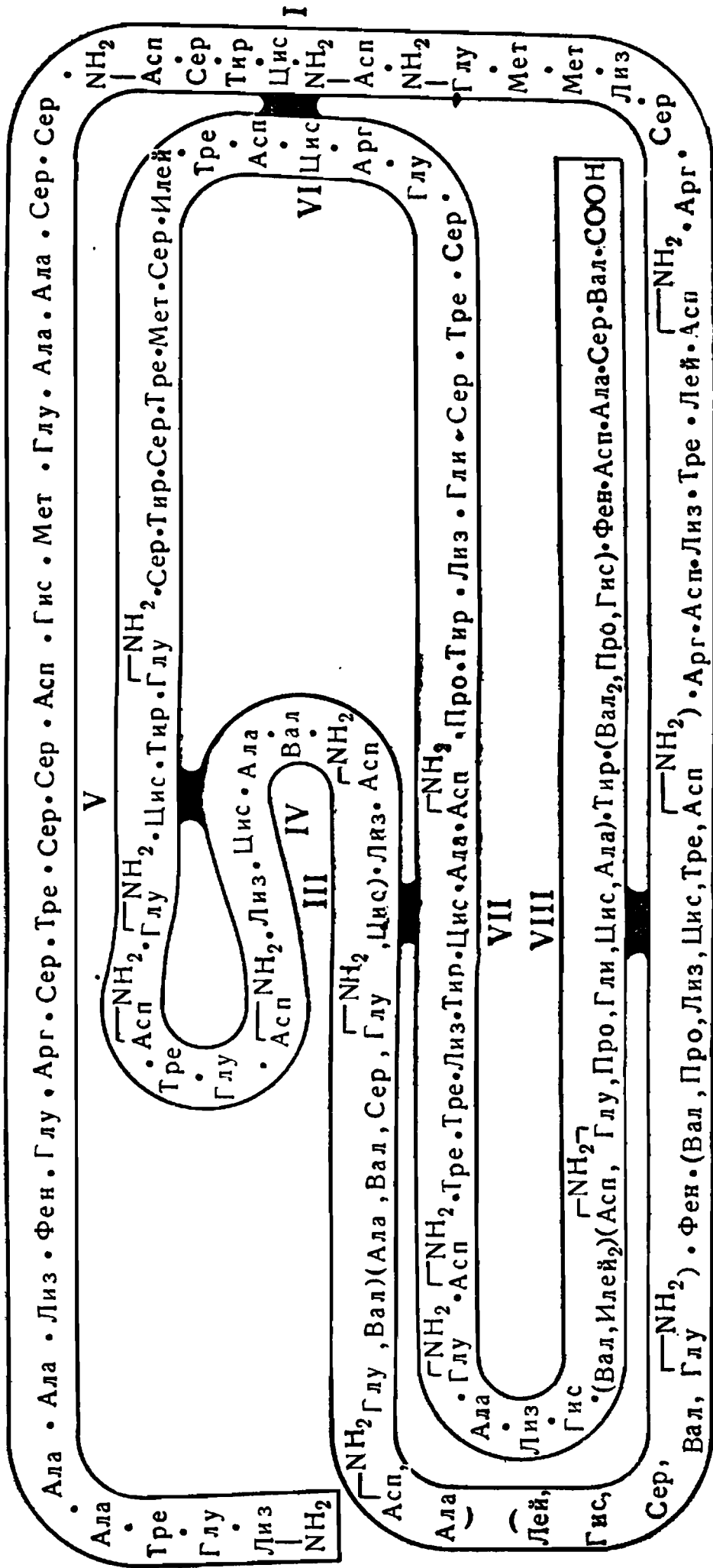


Рис. 25. Строение молекулы рибонуклеазы

свои особые белки, но и каждый фермент в организме содержал бы особые белковые соединения. Таким образом, многообразие и специфичность жизненных явлений вполне согласуются с многообразием и специфичностью белковых молекул.

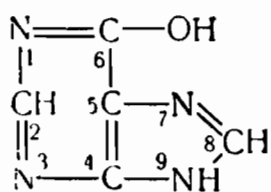
Нуклеиновые кислоты

Существует два типа нуклеиновых кислот: дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК). Нуклеиновые кислоты представляют собой высокополимерные соединения. Молекулярный вес их может достигать сотен тысяч и миллионов. Они состоят из мононуклеотидов, связанных между собой в виде цепочки. Каждый мононуклеотид содержит пуриновые или пиримидиновые основания, соединенные с пентозой, которая в свою очередь соединена эфирной связью с фосфорной кислотой (рис. 26).

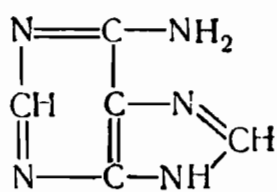


В ДНК находятся гуанин, аденин, тимин, цитозин и метилцитозин. В РНК вместо тимина содержится урацил. ДНК и РНК различаются между собой также углеводным компонентом: в первую входит дезоксирибоза, во вторую — рибоза.

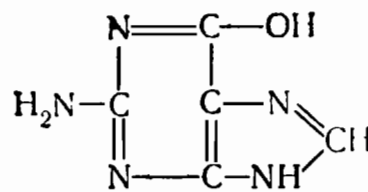
Пуриновые основания



гипоксантин

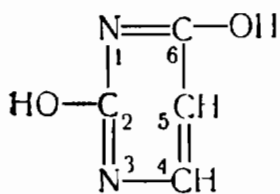


аденин

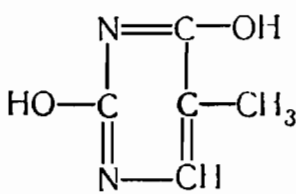


гуанин

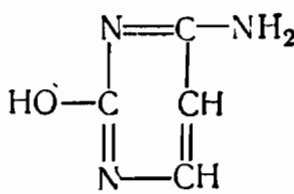
Пиримидиновые основания



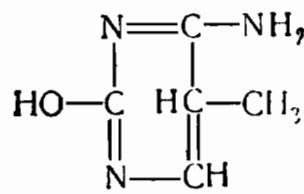
урацил



тимин



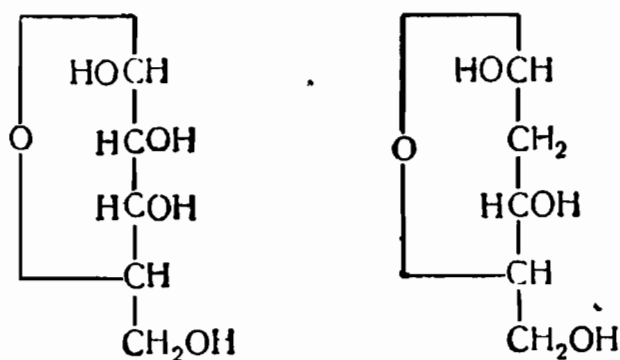
цитозин



5-метил-цитозин

Рис 26 Пуриновые и пиримидиновые основания

Углеводы



d-рибоза

d-дезоксирибоза

В табл. 2 приведены названия различных нуклеозидов и мононуклеотидов.

Таблица 2

Названия нуклеозидов и мононуклеотидов

Основание	Нуклеозид	Мононуклеотид
Аденин	Аденозин	Адениловая кислота
Гипоксантин	Инозин	Инозиновая »
Гуанин	Гуанозин	Гуаниловая »
Урацил	Уридин	Уридиловая »
Тимин	Тимидин	Тимидиловая »
Цитозин	Цитидин	Цитидиловая »
5-метилцитозин	5-метилцитидин	5-метилцитидиловая »

Мононуклеотиды могут следовать друг за другом в различном порядке, этим определяется специфика нуклеиновых кислот.

Говоря о ДНК и РНК, подразумевают не индивидуальные нуклеиновые кислоты, а весь комплекс нуклеиновых кислот, содержащихся в клетке.

ДНК находится по преимуществу в ядре или его эквиваленте — «нуклеоиде» бактерий. РНК расположена главным образом в цитоплазме. Особенно ее много в рибосомах — субмикроскопических зернышках, разбросанных по цитоплазме. Поэтому ранее первую кислоту называли «ядерной», а вторую — «цитоплазматической».

По современным представлениям, ДНК является основным хранителем наследственных особенностей организма, которые в процессе размножения через нее передаются потомкам. Однако старые генетические представления о том, что каждый

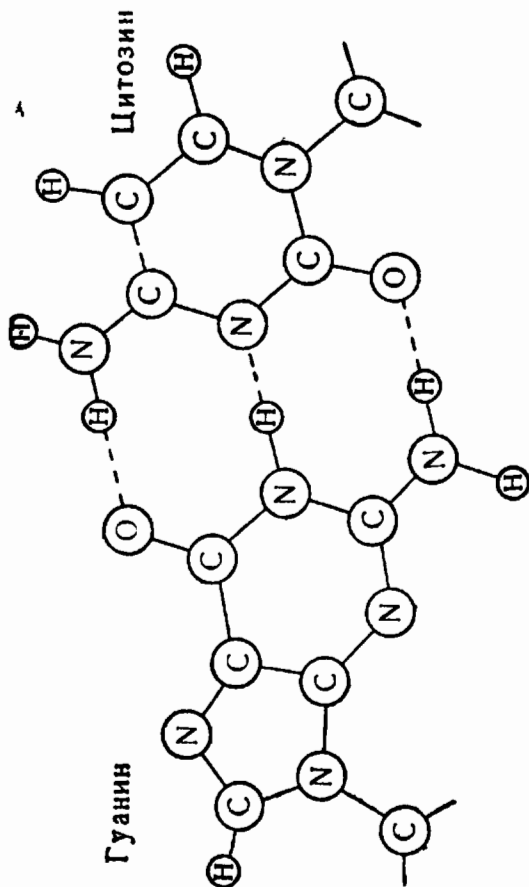
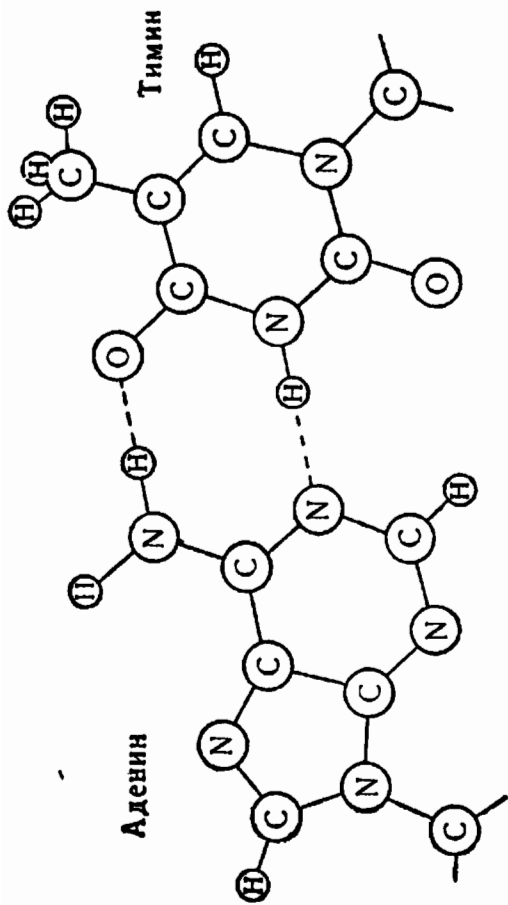


Рис 27. Полярное соединение оснований в нуклеиновых кислотах

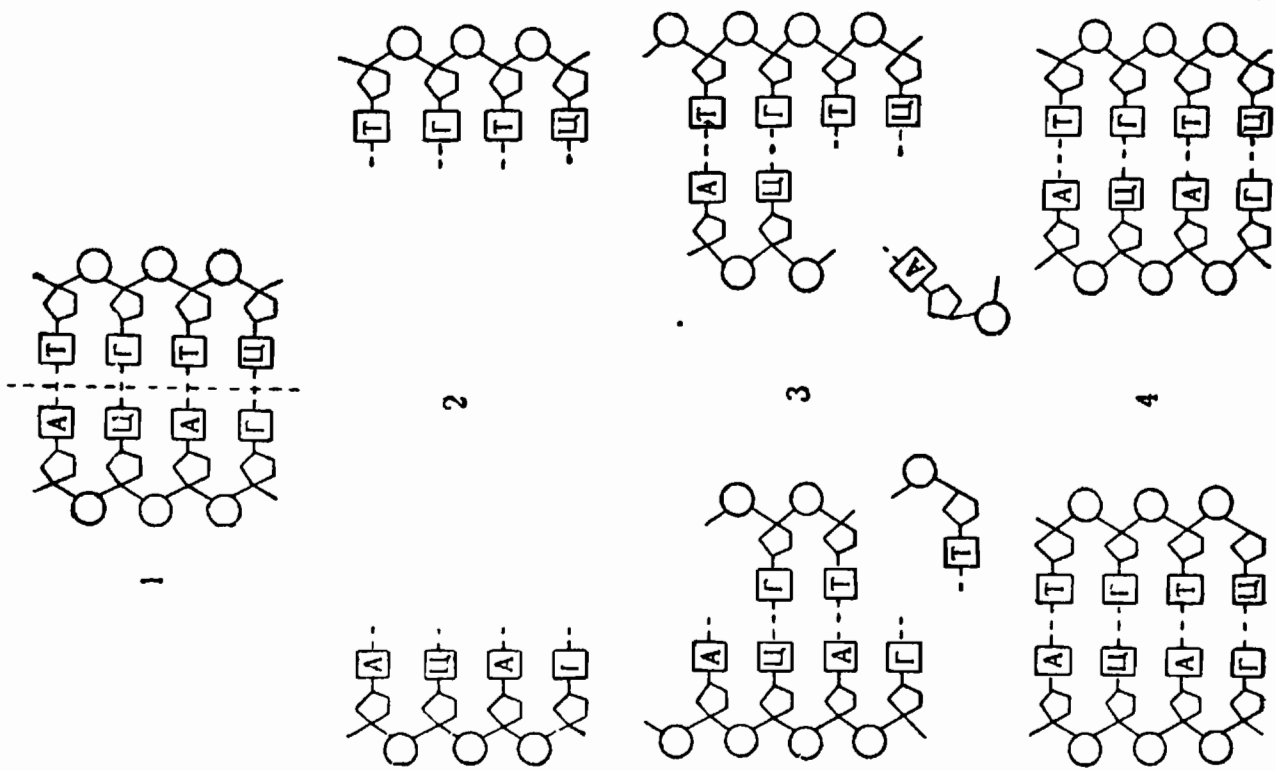


Рис 28. Схема удвоения молекулы ДНК

А — аденин, Т — тимин; Ц — цитозин; Г — гуанин 1 — двойная цепь ДНК, 2 — разъединение цепей, 3 — присоединение мононуклеотидов к разъединившимся цепям; 4 — образование двух новых цепей ДНК По Белозерскому, 1961

признак организма определяется отдельной нуклеопротеидной молекулой, в свете современных данных нельзя считать правильными. По-видимому, ДНК служит лишь своего рода «затравкой», которая определяет некоторые начальные свойства развивающегося организма и прежде всего — специфику строения его РНК и белков. Все остальные признаки создаются уже в процессе онтогенетического развития в результате взаимодействия клеток с окружающей их средой, т. е. с другими частями самого эмбриона, питательными веществами, гормонами и пр. Условия среды во время развития организма могут в корне изменить его признаки и свойства.

ДНК состоит из двух цепочек, в которых основания попарно соединены между собой (рис. 27). Аденин всегда бывает связан с тиминном, гуанин — с цитозином (а также с метилцитозином, который, однако, имеется в небольших количествах). В процессе деления ядра эти цепочки расходятся, после чего к каждой из них пристраиваются соответствующие мононуклеотиды (рис. 28). Соединяясь затем между собой, эти нуклеотиды образуют недостающую половину молекулы. Таким путем происходит удвоение ДНК, причем ее специфика, определяемая порядком расположения отдельных мононуклеотидов, полностью сохраняется. Каждая цепочка служит как бы матрицей для образования второй, парной с ней цепочки.

Указанные предположения подтверждаются радиоизотопным методом — т. е. применением меченых нуклеотидов. Кроме того, анализы показывают, что количество аденина всегда равно количеству тимина, такое же равенство существует между гуанином и цитозином. Однако соотношение между первой и второй парой оснований может сильно варьировать в зависимости от систематического положения данного организма. У высших животных и растений соотношение бывает сдвинуто в сторону аденина и тимина. У бактерий и актиномицетов соотношение это очень изменчиво. Так, если у актиномицетов и сарцины Г+Ц более чем в два с половиной раза превышает А+Т, то у анаэробных клостридий наблюдается противоположное соотношение (табл. 3).

Основная функция РНК — это обеспечение биосинтеза белков, а следовательно, и роста клетки. Современные биохимические методы, основанные на разрушении (гомогенизации) клеток и фракционировании клеточного содержимого с помощью центрифуг, позволяют выделить рибосомы. Пользуясь препаратом рибосом, удается добиться синтеза белка *in vitro*. Таким образом, роль рибосомной РНК как места синтеза белков, можно считать достаточно доказанной. Характерно, что в быстро растущих клетках содержание РНК возрастает в несколько раз, повышаясь например, у бактерий от 3—4 до 18—20%. Особенно сильно увеличивается фракция высокомоле-

Нуклеотидный состав различных ДНК
(по данным А. Н. Белозерского и А. С. Спирина, 1960)

Организм	Соотношение оснований, %				
	Гуанин (Г)	Аденин (А)	Цитозин + метил-ци- тозин (Ц)	Тимин (Т)	$\frac{Г + Ц}{А + Т}$
Человек	19,9	30,9	19,8	29,4	0,66
Бык	21,2	29,0	21,2	28,7	0,75
Пшеница	23,8	25,6	24,6	26,0	0,94
Зеленая водоросль	32,9	18,7	30,9	17,5	1,76
Аспергилл	25,1	25,0	25,0	24,9	1,00
Дрожжи	18,3	31,7	17,4	32,6	0,56
Актиномицеты	36,1	13,4	37,1	13,4	2,73
Сарцина	36,4	13,6	35,6	14,4	2,57
Туберкулезные бактерии	34,2	16,5	33,0	16,0	2,08
Дифтерийные бактерии	27,2	22,5	27,3	23,0	1,20
Кишечная палочка	26,0	23,9	26,2	23,9	1,09
Сенная палочка	21,0	28,9	21,4	28,7	0,74
Стрептококк	16,6	33,4	17,0	33,0	0,51
Клостридиум перфрингенс	15,8	34,1	15,1	35,0	0,45

кулярных рибонуклеотидов. Низкомолекулярная фракция (количество которой сравнительно невелико) при этом почти не изменяется.

В отличие от ДНК, РНК пребывает в клетке в виде одиночных, неспаренных цепочек. Соотношение отдельных оснований в РНК не имеет столь закономерного характера, как в ДНК. Обычно Г+Ц преобладает над А+У (табл. 4).

Видовая специфика нуклеиновых кислот зависит не только от указанного соотношения пуриновых и пиримидиновых оснований (называемого «коэффициентом специфичности»), но и от их чередования в молекуле. Однако современная исследовательская техника не дает еще возможности определить, в каком именно порядке они следуют друг за другом. Предполагается, что порядок расположения пуриновых и пиримидиновых оснований в молекуле каждой из РНК определяет собою расположение аминокислот в соответствующей белковой молекуле. Таким образом, рибонуклеиновые кислоты являются как бы матрицами для синтеза белков. Главную роль выполняют, по-видимому, растворимые фракции РНК, передвигающиеся по клетке, а не рибонуклеопротеиды, расположенные в рибосомах. Появились сведения о том, что индивидуальные рибонуклеотиды обуславливают биосинтез вполне определенных белков. Следовательно, специфика строения молекулы РНК действительно определяет особенности белковой молекулы.

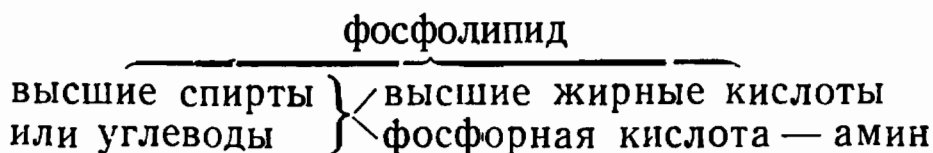
Нуклеотидный состав различных РНК
(по данным А. Н. Белозерского и А. С. Спирина, 1960)

Организм	Соотношение оснований, %				
	Гуанин (Г)	Аденин (А)	Цитозин (Ц)	Урацил (У)	$\frac{Г+Ц}{А+У}$
Крыса	32,8	18,7	29,6	18,9	1,66
Пшеница	30,8	25,2	25,4	18,6	1,28
Зеленая водоросль	30,1	23,2	25,1	21,6	1,23
Аспергилл	30,1	25,0	25,0	19,9	1,23
Дрожжи	27,3	24,3	22,5	25,7	1,00
Актиномицеты	31,1	23,8	25,2	19,9	1,29
Сарцина	32,7	23,2	24,2	19,9	1,32
Туберкулезные бактерии	33,0	22,6	26,1	18,3	1,45
Дифтерийные бактерии	31,6	23,1	23,8	21,5	1,24
Кишечная палочка	30,7	26,0	24,1	19,2	1,21
Стафилококк	28,7	26,9	22,4	22,0	1,05
Клостридиум перфрингенс	29,5	28,1	22,0	20,4	1,06

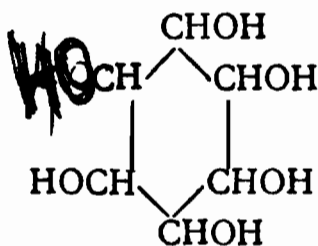
Существует мнение, что специфика строения РНК в свою очередь зависит от строения ДНК. Но связь между ними, по-видимому, имеет опосредствованный характер. Об этом можно судить по значительному повышению содержания РНК в быстро растущих бактериальных клетках, тогда как % ДНК, наоборот, падает.

Липиды и липоиды

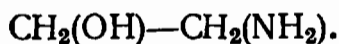
Как уже было сказано выше, сюда относятся различные вещества: с одной стороны, истинные жиры (липиды), представляющие собой сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот; с другой стороны, жироподобные вещества (липоиды), напоминающие жиры только своими физическими свойствами — нерастворимостью в воде. Жиры являются запасными отложениями. Но многие из веществ второй категории обладают большой физиологической активностью и принимают деятельное участие в обмене веществ. К числу таких активных соединений относятся фосфолипиды — липоиды, содержащие азот и фосфор:



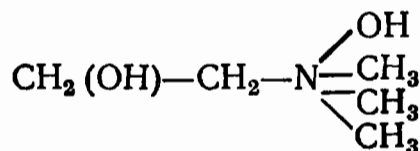
В качестве спиртов наряду с глицерином могут фигурировать углеводы (поскольку в их молекуле имеются гидроксильные радикалы), а также циклический спирт инозит:



Не менее разнообразны и высшие кислоты. Из микробных клеток удалось выделить больше двух десятков различных кислот, содержащих от 4 (масляная) до 88 углеродных атомов (миколевая, лепрозиновая). Некоторые из них входят в фосфолипиды. Амины в фосфолипидах чаще всего бывают представлены производными коламина (этиламина):



Особенно часто встречается холин:



Другой тип активных липоидов — это стероиды. Известно много десятков различных стероидов. Все они являются производными углеводорода стерана (рис. 29).

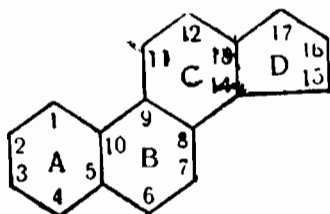


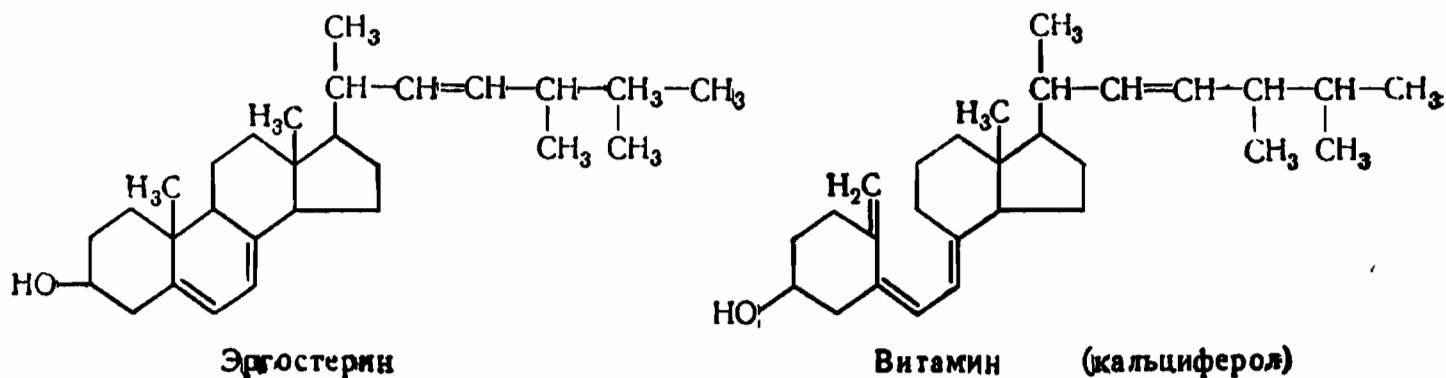
Рис. 29. Стеран
(циклопентанопергидрофенантрен)

Стероиды различаются между собой строением боковой цепочки (которая может находиться при 17-м атоме углерода), наличием или отсутствием радикалов — CH_3 (при 10-м и 13-м атомах углерода) и двойных связей в тех или иных кольцах. Особое значение для их физиологической активности имеет наличие или отсутствие $-\text{OH}$ и $=\text{O}$ в 3-м и 11-м положениях, а равно и в боковой цепочке. Стероиды, имеющие гидроксильные группы, называются стеринами (или стеролами).

К числу наиболее известных стероидов принадлежит холестерин. Откладываясь в стенках кровеносных сосудов, он обус-

ловливает их атеросклеротические изменения. Мужские и женские половые гормоны тоже относятся к стероидам. К стероидам принадлежат и некоторые канцерогенные вещества.

Большое практическое значение имеет эргостерин. Он содержится в значительных количествах в пивных дрожжах, откуда главным образом и получают его в производственном масштабе. После обработки ультрафиолетовым светом в эргостерине разрывается кольцо В и он превращается в витамин D₂ (кальциферол). Недостаток витамина D₂ нарушает у детей кальциевый обмен, вызывая заболевание рахитом. Такова же роль витамина D₃, отличающегося от D₂ строением боковой цепи.



Важное лечебное значение за последние годы приобрели стероидные гормоны надпочечников (кортикостероиды). Ими лечат от ревматизма, полиартрита и других заболеваний. В надпочечниках животных эти стероиды содержатся в очень малых количествах, а химический синтез их на некоторых этапах представляет большие трудности. Поэтому для осуществления некоторых этапов синтеза с успехом стали использовать деятельность микроорганизмов. Специально подобранные культуры микробов производят определенные изменения в молекуле кортикостероидов, образуя, например, двойную связь в кольце А или окисляя углерод в 11-м положении. Таким путем из кортизона можно получить преднизон (рис. 30), а из гидрокор-

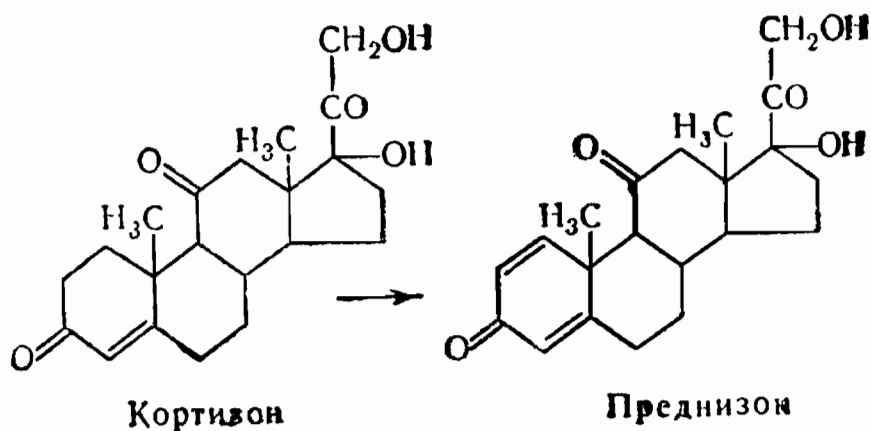


Рис. 30 Трансформация кортизона в преднизон микроорганизмами

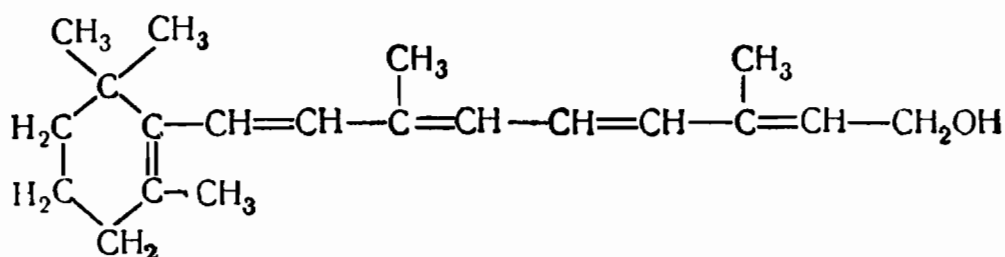
тизона — преднизолон. Полученные продукты обладают более высокой активностью.

Подобным же образом производят микробиологическую трансформацию половых гормонов.

К жироподобным веществам принадлежат еще каротиноиды — оранжевые пигменты, содержащиеся в моркови, розовых дрожжах и некоторых пигментированных бактериях и актиномицетах.

Один из этих пигментов — β -каротин моркови — представляет собой две соединенные вместе молекулы витамина A_1 (с потерей гидроксиллов).

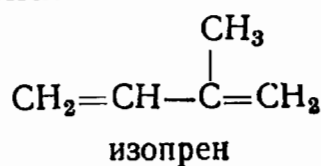
В настоящее время некоторые микроорганизмы стали использоваться для производственного получения витамина A .



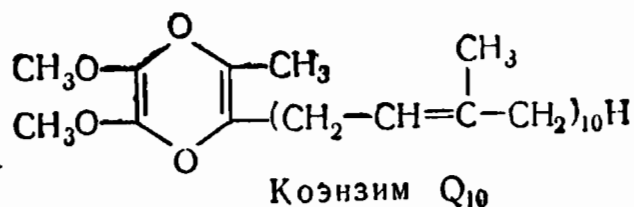
Витамин A_1 (ретинол)

При недостатке этого витамина у животных происходят повреждения кожного эпителия и глаз. Роль его в обмене веществ не совсем еще ясна. Возможно, что он участвует в окислительных процессах и, следовательно, относится к дыхательным коферментам.

В пользу этого предположения говорит то, что в молекуле каротиноидов содержится циклическое ядро и цепочка, состоящая из остатков изопрена:

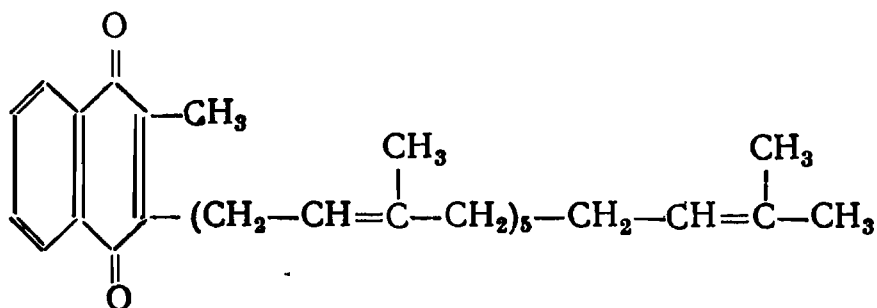


По тому же типу построены типичные дыхательные коферменты Q (убихиноны):



Боковая цепь этих коферментов может содержать от 6 до 10 изопреноидных остатков (что обозначается соответствующей цифрой при букве Q).

Длинная изопреноидная цепочка имеется также в молекуле витамина К₂. Недостаток его вызывает у животных понижение свертываемости крови и внутренние кровоизлияния (геморрагию). Микрофлора кишечника синтезирует этот витамин, снабжая им животных. Поэтому авитаминозы обычно бывают связаны с нарушением процессов всасывания витамина в кишечнике.



Витамин К₂

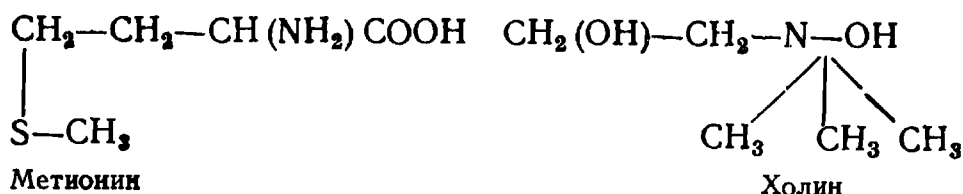
Родственный ему витамин К₁ отличается строением боковой цепи: в ней только одна двойная связь, но больше боковых метильных радикалов (СН₃—).

К числу жирорастворимых витаминов принадлежат также токоферолы (витамины Е). Своим строением они несколько напоминают витамин К₁, имея конденсированное циклическое ядро и длинную боковую цепь с восстановленными атомами С и боковыми радикалами —СН₃. При его недостатке животные теряют способность размножаться.

Коферменты (коэнзимы)

В большинстве случаев ферменты являются сложными белками протеидами. Их небелковые (простетические) компоненты ранее именовались „активными группами“ или „коферментами“. Однако за последние годы обнаружилось много таких коферментов, которые или вовсе не связаны с белками или же вступают во временное соединение то с тем, то с другим ферментным белком. Таким образом, некоторые коэнзимы не могут считаться постоянными простетическими группами каких-либо энзимов. Они служат посредниками в обмене, присоединяя к себе те или иные радикалы (—СН₃, —NH₂, СН₃СО—, —РО(ОН)₂ и др.) и передавая затем их другим веществам. Эти посредники называются иногда «переносчиками радикалов». К числу переносчиков принадлежат соединения, которые трудно признать за специфические катализаторы биохимических реакций, поскольку они входят в состав белков и других компонентов протоплазмы. Например, аминокислота метионин, а также холин (составная

часть фосфолипидов) могут выполнять роль переносчиков метильных радикалов:



Что касается типичных коферментов и простетических групп ферментов, то их можно подразделить на три основных категории:

- 1) соединения порфиринового типа;
- 2) соединения нуклеотидного типа;
- 3) прочие химические соединения.

Порфириновые коферменты. О строении порфиринов уже говорилось в разделе «химические элементы». Порфириновая часть витамина В₁₂, формула которого будет дана ниже (гл. 4), содержит Со. Этот витамин входит в состав коэнзимов, участвующих в переносе одноуглеродных радикалов, а возможно также и в других биохимических реакциях.

Еще большее значение для мира живых существ имеют порфирины, содержащие магний и железо. К первым относится хлорофилл зеленых растений — этот великий посредник между солнцем с его неистощимой световой энергией и жизнью на земле (рис. 23). К железосодержащим порфиринам принадлежит гемоглобин — дыхательный пигмент животных, придающий крови ее характерный красный цвет, а также ряд коферментов. Все они являются производными гема. Можно упомянуть о каталазе — ферменте, катализирующем распад перекиси водорода ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}$), пероксидазах и многочисленных цитохромах. В настоящее время известно более 20 цитохромов. Их обозначают латинскими буквами *a*, *b* и *c* с тем или иным цифровым индексом. Некоторые цитохромы соединены с ферментным белком и, следовательно, являются гемопротеидами, другие фигурируют в качестве свободных коэнзимов. На рис. 31 даны формулы двух цитохромов.

Цитохромы — главные участники кислородного дыхания. Анаэробные дегидразы отрывают электроны (и, соответственно, атомы водорода) от органического субстрата и передают одному из цитохромов, который передает их следующему цитохрому и т. д. Цитохромы попеременно то восстанавливаются, то опять окисляются. Последний из них реагирует непосредственно с кислородом воздуха. Этот цитохром носит название «цитохром-моксидазы». Возможно, он тождествен цитохрому *a*₃.

Нуклеотидные коферменты напоминают своим строением нуклеотиды: они состоят из того или иного органического основания (обычно — гетероциклического), соединенного

с рибозой и фосфорной кислотой. Впрочем, в некоторых из них отсутствует либо рибоза, либо фосфат. В табл. 5 приведены структуры важнейших оснований, входящих в состав коферментов.

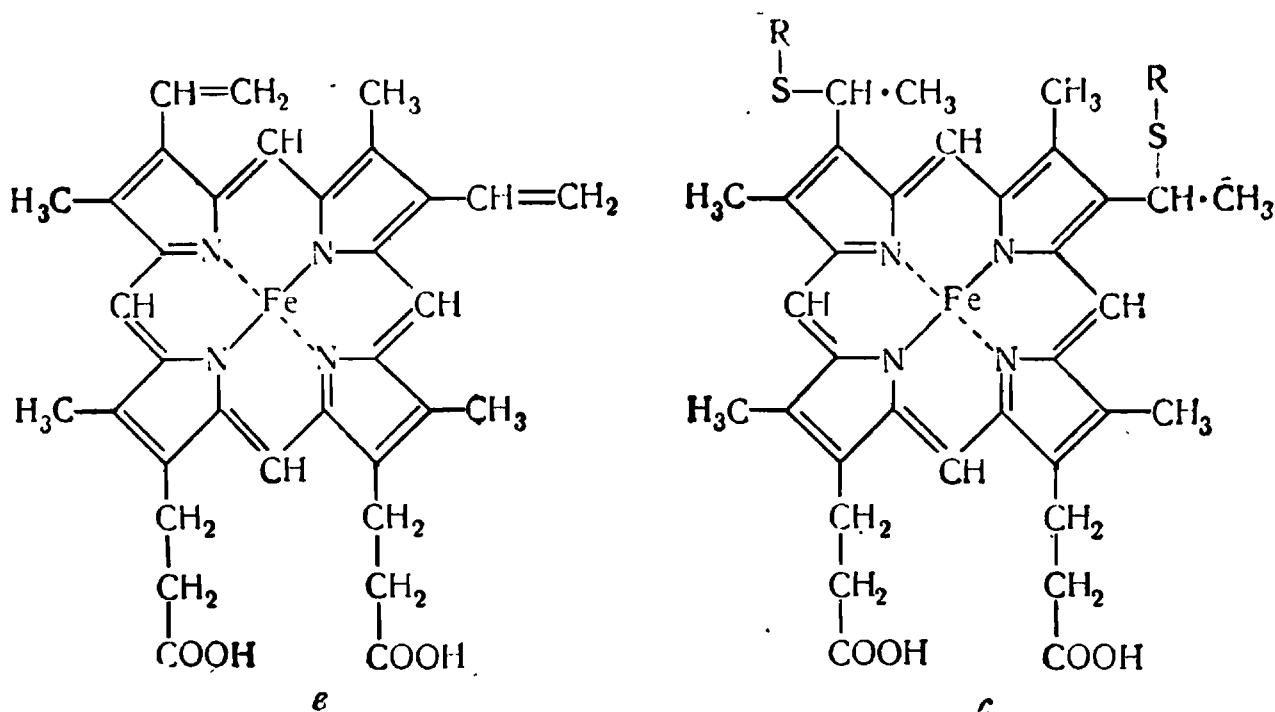


Рис. 31. Цитохромы *b* и *c*

Иногда два основания бывают соединены между собой через группу $-\text{NH}-\text{CH}_2-$, как тиазольный и пиримидиновый компоненты кокарбокислазы или бензольное и птеридиновое производные в молекуле фолиевых коэнзимов. Некоторые коферменты построены по типу динуклеотидов: они содержат по

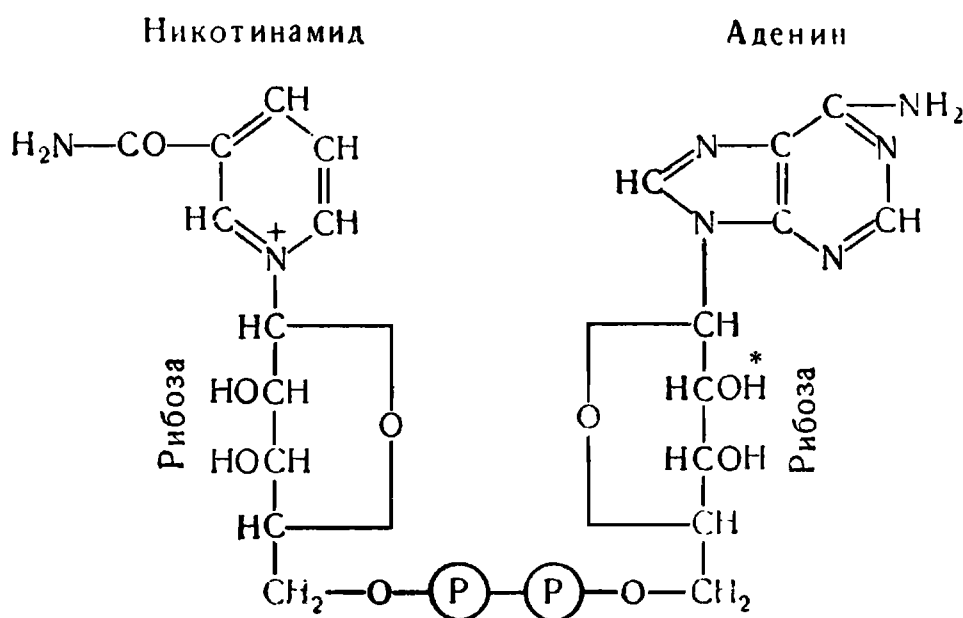
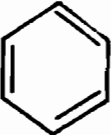
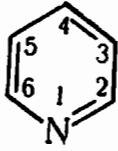
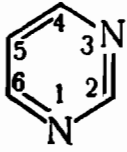
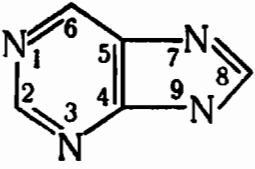
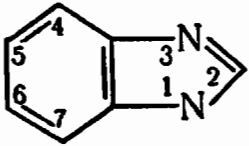
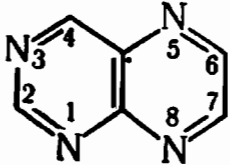
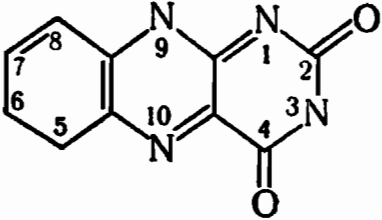
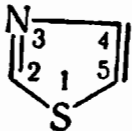
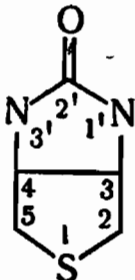


Рис. 32. Дифосфопиридиннуклеотид (ДПН), окисленная форма. В трифосфопиридиннуклеотиде (ТПН) присоединена 3-я молекула фосфорной кислоты в месте, отмеченном звездочкой

Циклические ядра нуклеотидных коферментов

Строение	Название	Некоторые производные, входящие в состав коферментов
	Бензол	Пара-аминобензойная кислота (компонент фолиевой кислоты)
	Пиридин	Амид никотиновой кислоты; пиридоксаль и пиридоксамин
	Пиримидин	2-метил-4-амино-5-аминометилпиримидин (компонент тиамина); урацил (компонент УТФ и УДФ)
	Пурин	Аденин (компонент многих коэнзимов)
	Бензимидазол	5,6-диметилбензимидазол (компонент витамина B ₁₂)
	Птеридин	6-метил-2-амино-4-оксиптеридин (компонент фолиевой кислоты)
	Изоаллоксазин	Рибофлавин (компонент флавиновых ферментов)
	Тиазол	4-метил-5-β-оксиэтилтиазол (компонент тиамина)

Строение	Название	Некоторые производные, входящие в состав коферментов
	Имидазол-тиофан	Биотин

два различных основания, соединенных между собой через молекулы фосфорной кислоты. На рис. 32—36 приведены формулы нескольких коферментов.

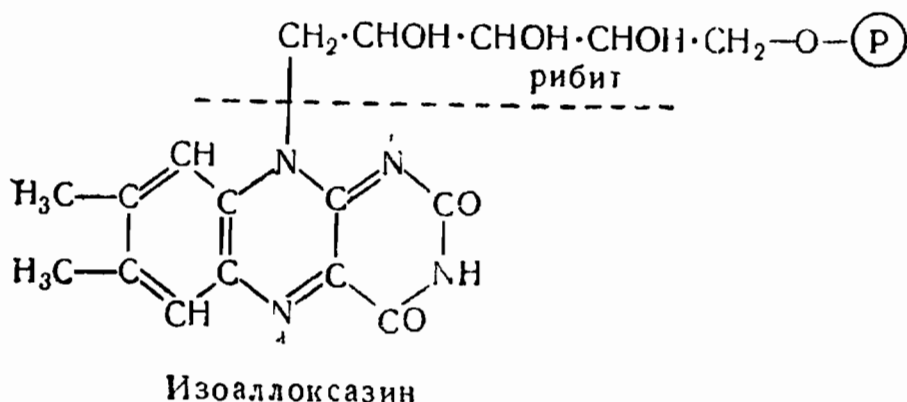
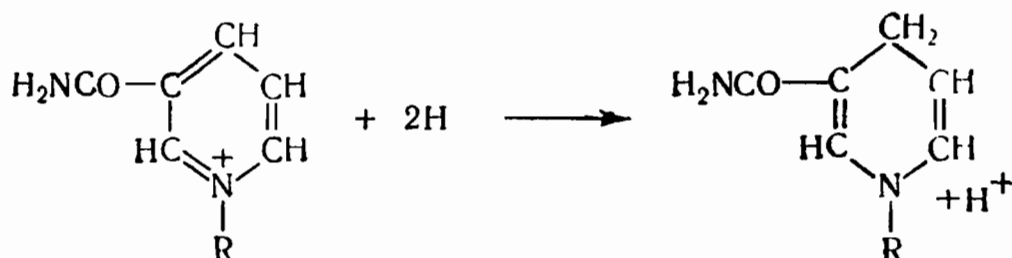


Рис. 33 Флавиннуклеотид (ФН), окисленная форма. Водород присоединяется к атомам азота, помеченным звездочками, с одновременным образованием двойной связи между углеродными атомами, расположенными между ними

Роль, выполняемая нуклеотидоподобными коферментами, очень разнообразна. Многие из них являются дегидразами, захватывая водород, отщепляемый от субстрата, и передавая его другим переносчикам водорода. К их числу принадлежат ди- и трифосфопиридиннуклеотиды (рис. 32). Один атом водорода присоединяется к никотинамиду, второй переходит в форму иона:



К числу дегидраз относятся также флавиновые ферменты, содержащие флавиновый нуклеотид в отдельности (рис. 33) или же в сочетании с адениловой кислотой (ФАД).

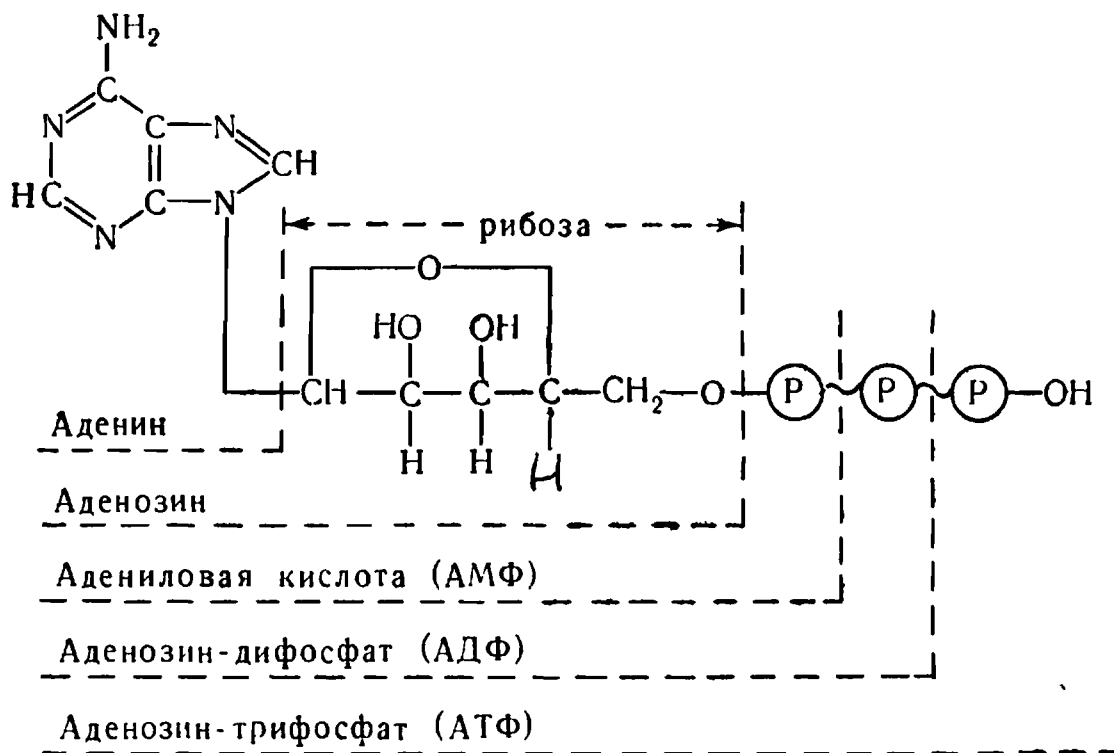


Рис 34 Аденозиновые коферменты

Большое значение в обмене веществ принадлежит богатым энергией связям, называемым «макроэргическими». На рис. 34 дана формула аденозин-трифосфорной кислоты (АТФ). Это соединение имеет одну простую связь (—) и две макроэргические (~). Энергия фосфор-органических макроэргических связей составляет ~~10—16 больших калорий~~ на грамм-молекулу, тогда как в обычных сложноэфирных связях содержится только 2—3 большие калории.

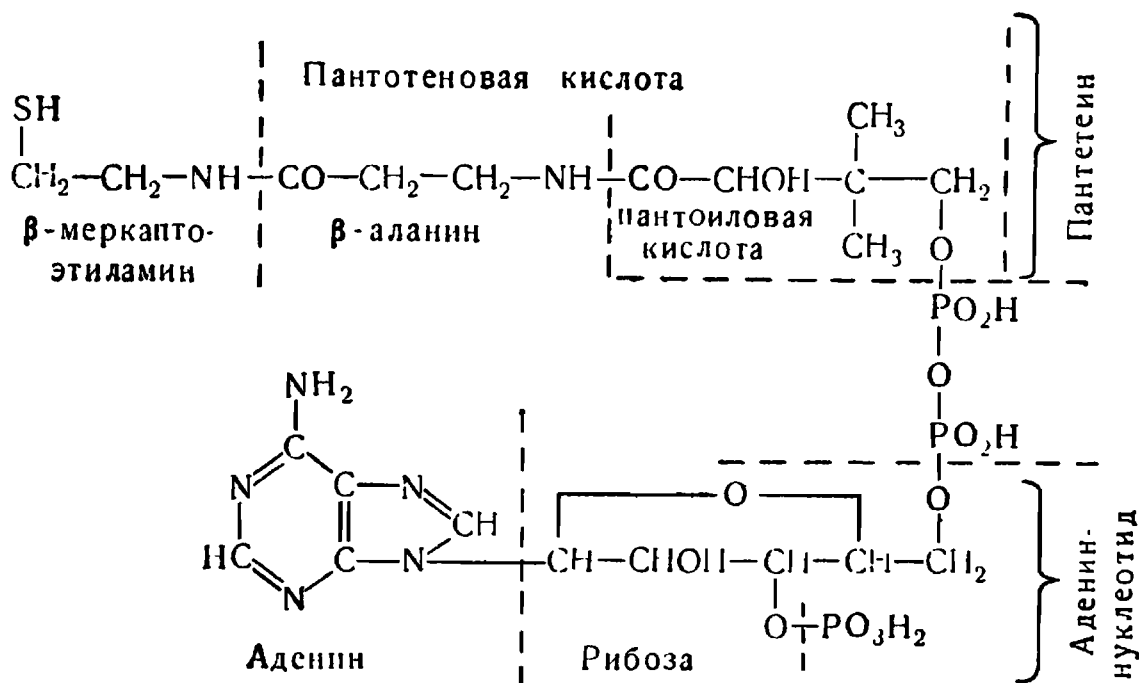


Рис. 35. Строение кофермента А

Таким же строением обладают коэнзимы, содержащие вместо аденина урацил: уридинтрифосфат (УТФ) и уридиндифосфат (УДФ). Макроэргическими связями обладают и другие фосфор-органические соединения: дифосфоглицериновая кислота, аргининфосфат и др.

Коэнзим А (рис. 35) служит переносчиком остатков уксусной, янтарной и некоторых других кислот. Ацетильная группа ($\text{CH}_3\text{CO}-$) присоединяется к атому серы, причем эта связь является макроэргической: она содержит более 8 больших калорий. Коэнзим А играет важную роль в синтезе высших кислот и стероидов.

Коэнзим, содержащий производное птеридина, парааминобензойную кислоту и глутамат, известен под названием «тетрагидрофолиевой кислоты» (рис. 36). Он входит в состав ферментов, участвующих в переносе формильной ($-\text{CHO}$) и оксиметильной ($-\text{CH}_2\text{OH}$) групп при синтезе, например, тимина и других нуклеиновых оснований.

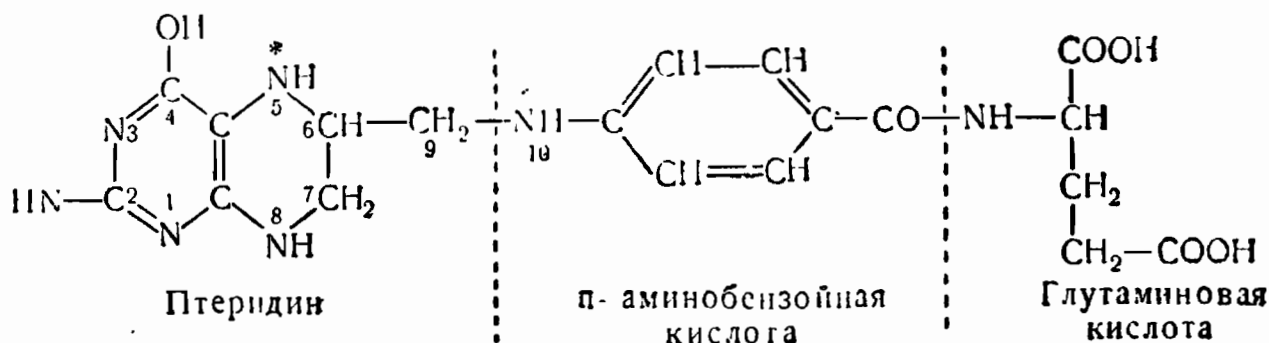
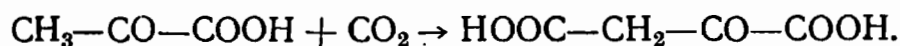


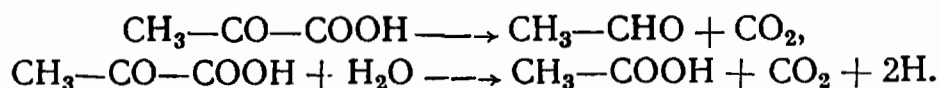
Рис. 36. Тетрагидрофолиевая кислота — переносчик одноуглеродных радикалов. Звездочками отмечено место присоединения этих радикалов

Близкую роль, по-видимому, выполняют коэнзимные формы витамина В₁₂. Этот витамин состоит из порфириновой части, упомянутой выше, и нуклеотидного компонента. Формулу его см. рис. 53 (стр. 130).

Коэнзимная форма биотина ответственна за реакцию β-карбоксилирования, т. е. присоединение углекислоты к кетокислотам. Таким путем, например, из пировиноградной кислоты синтезируется щавелевоуксусная кислота:

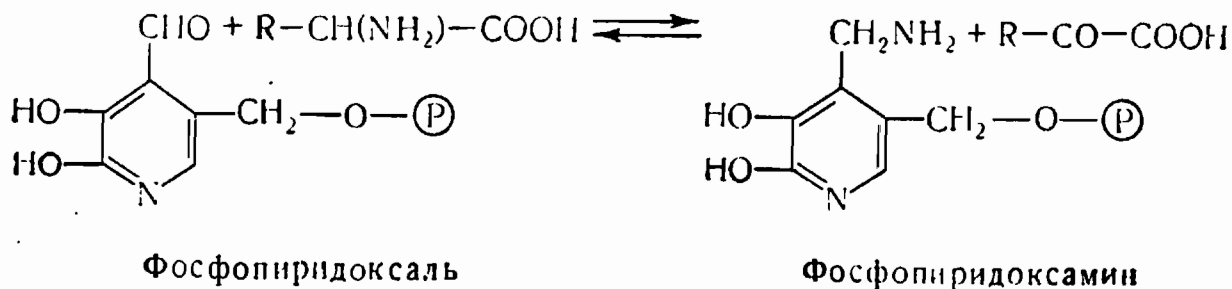


Наоборот, тиаминпирофосфат катализирует реакцию декарбоксилирования кетокислот, в частности декарбоксилирование той же самой пировиноградной кислоты с образованием из нее ацетальдегида или уксусной кислоты (в последнем случае говорят об окислительном декарбоксилировании):



Структурные формулы биотина и тиамина будут даны в гл. 4.

Ферменты, содержащие в простетической группе пиридоксаль, декарбоксилируют аминокислоты до аминов. Другие пиридоксальные ферменты участвуют в реакции переаминирования: они отщепляют группу $-\text{NH}_2$ от одной аминокислоты (превращая ее в кетокислоту, а затем передают аминогруппу другой кетокислоте, из которой в результате этого образуется новая аминокислота:

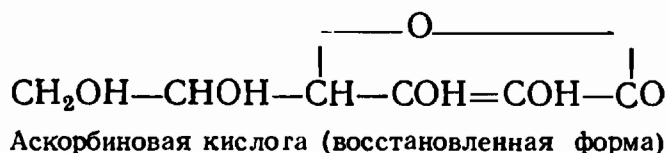


Прочие соединения. О метионине, выступающем в роли переносчика метильных групп, было уже сказано в начале этого раздела.

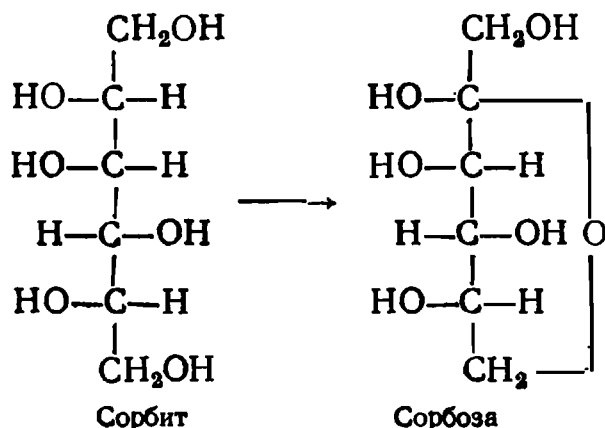
Таким же посредником в обмене веществ может служить другая аминокислота — глутаминовая. Вступая в реакцию переаминирования с какой-либо кетокислотой (причем в этой реакции участвуют фосфопиридоксальные ферменты), она превращается в α -кетоглутаровую кислоту. Последняя легко присоединяет к себе NH_3 и таким путем опять восстанавливается глутаминовая кислота, после чего цикл может повториться.

В окислительном цикле ди- и трикарбоновых кислот (о котором подробнее будет сказано в гл. 3) важная роль принадлежит щавелевоуксусной кислоте. При ее соединении с ацетатом синтезируется лимонная кислота. Затем следует ряд реакций окисления и декарбоксилирования, конечным продуктом которых снова является щавелевоуксусная кислота. Таким образом, одна и та же молекула названной кислоты, казалось бы, может неограниченно долго вращаться в окислительном цикле, каждый раз возрождаясь. В действительности этого не бывает, так как промежуточные продукты расходуются на биосинтетические процессы и к концу цикла щавелевоуксусной кислоты остается меньше, чем было вначале.

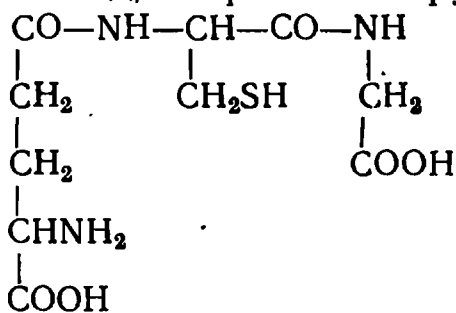
Посредником в окислительно-восстановительных превращениях является также аскорбиновая кислота (витамин С) — соединение, легко окисляемое газообразным кислородом:



В промышленном масштабе этот витамин синтезируют из сорбозы — углевода, не встречающегося в живой природе. В связи с этим сорбозу приходится готовить путем окисления многоатомного спирта сорбита с помощью уксусных бактерий, чаще всего *Acetobacter suboxydans*.

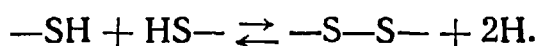


В окислительно-восстановительных превращениях участвует еще глутатион — трипептид, впервые обнаруженный в дрожжах:



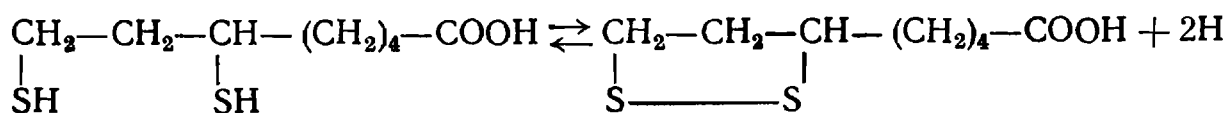
Глутатион (восстановленная форма)

Восстановленная форма глутатиона содержит сульфгидрильную группу. Такая же группа имеется в ряде других соединений. Обратимое превращение ее в дисульфидную группу играет большую роль в обмене веществ:



Сульфгидрильная группа присутствует, например, в коэнзиме А, упоминавшемся выше. Вместо Н к атому серы этого коэнзима может присоединяться остаток ацетата или сукцината.

Существует специальный переносчик атомов водорода при окислительных реакциях, обладающий той же группой — липоевая кислота (прежние названия — протоген, тиоктовая кислота):



Липоевая кислота вместе с тиамин-пирофосфатом участвует в окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты.

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

Различные стороны обмена веществ

Основные термины и понятия. В основе жизни и развития организмов лежит непрерывный обмен веществ с окружающей природой. Организм поглощает извне питательные вещества, зачастую очень далекие по своему химическому строению от веществ его тела, и затем перерабатывает их в специфические компоненты клеток. Процесс усвоения чужеродных веществ называется ассимиляцией. Ассимиляция представляет собой наиболее важную особенность живых существ. Только благодаря ей они могут расти и размножаться, неограниченно увеличивая свою биомассу. Совокупность ассимилятивных процессов известна под названием «строительного» или «конструктивного» обмена веществ.

Одновременно с ассимиляцией протекают противоположные ей процессы распада составных частей организма — диссимиляция. Продукты диссимиляции выделяются в окружающую среду или же частично вновь используются в обмене веществ.

Для осуществления работы по биосинтезу белков, нуклеиновых кислот и других сложных химических соединений клетке необходим приток энергии. Она получается в результате окисления и распада поступающих в организм питательных веществ, причем образующиеся продукты выбрасываются наружу. Окислительно-деструктивные процессы, протекающие с выделением необходимой для жизни энергии, носят название «энергетического обмена». Следует заметить, что у высших организмов окислению подвергаются запасные питательные вещества, отложившиеся внутри тела: углеводы, жиры, полипептиды. Но в клетках микробов резервные вещества обычно содержатся в небольших количествах. В связи с этим микроорганизмы используют для энергетического обмена главным образом вещества, поступающие из окружающей среды. И если у многоклеточных организмов понятия диссимиляции и энергетического обмена

почти совпадают, то у микробов они представляют собой разные явления.

Превращения, которым подвергаются питательные вещества, поглощенные клеткой, состоят из многочисленных и разнообразных биохимических реакций. Среди них имеют место как процессы синтеза и восстановления, носящие эндотермический (точнее — эндэргонический) характер, так и процессы распада и окисления, протекающие с освобождением энергии (экзотермически, экзэргонически). Процессы первого типа иногда называются «анаболизмом», процессы второго типа — «катаболизмом». Совокупность тех и других превращений именуют «метаболизмом». Метаболизм означает то же самое, что и промежуточный обмен веществ.

Механизм энергетических процессов. Каким путем энергия, выделяемая при энергетическом обмене, используется организмом на поддержание жизни и на рост биомассы? Вопрос этот разрешился не сразу. С давних пор, еще со времен Лавуазье, дыхание уподобляли медленному горению, имея в виду, что в обоих случаях поглощается кислород и выделяются углекислый газ и вода. В научно-популярных книгах принято было сравнивать организм с машиной, которая приводится в движение за счет энергии сгорания топлива. Отголосок этих старых представлений находит отражение в том, что энергетический эффект бродильных и дыхательных процессов нередко и теперь характеризуют количеством калорий, т. е. количеством выделенного тепла.

Только в XX веке было установлено, что тепловая энергия не может быть использована на биосинтез веществ живого тела. Энергия, перешедшая в форму тепловой, потеряна для организма. Если бы и можно было назвать его машиной, то во всяком случае не тепловой, а химической, или еще точнее — электрохимической машиной. Действительно, организм может утилизировать только энергию химических реакций. Эта энергия вместе с электронами или атомами непосредственно переходит от одного соединения к другому, не превращаясь в тепловую.

В свое время шли длительные дискуссии о механизме дыхательных процессов. По одним представлениям, биологическое окисление органических веществ происходит главным образом за счет дегидрирования, т. е. отщепления водорода (Г. Виланд и другие авторы). По мнению О. Варбурга и других исследователей, главное в окислительных процессах — это активация молекулярного кислорода. В. И. Палладин, А. Н. Бах и другие биохимики наибольшую роль приписывали воде, считая, что окислительные и восстановительные превращения протекают в виде сопряженных реакций, в которых деятельное участие принимают кислород и водород, содержащиеся в молекуле воды.

В настоящее время сложилась единая теория биоэнергетических процессов, где нашли себе место элементы всех трех упомянутых представлений. Согласно этой теории, первичное окисление углеводов и других органических веществ осуществляется путем отщепления водорода, передающегося затем по цепи ферментов, чтобы в конце концов соединиться с кислородом атмосферы и образовать воду. В реакциях промежуточного обмена веществ роль посредника часто принадлежит воде. За счет имеющихся в воде водорода и кислорода происходят сопряженные окислительно-восстановительные реакции между атомами углерода. В результате их, с одной стороны, получают восстановленные углеродные радикалы (CH_3 , $-\text{CH}_2$, $\text{CH}=\text{}$), и с другой стороны, углеродные атомы окисляются с образованием карбонильных (CHO , CO) и карбоксильных групп (COOH).

На рис. 37 показана последовательность работы ферментов, переносящих водород от некоторых органических кислот к молекулярному кислороду. Известен и ряд других окислительных ферментных систем. В частности, ДПН в таких системах может быть заменен на ТПН или же вообще отсутствовать. Вместо ФАД может стоять ФН (рис. 33). У большинства бактерий нет коэнзима Q.

Чтобы дать более конкретные представления о процессах биологического окисления,

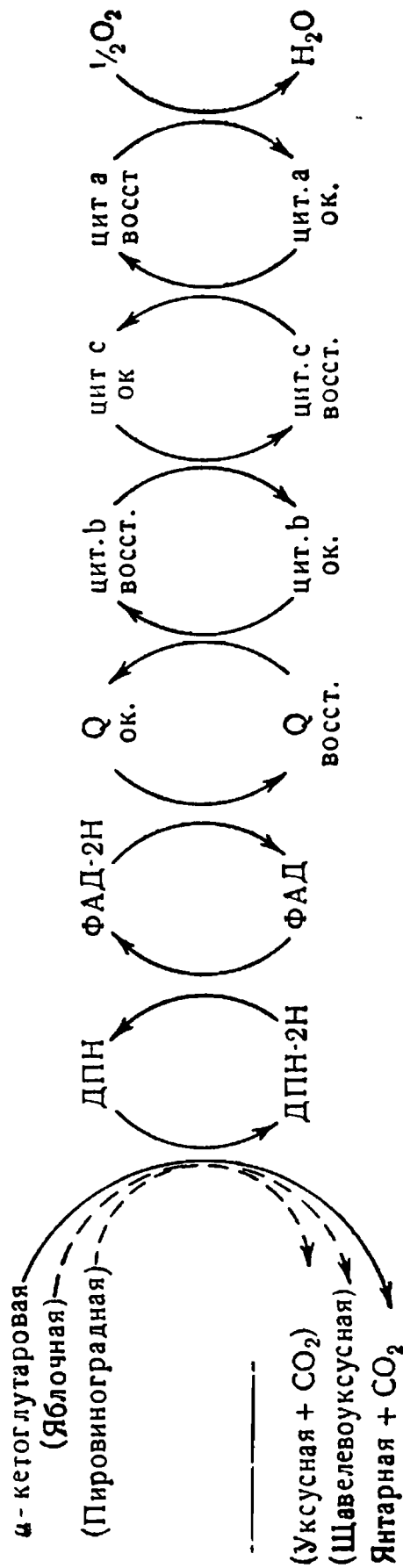


Рис 37. Передача атомов Н от некоторых кислот цикла Кребса через систему дегидраз и оксидаз к атмосферному кислороду

ДПН — дифосфопиридиннуклеотид; ФАД — флавин-аденин-динуклеотид; Q — коэнзим Q, цит — цитохромы, восст — восстановленная форма, ок — окисленная форма

рассмотрим так называемый цикл Кребса (цикл ди- и трикарбоновых кислот). Он схематически изображен на рис. 38, причем с целью упрощения ферменты и коэнзимы не показаны. Окислительному циклу предшествует анаэробное расщепление углеводов, в процессе которого образуются триозы (глицериновый альдегид и диоксиацетон). После ряда превращений триозы преобразуются в пировиноградную кислоту, причем освобождается

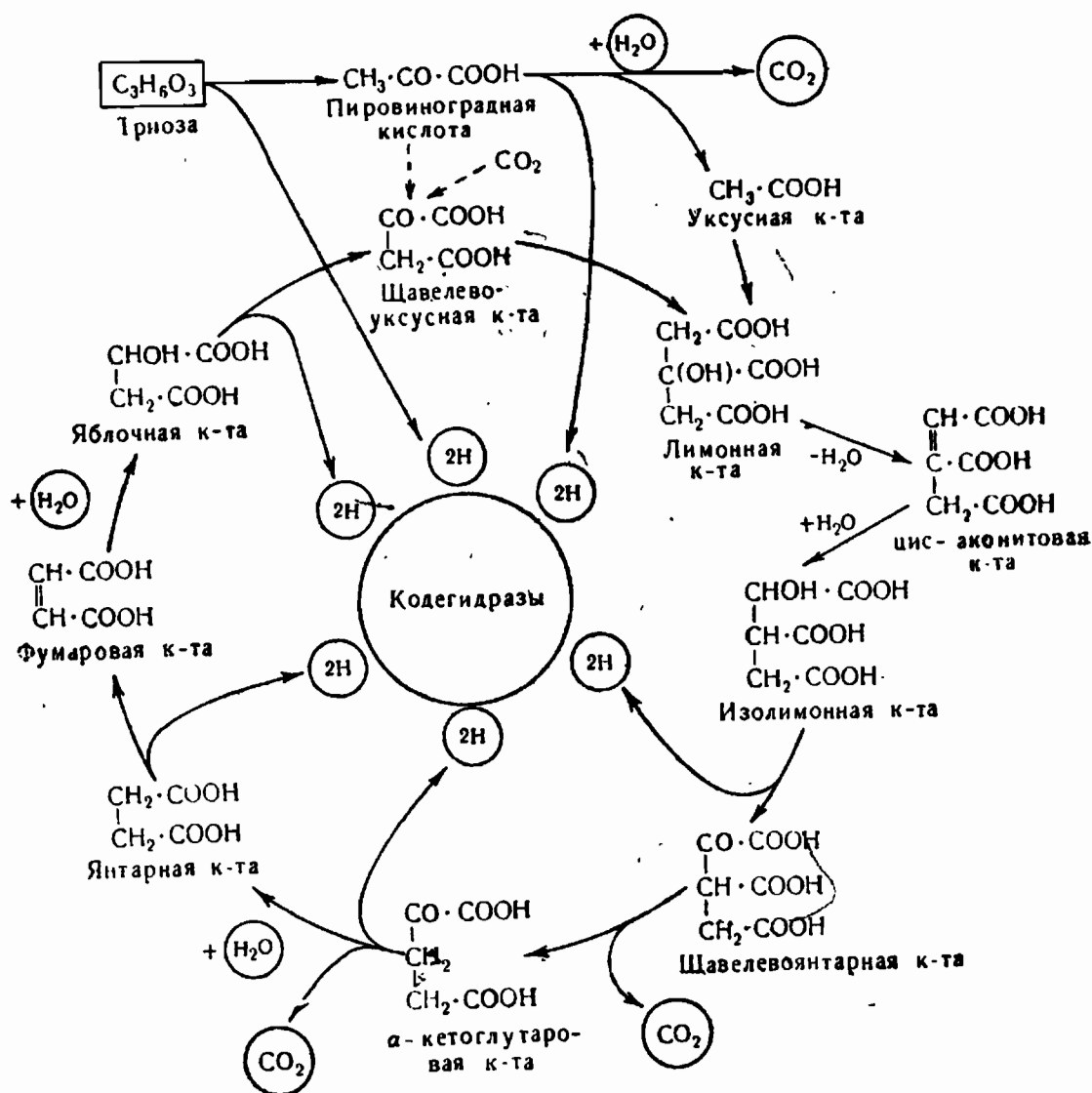
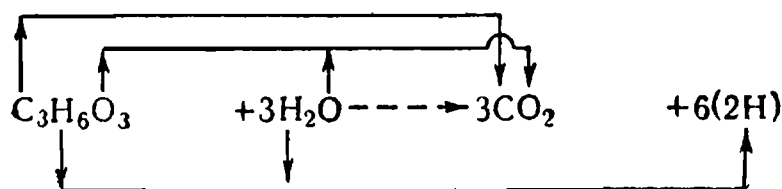


Рис. 38. Цикл Кребса (цикл ди- и трикарбоновых кислот)

водород, который связывается кодегидразами. Далее происходит окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты в уксусную. Освободившийся при этом водород также захватывается соответствующими дегидрирующими ферментами. Ацетат через посредство коэнзима А вступает в соединение с щавелевоуксусной кислотой. Последняя через несколько этапов превращается в щавелевоянтарную кислоту, которая в свою очередь декарбоксилируется в α-кетоглутаровую. Затем следует еще ряд реакций дегидрирования и декарбоксилирования с образованием янтарной и других кислот. Конечным продуктом является

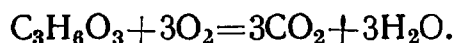
щавелевоуксусная кислота. Тем самым круг завершается: снова восстанавливается молекула щавелевоуксусной кислоты, а от уксусной кислоты, которая с ней в свое время соединилась, ничего больше не остается: она вся разложилась до углекислого газа. Общий баланс этого цикла выглядит так:



Мы видим, что весь исходный субстрат окислился до углекислоты, хотя атмосферный кислород и не принимал в этом участия. Окисление происходило за счет присоединения к субстрату кислородных атомов воды и отщепления от него атомов водорода.

Водород, захваченный кодегидразами, в дальнейшем может пройти по цепочке цитохромов и соединиться с молекулярным кислородом. В этом случае приведенное выше уравнение примет следующий вид:

$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O} + 3\text{O}_2 = 3\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$. Сократив по $3\text{H}_2\text{O}$ в каждой половине уравнения, получим классическое уравнение дыхания:



Мы видим, что произошло полное окисление триозы — как бы «сгорание» ее до углекислоты и воды, если судить по уравнению реакции. При этом организм не получил для себя никакой пользы — окисление прошло «на холостом ходу».

В действительности так и случается в опытах с препаратами разрушенных клеток, где не могут иметь место биосинтетические процессы. Но в живом организме наблюдается иная картина (рис. 39). Часть освободившейся энергии аккумулируется в макроэргических связях АТФ (гл. 2). Водород, уловленный кодегидразами, передается затем ими на те или иные восстановительные реакции, в результате чего количество образовавшейся воды становится меньше теоретического. Промежуточные продукты распада триозы частично используются на биосинтетические процессы. В частности, из пировиноградной кислоты может образоваться аланин, из α -кетоглутаровой — глутаминовая кислота, из фумаровой и щавелевоуксусной кислот — аспарагиновая кислота. Уксусная кислота может служить материалом для синтеза высших жирных кислот, стероидов и других соединений. В результате всего этого баланс по углероду нарушится, в связи с чем приведенное выше уравнение дыхания не будет отражать действительности.

Для характеристики дыхательного процесса обычно пользуются дыхательным коэффициентом, т. е. соотношением $\frac{CO_2}{O_2}$. В случае полного окисления триоз он должен быть равен 1. При

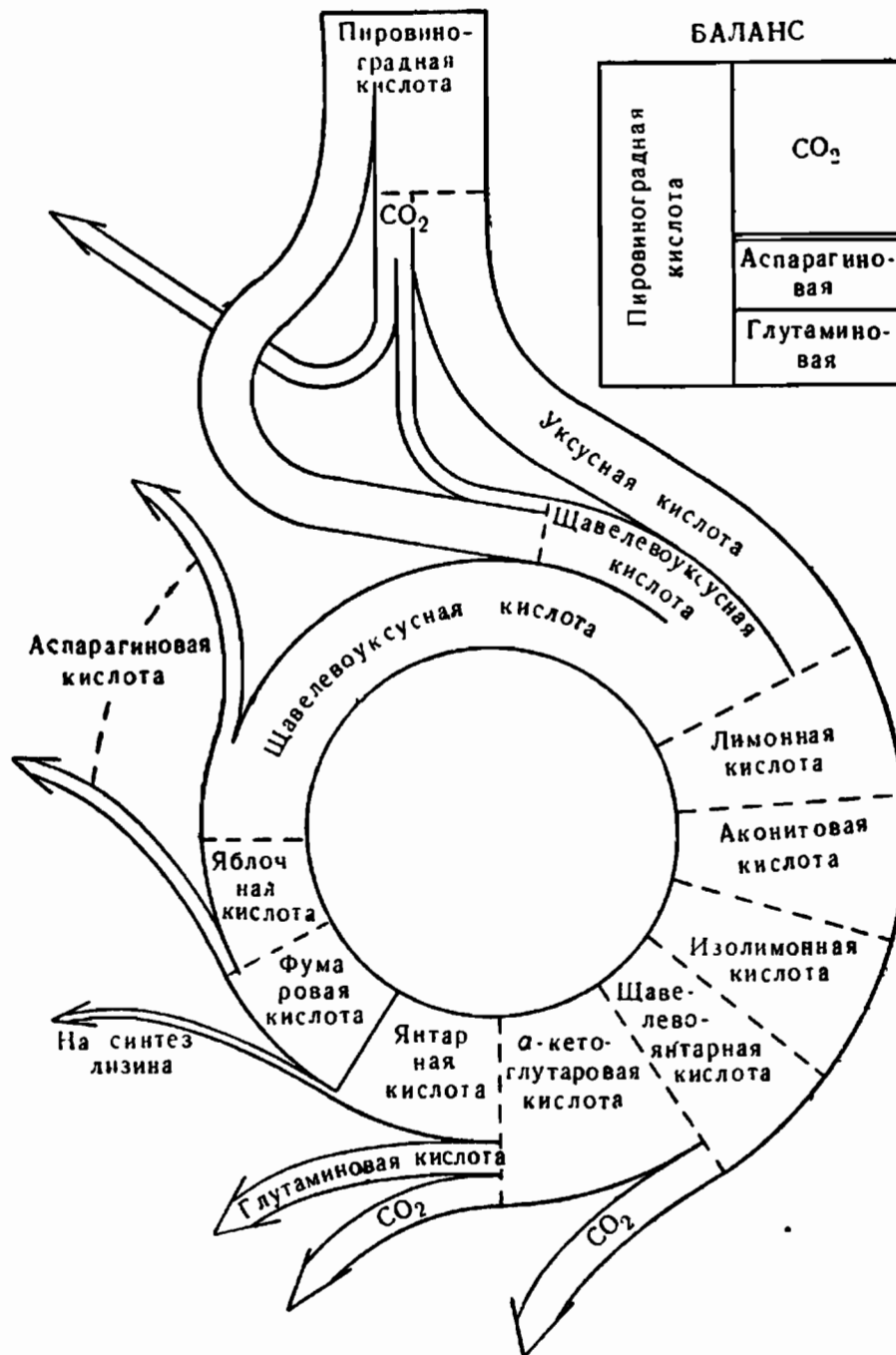
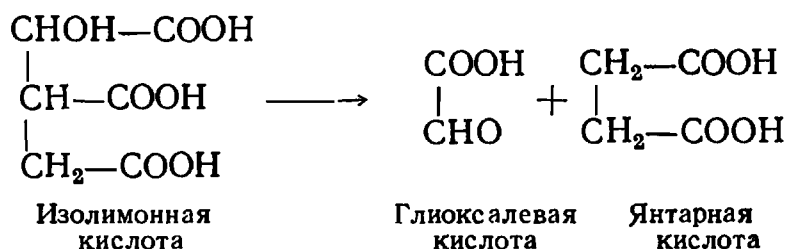


Рис. 39. Баланс разложения пировиноградной кислоты через цикл Кребса грибом *Zygorrhynchus moelleri*. Диаграмма составлена по данным Moses, 1957

окислению жиров, где содержится много восстановительных углеродных радикалов, этот коэффициент падает примерно до 0,8. В случае богатых кислородом соединений (например, винная кислота) он становится больше 1. Но в живом развивающемся организме дыхательный коэффициент всегда отличается от теор-

ретического, т. к. промежуточные продукты окислительного распада используются на нужды строительного обмена.

Цикл ди- и трикарбоновых кислот является важным, но не единственным путем, по которому идет окисление веществ в процессе дыхания. По-видимому, он существует не у всех аэробных микроорганизмов. У других микроорганизмов наблюдаются видоизменения этого цикла. В частности, изолимонная кислота может распадаться на янтарную и глиоксальевую кислоту, минуя стадию щавелевоянтарной и α -кетоглутаровой кислот:



Глиоксальная кислота конденсируется затем с уксусной, образуя яблочную кислоту:

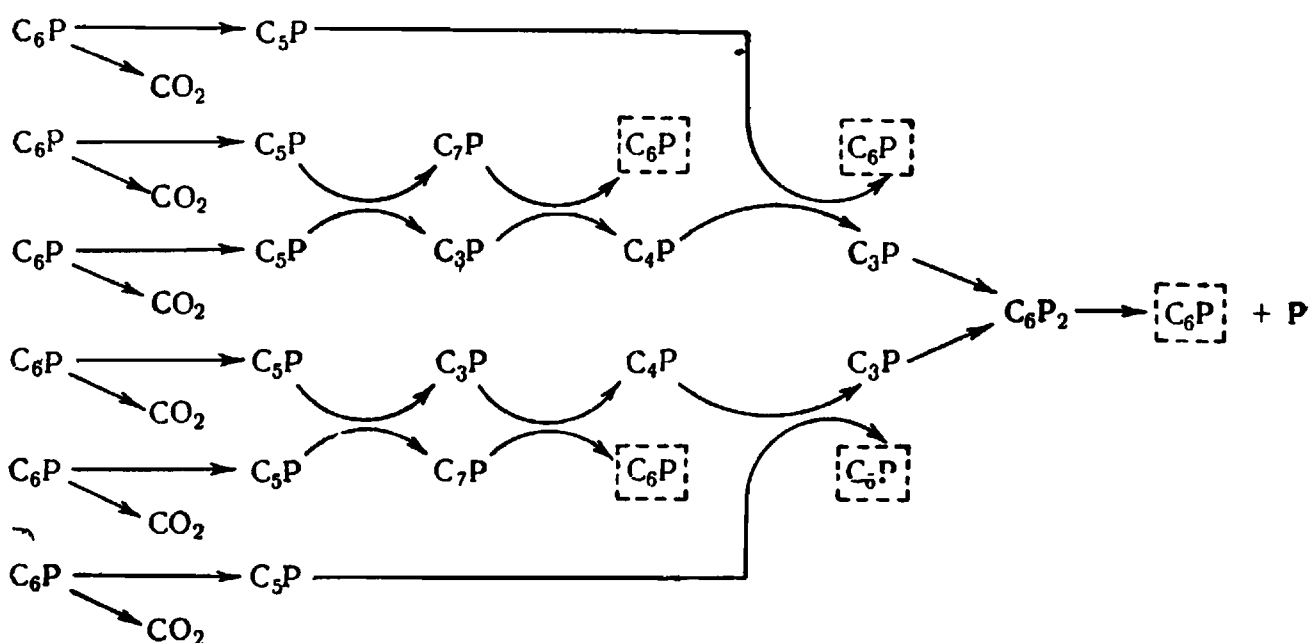
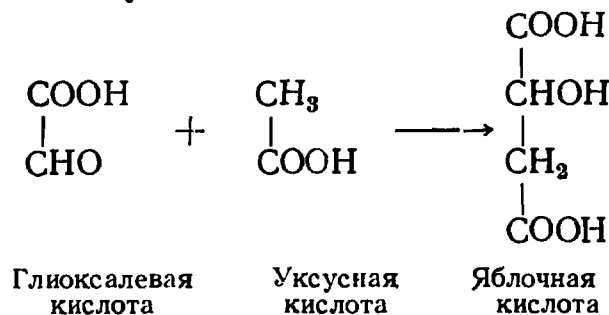
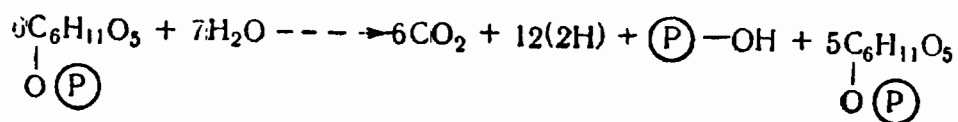


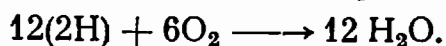
Рис. 40 Монофосфатный цикл окисления сахаров

P — фосфат, C_6 — глюкоза, фруктоза и кетоглуконная кислота; C_5 — рибоза и рибулоза, C_4 — эритроза, C_7 — седогептулоза

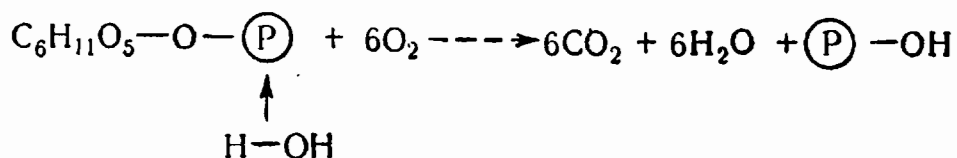
Существует еще так называемый монофосфатный цикл, при котором глюкоза фосфорилируется и окисляется в 6-фосфоглюконовую кислоту, а последняя через ряд сложных превращений частично окисляется до углекислоты, частично восстанавливается опять в глюкозо-6-фосфат (рис. 40). Не вдаваясь в подробности, приведем только суммарное уравнение реакции:



Отщепившийся от субстрата активный водород через посредство окислительных ферментов может соединиться с атмосферным кислородом так же, как и при цикле Кребса:

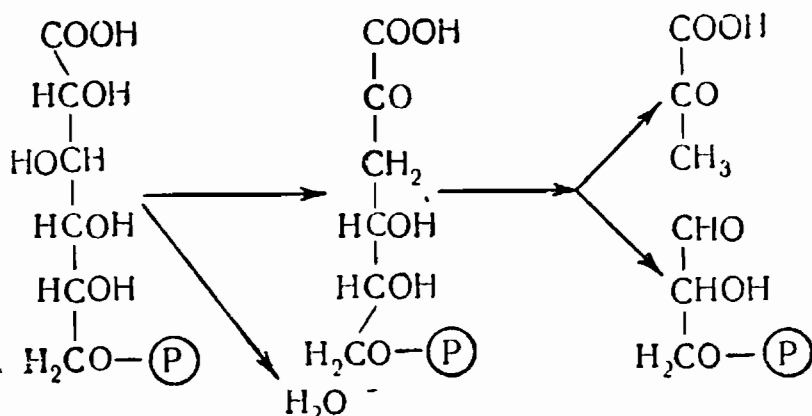


Если мы впишем кислород в приведенное выше уравнение, а затем сделаем соответствующие сокращения в правой и левой его половинах, то получим следующее равенство:



Таким образом, суммарный итог монофосфатного цикла окисления равнозначен тому, который принято изображать с помощью классического уравнения дыхания: создается впечатление, будто бы одна молекула сахара целиком окислилась до углекислоты и воды за счет молекулярного кислорода. В действительности, как мы видели выше, механизм окисления совсем иной, в нем участвуют 6 молекул глюкозы.

Цикл Энтнер-Дудорова отличается от предыдущего тем, что фосфат глюконата, отщепив от себя молекулу воды, превращается в 2-кето-3-дезоксиглюконат, который затем через промежуточные ступени распадается на пировиноградную кислоту и 3-фосфоглицериновый альдегид:



Глицериновый альдегид через ряд этапов может в свою очередь окислиться в пировиноградную кислоту. Образовавшиеся при этом две молекулы пирувата будут окончательно разложены до углекислоты по циклу Кребса, если, конечно, организм не использует их на биосинтетические нужды.

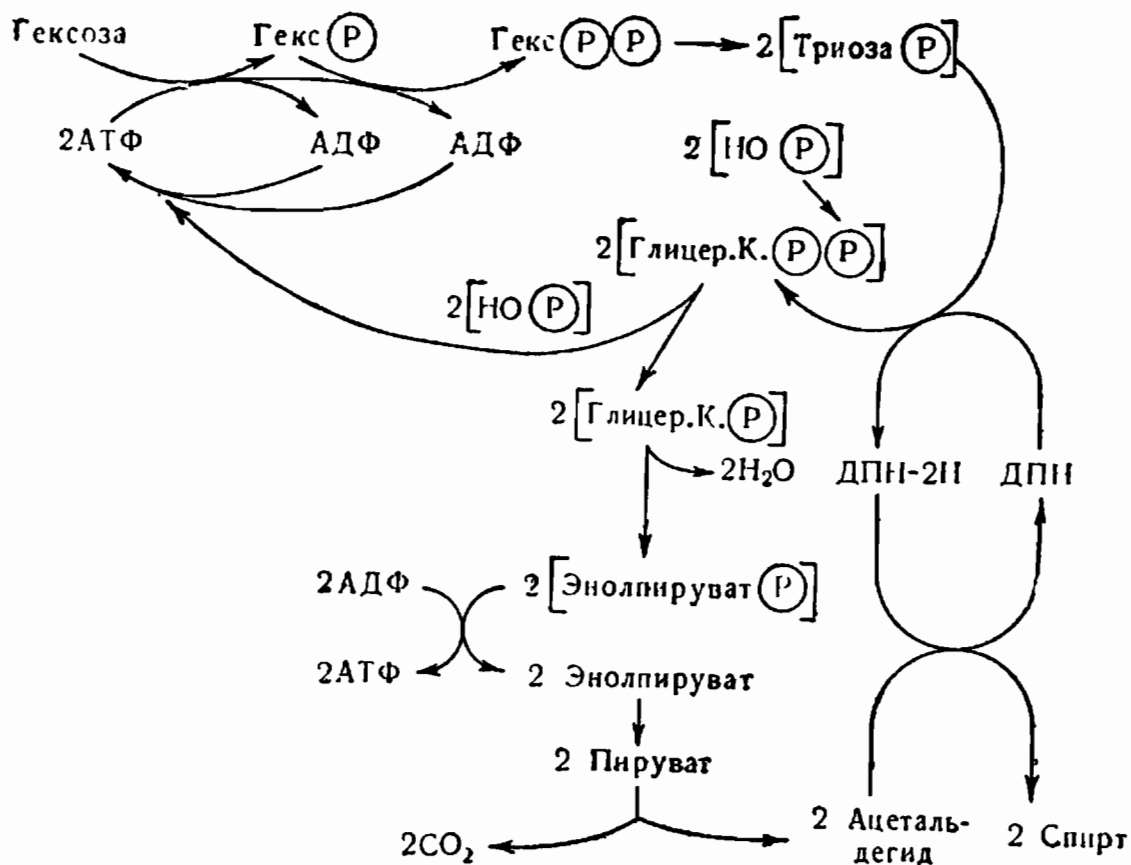


Рис. 41. Сокращенная схема спиртового брожения

Рассмотренные выше окислительные превращения начинаются с дегидрирования, в котором атмосферный кислород не принимает никакого участия. В этом отношении они напоминают типичные анаэробные процессы, например спиртовое брожение. По схеме Эмбдена-Мейергофа с внесенными в нее последующими коррективами этот последний процесс распадается на ряд ступеней (рис. 41).

Общий баланс спиртового брожения выглядит так:

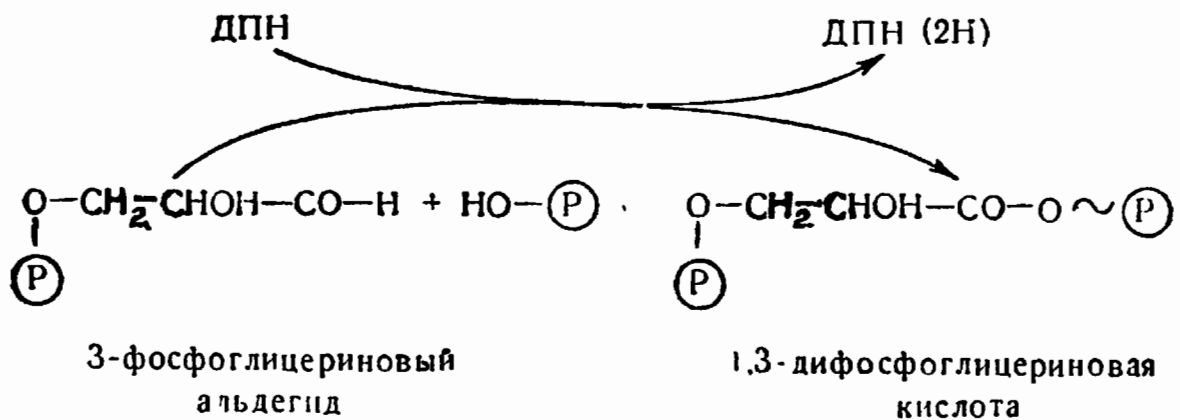


На основании последнего уравнения можно заключить, что биологический смысл брожения сводится к образованию двух молекул АТФ путем присоединения минерального фосфата и АДФ, поскольку основные продукты брожения — спирт и углекислота — не нужны дрожжевым организмам, возбудителям данного процесса. Что касается АТФ, то она ценна в качестве своеобразного аккумулятора энергии, которую организм может

в дальнейшем использовать для удовлетворения своих жизненных потребностей.

Однако такое заключение будет не совсем точным. Приведенный выше баланс брожения составлен по работам с бесклеточными дрожжевыми препаратами. В растущих клетках дело происходит несколько иначе. Часть промежуточных продуктов брожения (пировиноградная кислота, ацетальдегид и водород) используется на биосинтез веществ протоплазмы, в результате чего сумма конечных продуктов оказывается меньше количества разложенного сахара. Следовательно, польза, получаемая организмом от брожения, не исчерпывается только образованием АТФ с ее макроэргическими связями.

Как возникают такие связи, откуда поступает в них энергия? Эта энергия освобождается при окислении органических веществ. В качестве примера рассмотрим реакцию окисления альдегидной группы ($-\text{CHO}$) фосфоглицеринового альдегида в карбоксил ($-\text{COOH}$) с одновременным присоединением минерального фосфата и образованием макроэргической связи:



Энергия, освободившаяся при окислении глицеринового альдегида, идет по трем направлениям. Часть ее теряется в виде тепла, благодаря чему реакция в целом носит экзотермический характер. Экзотермичность служит необходимым условием для того, чтобы реакция могла протекать самопроизвольно (в термодинамическом смысле слова). Вторая часть энергии, как уже сказано, накапливается в макроэргической связи 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, откуда она позднее перейдет в АТФ. И наконец, третья часть освободившейся энергии вместе с водородом переходит в кодегидразу.

Спиртовое брожение — лишь один из примеров анаэробных энергетических процессов. Существует, как известно, и много других брожений, химизм которых менее изучен.

Взаимосвязь между различными путями энергетического обмена изображена на рис. 42. Необходимо заметить, что многие микроорганизмы наделены способностью переключаться с одного типа обмена на другой в зависимости от условий питания и аэрации.

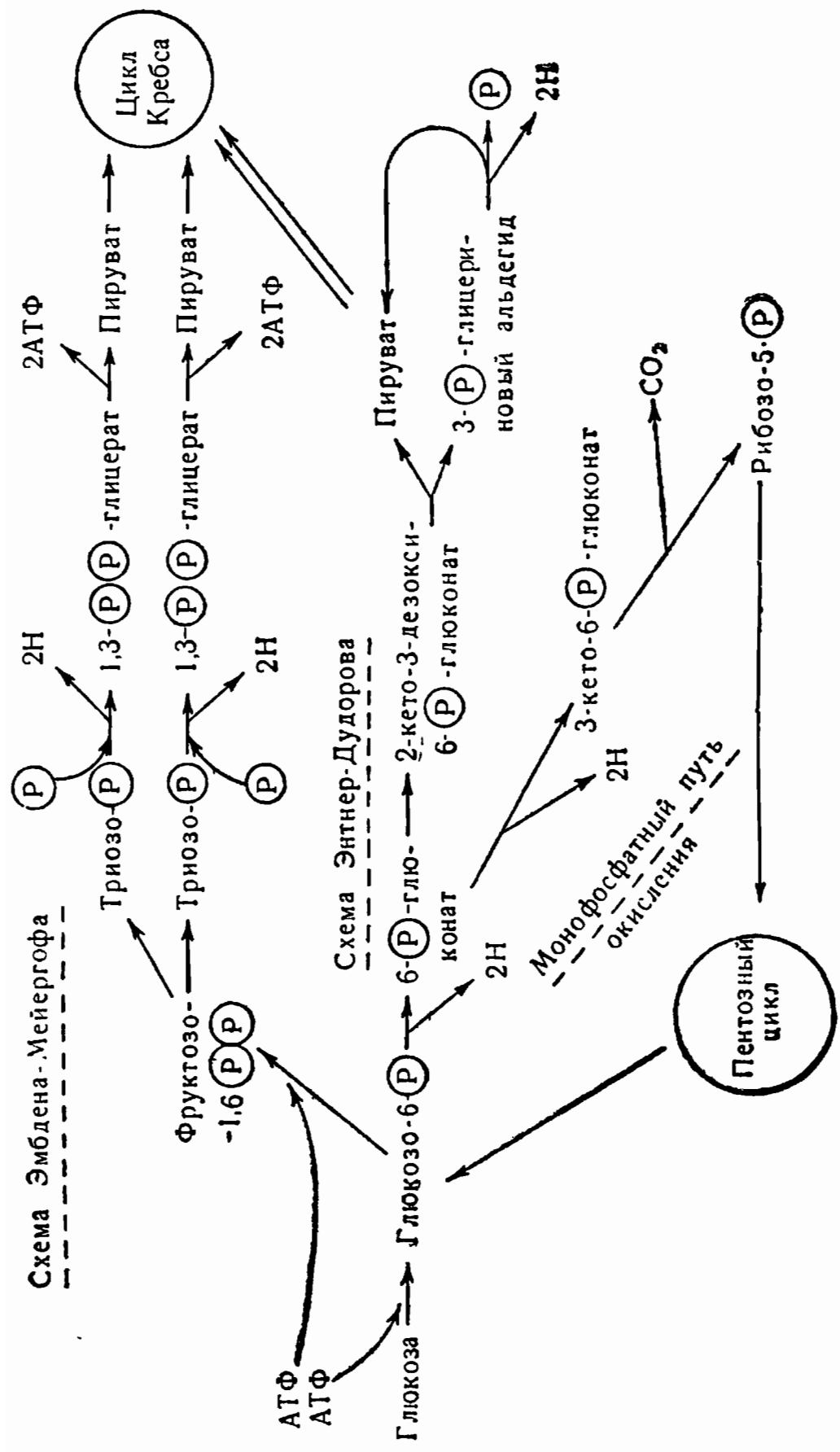


Рис. 42. Взаимосвязь различных типов энергетического обмена

Строительный обмен веществ. Выше уже упоминалось о процессах, в итоге которых синтезируется АТФ — вещество, более богатое энергией, чем исходный материал (АДФ), хотя реакция в целом протекает с выделением тепла (экзотермично). Тезис об экзотермичности биологических синтезов, кажущийся на первый взгляд парадоксальным и непонятным, был

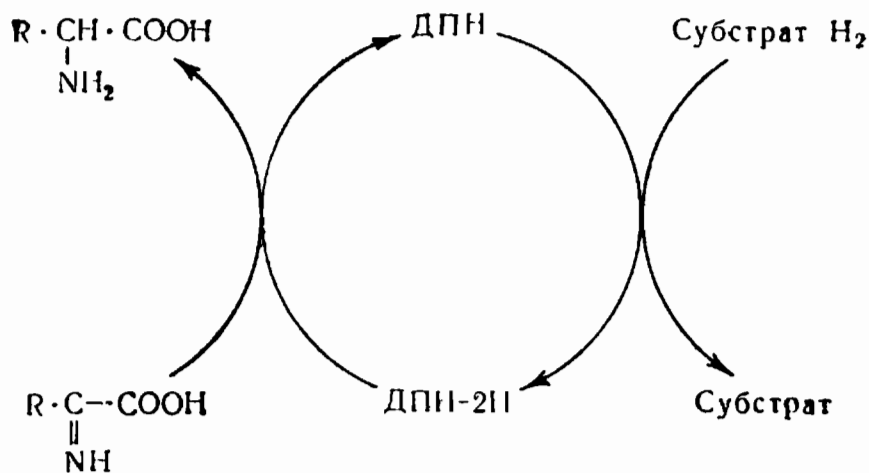
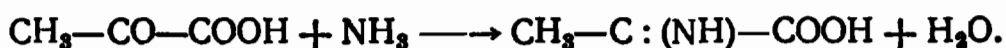


Рис. 43. Схема биосинтеза аминокислот за счет окисления какого-либо другого субстрата

сформулирован В. О. Таусоном (1950) еще в 40-х годах. Разгадка заключается в том, что биосинтетические процессы протекают не изолированно, а в виде сопряженных окислительно-восстановительных реакций. При этом общее количество освобождающейся энергии превышает то, которое необходимо для осуществления синтеза. Часть ее рассеивается в виде тепла, чем и обеспечивается экзотермичность процесса.

Накопившиеся с тех пор данные показывают, что в качестве второго члена в такой сопряженной реакции обычно участвуют коэнзимы и макроэргические соединения. Примером может служить биосинтез аланина из пировиноградной кислоты и аммиака. Первый этап состоит в присоединении аммиака с образованием иминокислоты:

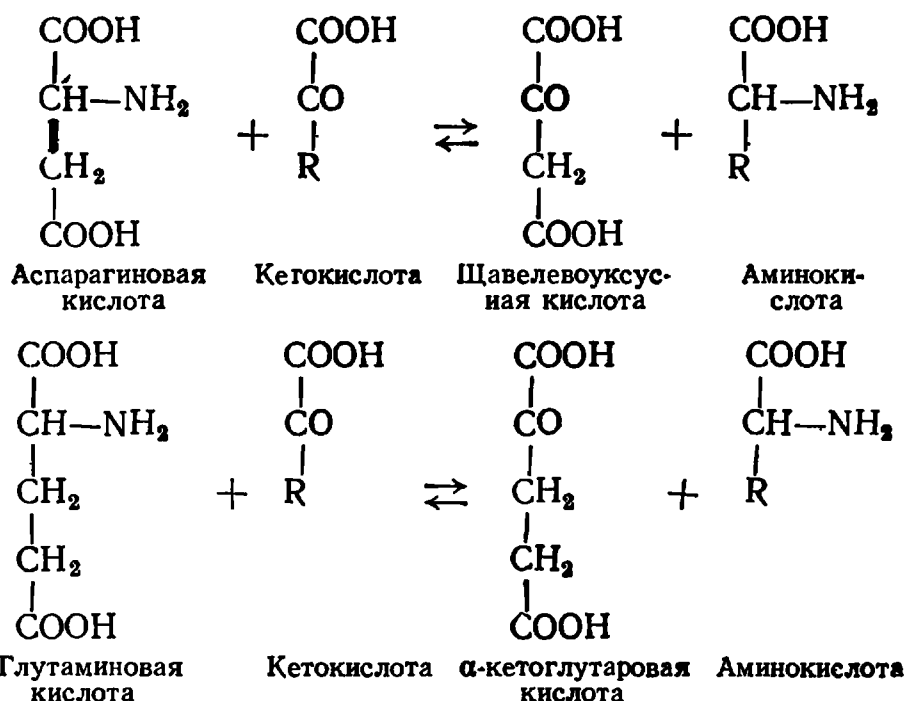


Есть основания полагать, что данный процесс протекает без больших энергетических затрат.

Вслед за этим иминогруппа восстанавливается до аминокислоты. Восстановление ее происходит за счет водорода, захваченного ранее кодегидразой от окисляемого субстрата. Отдав водород, кодегидраза переходит в окисленную форму (рис. 43). Часть освободившейся при этом энергии выделяется в форме тепла. Если рядом будет находиться субстрат поставщик водорода, кодегидраза опять вернется в восстановленное состояние, причем эта реакция также будет носить экзотермический

характер. Восстановленная кодегидраза сможет прореагировать с новой молекулой иминокислоты. Перенос водорода от окисляемого субстрата к иминокислоте через посредство кофермента будет продолжаться до тех пор, пока одно из этих веществ (субстрат или иминокислота) не израсходуется до конца.

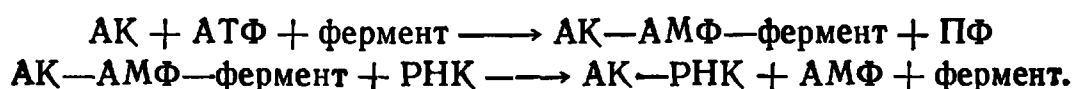
Прямое аминирование кетокислот происходит не всегда. По этому способу синтезируются только аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты и, может быть, еще некоторые аминокислоты. Остальные аминокислоты образуются путем взаимодействия с ними за счет реакции переаминирования:



С целью упрощения в приведенных реакциях не отражено, что посредниками в переаминировании служат пиридоксальные ферменты.

На рис. 44 изображены более сложные биохимические превращения, связывающие три аминокислоты: аргинин, пролин и глутаминовую кислоту. Участие ферментов, а также поставщиков энергии на схеме не показано.

Важную роль в биосинтетических процессах играют коферменты, обладающие макроэргическими связями: АТФ, УТФ (уридинтрифосфат), коэнзим А и др. В результате их временного присоединения к исходным веществам, энергетический потенциал последних становится более высоким, чем у конечных продуктов реакции. Благодаря этому синтетическая реакция может протекать с выделением энергии, экзотермично. В качестве примера приведем биосинтез пептидов из аминокислот. Предварительная активация аминокислотной молекулы происходит так:



В этих уравнениях АК — аминокислота, АМФ — аденозинмонофосфат, ПФ — минеральный пирофосфат и РНК — растворимая фракция РНК.

Активированные аминокислоты, соединенные с растворимой РНК, переходят в рибосомы клетки, где и происходит их связывание в пептиды, причем РНК опять освобождается.

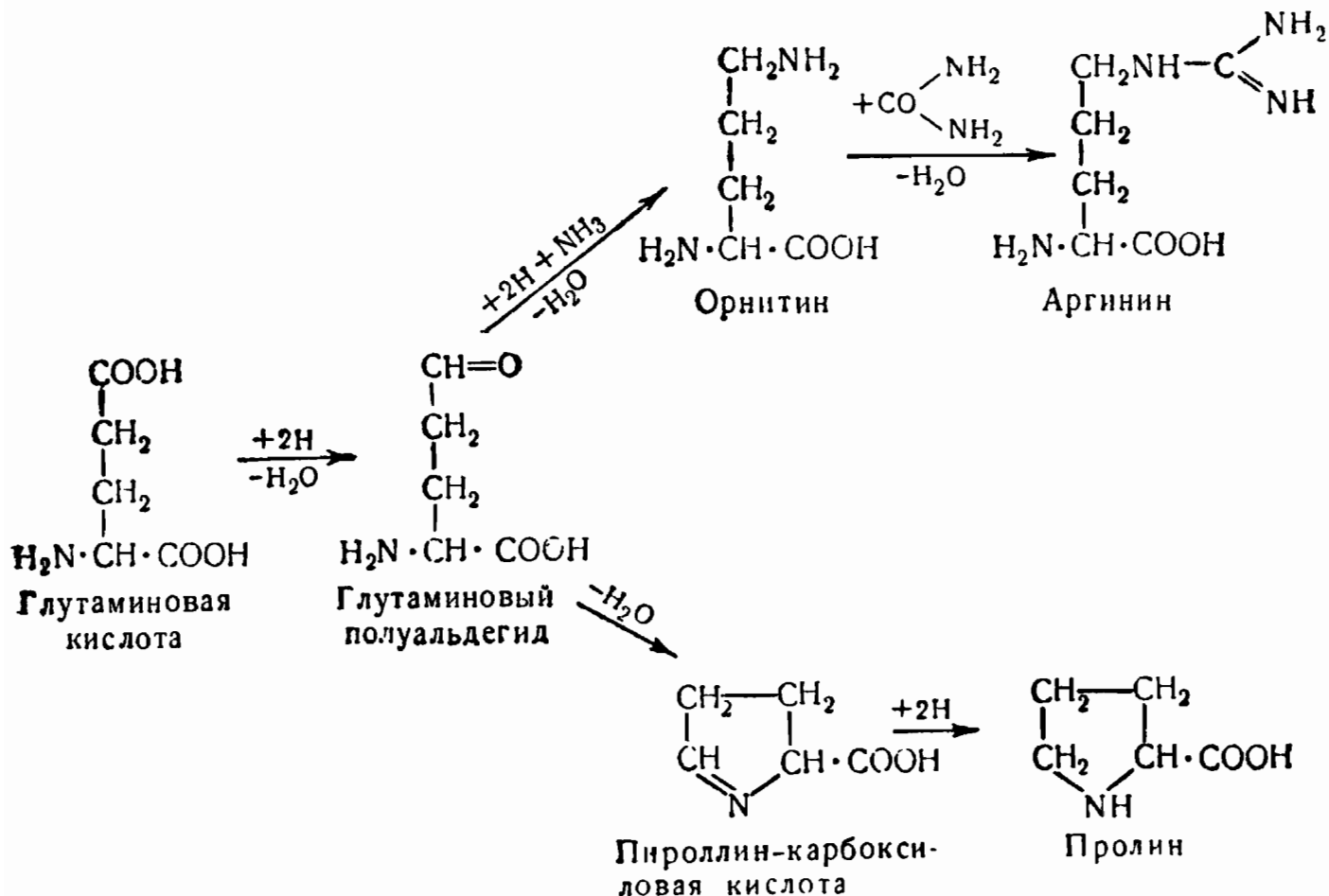
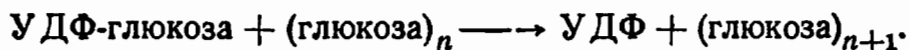
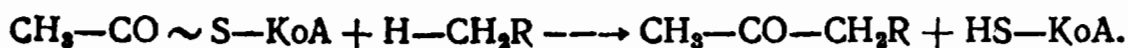


Рис. 44. Образование аргинина и пролина из глутаминовой кислоты

При биосинтезе полисахаридов источником энергии обычно служит уридиндифосфат (УДФ), присоединившийся к моносахариду:



Строительным материалом для высших жирных кислот, стероидов и других веществ протоплазмы является уксусная кислота. Сначала ацетат образует комплекс с коэнзимом А, причем возникает макроэргическая связь. Переход ацетильной группы из этого комплекса к другим веществам влечет за собой разрушение макроэргической связи с выделением энергии, что придает биосинтетической реакции экзотермический характер:



Основной обмен. Клетка обладает закономерной организацией, тело ее построено из различных макро- и микроструктур. Благодаря наличию структур, в разных точках клетки могут одновременно протекать противоположные и несовместимые между собой процессы. Протоплазма неоднородна, т. к. в ней существуют градиенты концентраций, осмотических давлений, электрохимических потенциалов. Этим обеспечивается возможность диффузионного перемещения веществ и других физико-химических процессов.

Но в соответствии со вторым принципом термодинамики, все процессы должны идти в сторону нивелирования и обесценивания энергии. В результате диффузии выравниваются осмотические давления и концентрации веществ, исчезает разность окислительно-восстановительных потенциалов; коллоиды теряют свои заряды, обезвоживаются и свертываются. Поэтому для сохранения полярности и неравновесности живой системы, необходим постоянный приток энергии, подобно тому как для поддержания волн на поверхности воды необходимо действие ветра. Некоторые бактерии обладают подвижностью, что также сопряжено с энергетическими затратами.

Наряду с указанными физико-химическими изменениями, в клетке непрерывно происходит диссимилятивный распад составляющих ее веществ. Свойственное живым существам постоянство формы имеет не статический, а динамический характер. Тимирязев образно сравнивал его с постоянством формы струи, выбрасываемой фонтаном. Радиоизотопный метод подтверждает, что даже в тех случаях, когда качественный и количественный состав белков протоплазмы остается по видимости неизменным, от их молекул отрываются атомы и радикалы, заменяясь новыми.

В связи со сказанным, клетка вынуждена затрачивать часть поглощенных веществ на восстановление своих распавшихся компонентов. Такого рода затраты «на текущий ремонт» также входят в понятие основного обмена.

Следовательно, под основным обменом надо подразумевать процессы превращения энергии и веществ, которые необходимы для поддержания жизнеспособности клетки, независимо от того, растет ли она или пребывает в покоящемся состоянии.

Баланс обмена веществ. Взаимоотношение различных сторон обмена веществ показано на схеме (рис. 45). Поглощенные клеткой питательные вещества идут по двум основным направлениям. Часть их ассимилируется и перерабатывается в компоненты протоплазмы. Тем самым обеспечивается, во-первых, прирост биомассы, во-вторых, ресинтез распавшихся веществ клетки. Другая часть питательных веществ разлагается и окисляется, освобождая нужную для жизни энергию. Остатки этих веществ продукты энергетического обмена -

выделяются наружу вместе с продуктами диссимиляции компонентов тела. Некоторая часть усвоенных веществ откладывается в виде запасных отложений (жиров, гликогена, волютина). В дальнейшем клетка использует эти отложения наравне со вновь поступающими питательными веществами.

Таким образом, в итоге сложных биохимических превращений, с одной стороны, образуются продукты обмена, с другой стороны, происходит прирост биомассы. По этим конечным результатам мы можем судить об интенсивности энергетического и строительного обмена веществ.

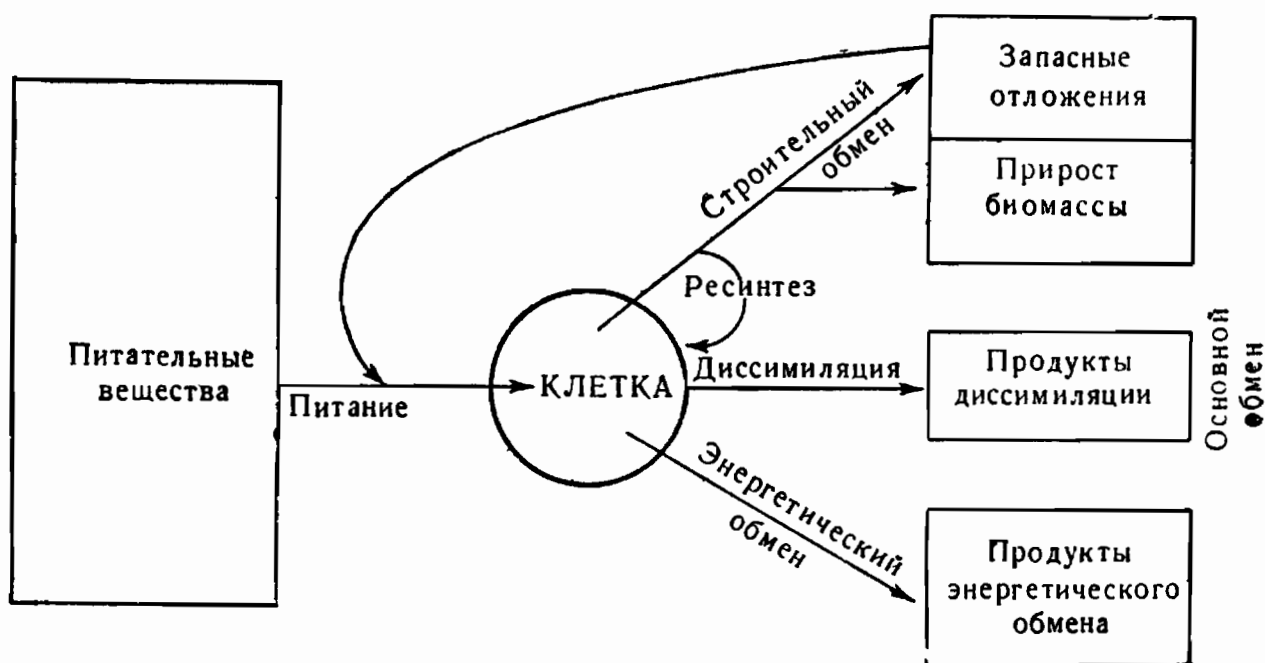


Рис 45 Схема питания и обмена веществ

Не следует, однако, забывать, что идущие в клетке процессы синтеза и распада тесно между собой связаны. Судьба одних и тех же промежуточных продуктов, образующихся при разложении питательных веществ, может сложиться по-разному. В одних случаях они ассимилируются и входят в состав живого тела, в других случаях превращаются в конечные продукты обмена, выбрасываемые в окружающую среду. Соотношение между ассимилированными и выделенными веществами варьирует в широких пределах, в зависимости от физиологического состояния организма и условий среды. Быстро растущие клетки более продуктивно используют питательные вещества на биосинтез компонентов своего тела. Затраты на поддержание жизни занимают небольшое место в общем балансе их обмена веществ. Напротив, неразмножающиеся клетки расходуют питательные вещества (или внутриклеточные запасные отложения) только на основной обмен. В связи с этим их физиологическая активность (учитываемая по количеству перерабатываемых питательных веществ) резко падает.

Диспропорция в составе питательной среды может послужить причиной неэкономного использования питательных веществ в качестве строительного и энергетического материала. Например, у дрожжей и плесневых грибов при избытке углеводного питания, равно как и при недостаточном притоке кислорода, происходит то, что Таусон (1950) образно называл «неудавшимся синтезом»: недоокисленные и неусвоенные организмом продукты подураспада углеводов стабилизируются и выбрасываются наружу в виде спирта или органических кислот.

И наконец, следует еще предостеречь от упрощенного представления о том, будто бы все процессы, составляющие в совокупности энергетический обмен веществ, обязательно имеют экзотермический характер. Например, при спиртовом, масляно-кислом и молочнокислом брожениях полезная энергия освобождается в процессе разложения сахара до пировиноградной кислоты. Чтобы из пировиноградной кислоты могли образоваться конечные продукты брожения (спирт, масляная кислота, молочная кислота), должны произойти реакции восстановления, на которые расходуется ценный для организма водород, содержащийся в кодегидразах. Организм вынужден идти на такие жертвы, по-видимому, потому, что это позволяет ему освободиться от токсичных промежуточных продуктов.

В предыдущей главе упоминалось о реакции β -карбоксилирования, в результате которой из пирувата образуется щавелевоуксусная кислота. В реакции участвует АТФ, она протекает с поглощением энергии. Но организм не может обойтись без такой экономически невыгодной реакции, так как она позволяет ему пополнять недостаток щавелевоуксусной кислоты, служащей отправной точкой окислительного цикла — этого главного источника жизненной энергии (рис. 39).

Можно указать и на ряд других энергетически невыгодных превращений, существование которых, однако, оправдывается тем, что они необходимы для обеспечения нормального хода жизненных процессов.

Продукты энергетического обмена

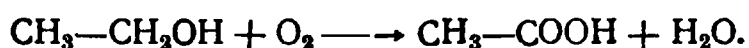
Под энергетическим обменом обычно подразумеваются процессы разложения и окисления веществ, доставляющие необходимую для жизни энергию. Фотосинтез использование световой энергии на ассимиляцию углекислоты не входит в это понятие. Можно различать следующие основные типы энергетического обмена.

Дыхание. Дыханием называют окисление органических веществ с помощью газообразного кислорода до углекислоты и H_2O . В частности, окисление сахара в процессе дыхания выражается уравнением: $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O$. Дыхание

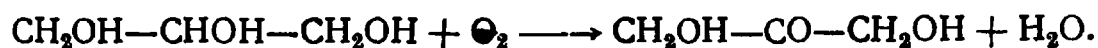
характеризуют дыхательным коэффициентом — соотношением $\frac{CO_2}{O_2}$. Как уже говорилось выше, это соотношение зависит, во-первых, от химического состава окисляемых веществ, во-вторых, от физиологического состояния микроорганизмов. У некоторых микобактерий, азотобактера и других микробов существует, по-видимому, только дыхание; никаких иных продуктов выделения кроме углекислоты обнаружить не удастся. Но у остальных аэробных микроорганизмов дыхательный процесс легко тормозится и тогда в среде начинают накапливаться промежуточные продукты в виде различных органических кислот. Примером могут служить плесневые грибы.

Окислительные брожения распадаются на две категории. О первой из них только что было сказано. Это окислительные брожения, вызываемые грибами. Материалом для них служат углеводы и ближайшие их производные. Среди продуктов чаще всего встречаются щавелевая, глюконовая, лимонная, фумаровая и молочная кислоты. Лимонная кислота находит широкое применение в качестве консерванта крови и в пищевой промышленности. Ее получают на заводах при помощи *Aspergillus niger*. Плесневые грибы используются также для производства глюконовой и молочной кислот.

Ко второй категории принадлежат окислительные процессы, вызываемые уксусными и некоторыми другими бактериями (в частности, представителями *Pseudomonas*). Они отличаются от грибных брожений менее глубоким окислением органических веществ, без разрыва их углеродной цепочки (без десмолиза). Таково, например, уксуснокислое брожение, используемое с глубокой старины для получения уксуса:



Не только спирт, но и самые разнообразные органические соединения могут подвергаться столь же легкому окислению, затрагивающему только 1—2 углеродных атома. В предыдущей главе уже упоминалось об окислении сорбита в сорбозу с помощью уксуснокислых бактерий. Представители *Acetobacter* и *Pseudomonas* могут также окислять глицерин в диоксиацетон:



Глюкоза окисляется ими в глюконовую или кетоглюконовую кислоты. Впрочем, перечислить все окислительные превращения, к которым способны бактерии, невозможно — настолько они многочисленны. Неудивительно, что деятельность бактерий все шире используется в производственной практике для осуществления тонких химических реакций, трудно выполнимых обычными химическими методами. Такого рода превращения назы-

вают «микробиологической трансформацией» органических веществ.

Окисление минеральных веществ. Этим типом энергетического обмена обладают хемоавтотрофные бактерии, способные использовать углекислоту в качестве единственного источника углерода (нитрификаторы, железобактерии, водородные бактерии, серобактерии). Хемосинтетические процессы подробно рассматриваются в общих курсах микробиологии и углубляться в них здесь нет необходимости. Напомним только, что окислению за счет кислорода атмосферы могут подвергаться следующие вещества: аммиак (NH_3), нитриты (NO_2^-), соли закисного железа (Fe^{++}), газообразный водород (H_2), а также сера и ее соединения (H_2S , тиосульфаты и пр.). Из этих веществ, соответственно, образуются нитриты, нитраты, соли окисного железа, вода или же сульфаты.

Пока ещё нельзя с уверенностью сказать, как используется энергия окисления минеральных веществ: покрывает ли она все жизненные потребности бактерий или же употребляется ими только на ассимиляцию углекислоты и превращение ее в органическое вещество. В последнем случае остальные жизненные нужды хемосинтезирующих организмов должны были бы удовлетворяться за счет окисления внутриклеточных запасов органических веществ, т. е. за счет обычного дыхания. Подобная картина наблюдается у фотосинтезирующих зеленых растений.

Некоторые хемоавтотрофы — нитрификаторы и железобактерии — известны еще с конца прошлого века. Наиболее разнообразна группа бактерий, разлагающих сернистые соединения. К ней относятся бесцветные серобактерии, два типа тионовых бактерий и пурпурные серобактерии. У последних хемосинтез сочетается с фотосинтезом.

Наши сведения о хемосинтезирующих организмах продолжают пополняться. Не очень давно среди тионовых бактерий были найдены организмы, способные наряду с серосодержащими веществами окислять закисные соли железа (*Thiobacillus ferrooxidans*). Другие представители этой группы бактерий вместо атмосферного кислорода используют водород нитратов и, следовательно, совмещают хемосинтез с денитрификацией (*Th. denitrificans*). Некоторые хемосинтезирующие бактерии (из рода *Desulfovibrio*) окисляют газообразный водород подобно типичным водородным бактериям, но в отличие от последних делают это за счет кислорода сульфатов, т. е. одновременно осуществляют и десульфатацию.

Хемосинтезирующие бактерии приобрели особый интерес в связи с обсуждением вопроса о возможности жизни в космосе. Их способность обходиться без органических веществ, а иногда еще и без атмосферного кислорода, используя кислород нитратов и сульфатов, дает им возможность существовать в самых

суровых условиях. Некоторые из тионовых бактерий обитают в залежах урановых руд и, следовательно, обладают устойчивостью к радиоактивным излучениям. Не являются ли подобного рода неприхотливые бактерии прототипом обитателей других планет?

Денитрификация и десульфатация. Под этими названиями известны энергетические процессы, в которых окислителем служит кислород нитратов и, соответственно, сульфатов. Из первых в конечном итоге образуется газообразный азот, из вторых — сероводород. Некоторые из упомянутых выше хемоавтотрофов за счет нитратов и сульфатов окисляют газообразный водород и соединения серы. Но значительно чаще денитрифицирующие и десульфатирующие микробы подвергают окислению органические вещества.

Денитрификация и десульфатация занимают промежуточное место между аэробными и анаэробными процессами. Имея ясно выраженный окислительный характер, они в то же время протекают без доступа воздуха.

Анаэробные брожения. Выше говорилось об окислительных брожениях. Однако это название, сохранившееся по традиции, не совсем правильно. Еще Пастер показал четкое различие между дыханием и брожением, охарактеризовав последнее, как жизнь без доступа воздуха. С этой точки зрения скислительные брожения было бы более правильным приравнять к дыханию.

Постоящие брожения носят анаэробный характер. Атмосферный кислород не принимает в них никакого участия и органический субстрат окисляется только за счет отщепления водорода. Последний либо выделяется в газообразном состоянии, либо же присоединяется к продуктам распада того же самого органического субстрата. Анаэробные брожения именно этим и отличаются от всех вышеупомянутых процессов, в которых захваченный коферментами водород в конечном итоге соединяется с кислородом воздуха.

Перенос водорода в ходе сопряженных реакций при анаэробных брожениях приводит к тому, что одни продукты брожения оказываются более окисленными, а другие более восстановленными, чем исходный субстрат. Некоторые из продуктов брожения образуются путем конденсации промежуточных соединений. Следовательно, наряду с разрывом (десмолизом) углеродных цепочек, в брожениях может иметь место синтез удлинение этих цепочек. Например, маслянокислые бактерии и трехуглеродных соединений (глицерина и молочной кислоты) образуют масляную кислоту — вещество, содержащее четыре атома углерода.

В табл. 6 перечислены главные продукты нескольких типов брожений. В остальных брожениях образуются те же продукты,

Продукты основных типов брожений

Продукты		Тип брожения					
название	формула	молочно-кислое	спиртовое	пропионово-кислое	бутиленгликолевое	ацетоно-этиловое	ацетоно-бутиловое и маслянокислое
Углекислота	CO ₂	+	+	+	+	+	+
Водород	H ₂	—	—	—	+	+	+
Муравьиная кислота . . .	HCOOH	—	—	—	+	+	+
Уксусная кислота	CH ₃ —COOH	+	—	+	+	+	+
Молочная кислота	CH ₃ —CH(OH)—COOH	+	—	—	+	—	—
Пропионовая кислота . . .	CH ₃ —CH ₂ —COOH	—	—	+	—	—	—
Масляная кислота	CH ₃ —CH ₂ —CH ₂ —COOH	—	—	—	—	—	+
Янтарная кислота	HOOC—CH ₂ —CH ₂ —COOH	—	—	—	+	—	—
Этиловый спирт	CH ₃ —CH ₂ OH	+	+	—	+	+	+
Изопропиловый спирт . . .	CH ₃ —CH(OH)—CH ₃	—	—	—	—	—	+
Бутиловый спирт	CH ₃ —CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ OH	—	—	—	—	—	+
Ацетон	CH ₃ —CO—CH ₃	—	—	—	—	+	+
Ацетилметил-карбинол	CH ₃ —CO—CH(OH)—CH ₃	—	—	—	+	+	+
Бутиленгликоль	CH ₃ —CH(OH)—CH(OH)—CH ₃	—	—	—	+	+	+
Глицерин	CH ₂ OH—CH(OH)—CH ₂ OH	—	+	—	+	—	—

но в иных сочетаниях. Кроме того, в небольших количествах могут выделяться еще так называемые побочные продукты.

Спиртовое и молочнокислое брожения издавна используются в разнообразных отраслях пищевой промышленности. Достаточно будет сослаться на виноделие и пивоварение, приготовление всевозможных кисломолочных продуктов, хлебопечение, квашение капусты и огурцов и т. д. Другие брожения применяются в производстве с целью получения тех или иных химических соединений, например, молочной кислоты, глицерина, этилового, изопропилового и бутилового спиртов, ацетона, бутиленгликоля и пр.

Гниение отличается от брожения тем, что субстратом для него служат белковые вещества. Сначала они гидролизуются до аминокислот, которые затем подвергаются декарбоксилированию, дезаминированию или же одновременно тому и другому (табл. 7). Дезаминирование может быть прямым с образованием двойной связи. Таким путем, например, из аспарагиновой кислоты образуется фумаровая. При гидролитическом дезаминировании присоединяются ионы воды (H⁺ + OH⁻). В результате этого из аланина получается молочная кислота, из фенилаланина фенил-молочная.

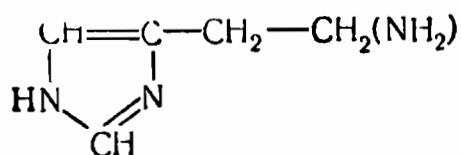
Различные типы дезаминирования и декарбоксилирования аминокислот

Характер реакции	Продукты распада аминокислоты R—CH(NH ₂)—COOH	
	декарбоксилирования нет	декарбоксилирование есть
Дезаминирования нет . . .	R—CH(NH ₂)—COOH	R—CH ₂ (NH ₂) + CO ₂
Дезаминирование есть:		
1) прямое	R=CH—COOH + NH ₃	—
2) гидролитическое . . .	+ H ₂ O → R—CHON— —COOH + NH ₃	+ H ₂ O → R—CH ₂ OH + + CO ₂ + NH ₃
3) окислительное аэробное	+ 1/2 O ₂ → R—CO—COOH + NH ₃	+ O ₂ → R—COOH + + CO ₂ + NH ₃
4) окислительное анаэробное	+ H ₂ O → R—CO—COOH + NH ₃ + 2H	+ 2H ₂ O → R—COOH + + CO ₂ + NH ₃ + 4H
5) восстановительное . . .	+ 2H → R—CH ₂ —COOH + NH ₃	+ 2H → R—CH ₃ + CO ₂ + + NH ₃

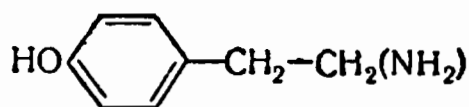
При окислительном дезаминировании отщепившийся аммиак замещается атомом кислорода, что приводит к образованию кетокислоты. Этот тип дезаминирования встречается наиболее часто. Окислительное дезаминирование происходит либо за счет газообразного кислорода, либо за счет кислорода воды. Таким путем глутаминовая кислота превращается в α-кетоглутаровую, аспарагиновая — в щавелевоуксусную кислоту и т. д.

Последний тип дезаминирования носит восстановительный характер. В этом случае происходит замена аммиака двумя атомами водорода, причем образуются насыщенные кислоты. Например, из гликоколя возникает уксусная кислота, из аланина — пропионовая и т. д.

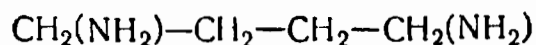
В результате декарбоксилирования аминокислота превращается в амин. В частности, из гистидина образуется гистамин, из тирозина — тирамин, из орнитина — путресцин, из лизина — кадаверин:



Гистамин



Тирамин



Путресцин



Кадаверин

Амины обладают щелочными свойствами и летучестью. Многие из них, известные ранее под зловещим названием «труп-

ного яда», очень ядовиты. Гистамин, например, вызывает судорожное сокращение кровеносных сосудов.

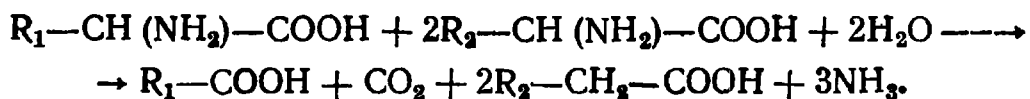
Когда декарбоксилирование сочетается с гидролитическим дезаминированием, образуются спирты. Большое количество высших спиртов, главным образом изоамиловых и изобутиловых, накапливается при спиртовом брожении. Эти высшие спирты, не растворимые в воде, обнаруживаются в перегнанной жидкости в виде эмульсии или плавающих на поверхности капелек. За внешнее сходство с жирами их принято называть «сивушными маслами» («сивуха» — народное название неочищенных погонов из спиртовой бражки). Сивушные масла находят практическое использование в качестве материала для получения душистых эфиров, применяемых в парфюмерной промышленности. Чтобы повысить их выход, иногда в брожение умышленно добавляют сырье, содержащее много аминокислот.

Декарбоксилирование в совокупности с окислительным дезаминированием приводит к появлению органических кислот, укороченных на один углеродный радикал. При этом, например, из аланина образуется уксусная кислота, из норвалина — масляная и т. д.

При одновременном декарбоксилировании и восстановительном дезаминировании появляются вещества с метильной группой на конце. В частности, из глицина образуется метан (CH_4), а из цистеина — меркаптан, обладающий отвратительным запахом:

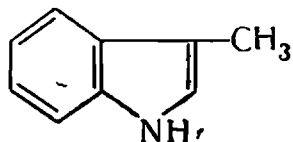


Анаэробные клостридиальные бактерии способны осуществлять окислительно-восстановительную реакцию между парой аминокислот, открытую впервые Стиклендом. Обе аминокислоты при этом дезаминируются, но у одной дезаминирование сопровождается окислением за счет отрыва водородных атомов, тогда как другая восстанавливается, присоединяя к себе эти атомы (4-й и 5-й типы дезаминирования в табл. 7). В общем виде данная реакция выглядит так:

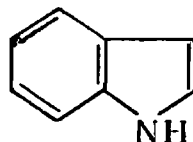


В итоге окислительно-восстановительного взаимодействия двух аминокислот получают жирные кислоты, причем первая из них дает кислоту с укороченной на один углеродный атом цепочкой. Окислению могут подвергаться: аланин, валин, лейцин, изолейцин, цистеин, серин и в меньшей степени — фенилаланин и аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Акцепторами водорода могут быть следующие аминокислоты: глицин, аргинин, оксипролин, пролин, орнитин и триптофан.

Оставшиеся после дезаминирования и декарбоксилирования радикалы аминокислот подвергаются дальнейшему распаду. Из триптофана образуются скатол и индол. Оба они обладают неприятным фекальным запахом, но второй пахнет значительно слабее. Любопытно, что небольшая примесь его содержится в эфирных маслах жасмина, придавая этим цветам их своеобразный аромат.



Скатол



Индол

При распаде метионина и цистеина образуется сероводород (H_2S). Азот, содержащийся в радикалах некоторых аминокислот, выделяется в виде NH_3 . В том случае, когда гниение протекает при свободном доступе воздуха (аэробный гнилостный процесс иногда называют «тлением»), окисление доходит до конца и весь углерод органических веществ выделяется в виде углекислоты. При анаэробном гниении накапливается много промежуточных продуктов белкового распада, упомянутых выше.

В заключение следует подчеркнуть, что многие микробы могут переключаться с одного типа энергетического обмена на другой. В частности, факультативные анаэробы при недостатке кислорода переходят от окислительно-дыхательных процессов к брожению. Большинство гнилостных бактерий при наличии углеводов и других безазотистых веществ начинает разлагать их, оставляя белки нетронутыми. С этим обстоятельством необходимо считаться при подборе сред для культивирования микробов. Разложение и окисление безазотистых соединений сопровождается накоплением органических кислот и падением рН, тогда как в случае гнилостного распада рН среды резко повышается (иногда до 8—9) под влиянием образующихся аминов и аммиака. При культивировании микробов на сложных средах сначала происходит понижение рН за счет окисления углеводов, после же переключения бактерий на расщепление белков величина рН снова возрастает.

Наряду с этим существуют узко специализированные гнилостные бактерии, неспособные разлагать углеводы и прочие безазотистые вещества. И наоборот, некоторые бродильные организмы (молочнокислые, уксусные, ацетоно-бутиловые и пр.) могут получать жизненную энергию только за счет сбраживания безазотистых соединений. Азотистые вещества используются ими лишь для строительного обмена.

Продукты биосинтеза и диссимиляции

Продукты энергетического обмена представляют собой отходы, которые организм в больших количествах выбрасывает наружу. Но наряду с ними в среду могут выделяться вещества, богатые энергией и сложные по своему химическому составу, которые трудно было бы признать за малоценные отбросы жизнедеятельности организма. Посмотрим, что это за вещества и почему они образуются.

Ферменты и токсины. Некоторые продукты обмена являются белками, обладающими высокой физиологической активностью. К ним принадлежат гидролитические ферменты, которые организм выделяет в среду, чтобы разложить высокомолекулярные питательные вещества и сделать их доступными для своего питания. Речь идет о протеазах, гидролизующих полипептиды и белки, об амилазе, необходимой для осахаривания крахмала, о пектазах и пектиназах, расщепляющих пектиновые вещества, и пр. Особенно богатым набором экзоферментов обладают плесневые грибы. Культуры соответствующих грибов применяются для промышленного получения ферментных препаратов.

Многие патогенные бактерии выделяют гиалуронидазу, которая гидролизует слизистые тканевые полисахариды, называемые «гиалуроновой кислотой», помогая тем самым микробам распространяться по телу макроорганизма. Особенно активные гиалуронидазы вырабатывают пневмококки и гемолитические стрептококки.

Устойчивость некоторых бактерий к пенициллину связана с тем, что они выделяют пенициллиназу фермент, разлагающий этот антибиотик.

Эзотоксины патогенных микробов также принадлежат к категории белковых веществ. Вредоносное действие многих токсинов объясняется тем, что они представляют собой ферменты, гидролизующие жизненно важные вещества тканевых клеток. Для патогенных бактерий они служат действенным оружием в их борьбе с высшим организмом. Но токсины таких сапрофитов, как возбудители ботулизма и столбняка, не приносят видимой пользы их обладателям. Биологическое назначение таких токсинов неясно.

Антибиотики. Число антибиотических веществ, обнаруженных у микроорганизмов, измеряется сотнями, хотя практическое применение нашли из них не более 30. Наиболее разнообразны антибиотики актиномицетов: стрептомицин (рис. 46), хлортетрациклин (он же — ауреомицин и биомицин), окситетрациклин (рис. 47), хлорамфеникол, эритромицин и многие другие. Из грибных антибиотиков особенно ценен пенициллин (рис. 48). Образуются антибиотики и некоторыми бактериями.

Антибиотические вещества имеют довольно сложное химиче-

ское строение. Многие из них содержат остатки аминокислот. Они различаются «спектрами действия», т. е. набором микробных видов, на которые они оказывают угнетающее влияние. Для самих продуцентов антибиотики безвредны.

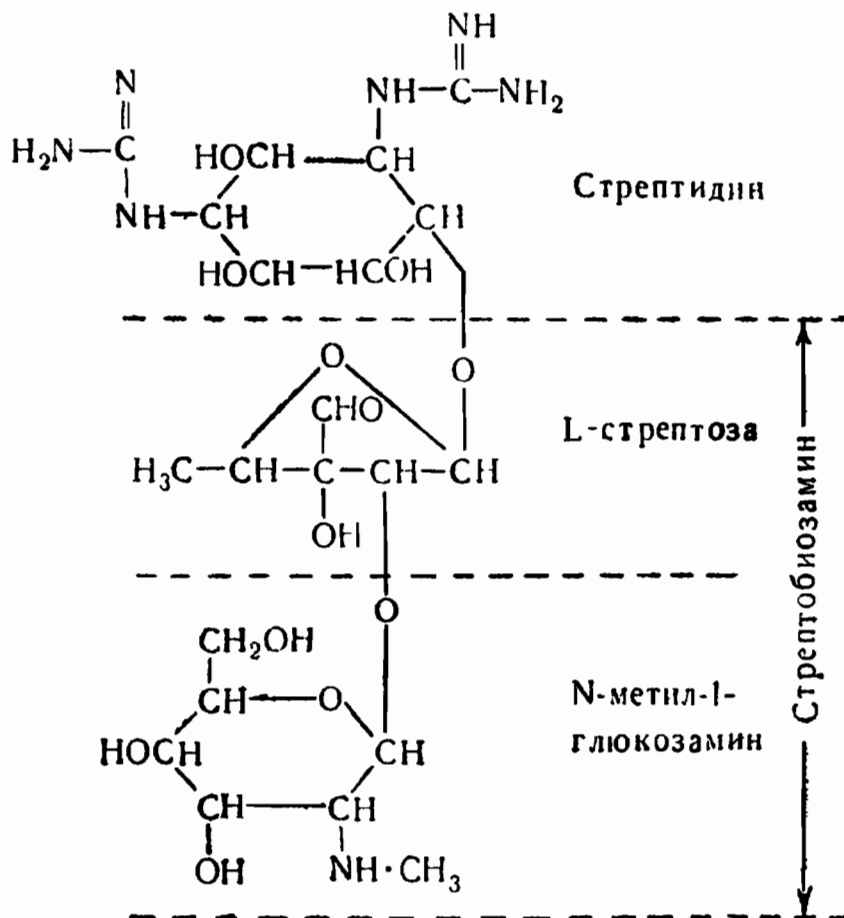


Рис. 46. Стрептомицин

Перечисленные особенности антибиотиков легли в основу широко распространенного представления о них, как о средстве межвидовой борьбы микроорганизмов. Но существует и другое мнение, что образование антибиотиков помогает микробам освобождаться от избытка некоторых промежуточных продуктов обмена. В частности, в молекуле стрептомицина содержатся остатки щелочных аминокислот; присутствие в среде этих аминокислот усиливает его биосинтез актиномицетами.

По-видимому, обе упомянутые точки зрения не противоречат друг другу. Давно известно, что микробы обычно бывают более устойчивыми к продуктам собственной жизнедеятельности, чем посторонние организмы, в связи с чем выделение этих продуктов помогает им в борьбе за существование. Дрожжи, например, отличаются повышенной спиртоустойчивостью, кислотообразующие грибы и бактерии более ацидофильны, чем гнилостные микроорганизмы, а для развития уробактерий, разлагающих мочевины до аммиака, требуется щелочная реакция среды.

Промежуточные продукты строительного обмена. Развиваясь на простых питательных средах, микроорга-

низмы вынуждены самостоятельно синтезировать (если, конечно, они к этому способны) все аминокислоты, витамины, нуклеиновые основания и другие вещества, служащие строительным материалом для протеидов клетки. Часть этих «полуфабрикатов» выделяется в среду, откуда потом снова поглощается клеткой.

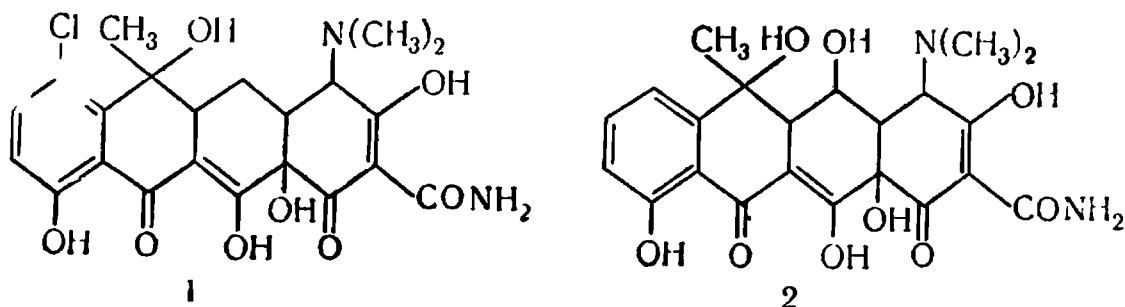


Рис. 47. Тетрациклиновые антибиотики

1 — хлортетрациклин (ауреомицин, биомицин), 2 — окситетрациклин (террамицин)

Необходимо заметить, что масштабы синтеза обычно превышают потребности микроорганизмов. Существует много данных о том, что некоторые микроорганизмы обогащают среду аминокислотами и витаминами, тем самым делая ее пригодной для развития других, более требовательных микробов. Случается,

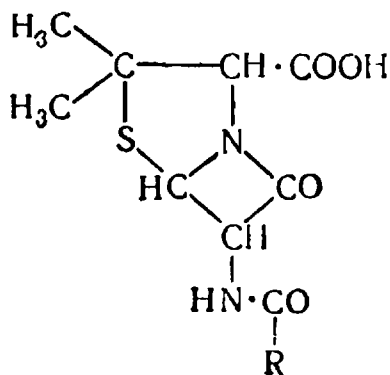


Рис. 48 Пенициллин

что подавляющая часть синтезированного витамина выбрасывается из клетки наружу. Например, в среде обнаруживается до 80—90% общего количества биотина и пара-аминобензойной кислоты, синтезированных бактериями. Иногда «сверхсинтез» аминокислот и витаминов в десятки и сотни раз превышает потребности самих микроорганизмов. В частности, культура *Erethothecium ashbyii* образует столько рибофлавина (витамина B₂), что он выпадает из жидкости в виде мелких кристалликов. Специальные культуры бактерий в процессе своего роста накапливают в среде до 3—4% глутаминовой кислоты, лизина и некоторых других аминокислот.

Понять приспособительное значение такого рода сверхсинтезов довольно трудно. Скорее можно полагать, что клетке

порою недостает каких-то регуляторов обмена, чтобы вовремя выключить приведенный в действие биохимический механизм. Возможно, что это связано с условиями развития микробов в виде чистых культур на искусственных лабораторных средах.

Продукты диссимиляции и автолиза. До сих пор речь шла о веществах, выделяемых в среду физиологически молодыми, растущими клетками. Наряду с этим в клетках могут протекать диссимилятивные процессы, которые особенно усиливаются во время их старения. От диссимиляции следует отличать автолиз, т. е. посмертный распад компонентов клетки. Однако разграничить эти два явления практически почти невозможно, так как в микробных культурах всегда имеется какое-то количество отмирающих клеток. В результате диссимиляции и автолиза среда обогащается аминокислотами, витаминами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями и прочими продуктами распада протоплазменных протеидов.

Выше говорилось о гидролитических ферментах и экзотоксинах, выделяемых в среду на ранних стадиях развития микробных культур. В более старых культурах под влиянием автолиза начинают поступать в среду внутриклеточные ферменты (в частности, протеазы) и эндотоксины. Такого рода посмертное выделение эндотоксинов наблюдается у возбудителей брюшного тифа, дизентерии, холеры, чумы, сибирской язвы и других патогенных бактерий.

Сделанный выше беглый очерк позволяет составить некоторое представление о сложных, физиологически активных продуктах микробного обмена. Не всегда можно с уверенностью судить о биологическом смысле таких продуктов: имеют ли они приспособительное значение или нет, образуются ли прижизненно или же в результате автолиза клеточного содержимого. Но каково бы ни было происхождение подобного рода веществ, их уместно называть «продуктами биосинтеза» в противоположность типичным продуктам энергетического распада, которые выделяются в среду в больших количествах и являются сравнительно простыми химическими соединениями, обедненными энергией.

Биосинтетическая деятельность микроорганизмов широко используется в промышленности для получения ценных физиологически активных веществ: ферментов, антибиотиков, токсинов, некоторых витаминов, аминокислот и пр. Такого рода микробиологические процессы у нас в настоящее время принято называть «ферментациями» в отличие от бродильных процессов, предназначенных для получения продуктов энергетического обмена — спиртов, кислот, ацетона и пр. Такое же отдельное обозначение брожений (*Gärung*) и ферментаций (*Fermentation*) существует на немецком языке. Но на английском, французском и итальянском языках те и другие процессы идут под одним названием (*fermentation, fermentazione*).

ПИТАНИЕ

Основные группы питательных веществ

Не все ингредиенты питательных сред можно назвать питательными веществами. Назначение некоторых из них сводится к тому, чтобы обеспечить в среде оптимальные окислительно-восстановительные условия, необходимую величину рН, осмотическое давление, равновесие ионов. Таковы, например, буферные вещества, добавляемые в среду для поддержания определенного уровня рН, или же поваренная соль, которую часто вносят в среды для создания более благоприятного осмотического давления. Под питательными веществами следует подразумевать только те химические соединения, которые включаются во внутриклеточный обмен веществ.

Питательные вещества либо входят в состав клетки, либо же разлагаются и окисляются, снабжая клетку необходимой для жизни энергией. При этом одно и то же вещество может использоваться сразу по двум направлениям.

К питательным веществам, используемым только на строительные нужды, принадлежат следующие:

1. Минеральные соли для большинства микроорганизмов. Исключение представляют минеральные соединения, служащие хемоавтотрофным бактериям поставщиками энергии, а также нитраты и сульфаты, разлагаемые денитрифицирующими и, соответственно, десульфатирующими бактериями.

2. Газообразный азот для азотфикаторов.

3. Углекислота и бикарбонаты для автотрофов, а частично также и для гетеротрофов. В настоящее время установлено, что для лучшего развития многих гетеротрофов необходимо поступление углекислоты.

4. Так называемые «факторы роста», т. е. обязательные, или незаменимые, аминокислоты, витамины и прочие соединения, которые усваиваются микроорганизмами в нетронутом виде и входят затем целиком в состав протоплазмальных веществ.

К питательным веществам, используемым одновременно как на строительный, так и на энергетический обмен относятся:

1. Углеводы, белковые вещества и многие другие органические соединения, потребление которых сопровождается разложением и переработкой. Промежуточные продукты распада таких органических веществ служат и строительным материалом, и источником жизненной энергии.

2. Аммиак, нитриты, соли закисного железа, сероводород, сера и другие минеральные вещества, служащие для хемоавтотрофов энергетическим материалом, но частично используемые ими также и на строительный обмен.

3. Нитраты для денитрификаторов и сульфаты для десульфатирующих бактерий являются поставщиками кислорода в их энергетическом обмене веществ. Вместе с тем эти вещества служат источниками азота и серы в биосинтетических процессах.

Существуют, наконец, питательные вещества, участвующие только в энергетическом обмене; они служат донаторами электронов, но не ассимилируются организмом:

1. Газообразный водород. Окисление его кислородом воздуха является источником жизненной энергии для водородных бактерий, а окисление за счет сульфата — для сульфатредуцирующих автотрофов.

2. Сероводород и тиосульфат участвуют в энергетическом обмене зеленых фотосинтезирующих бактерий (*Chlorobium*). Эти бактерии — строгие анаэробы. Наличие в среде окисляющихся сернистых соединений помогает им избежать появления кислорода, который образуется из воды при обычном фотосинтезе.

3. Те же самые соединения, а также органические вещества служат донаторами электронов для пурпурных серобактерий (*Thiorhodaceae*) и пурпурных несерных бактерий (*Athiorhodaceae*). Органические вещества окисляются этими бактериями, но не используются ими в качестве источника углерода (лишь некоторые представители могут переключаться на органическое питание). Получается любопытная картина: ассимилируя углекислоту за счет световой энергии и превращая ее в органические вещества своего тела, микроорганизмы в то же время разлагают имеющиеся в среде готовые органические вещества до углекислоты. Видимо, обходные пути в обмене веществ иногда лучше ведут к цели, чем прямые.

Среды для культивирования микроорганизмов должны содержать все необходимые им химические элементы и притом в достаточно легко усвояемой форме. Проще всего решается вопрос о снабжении микроорганизмов зольными элементами (P, K, S, Mg, Mn, Fe). Хорошим источником таких элементов служат соответствующие минеральные соли.

Чтобы удовлетворить потребности микробов в двух органических веществах — кислороде и водороде — в большинстве случаев бывает

достаточно тех атомов кислорода и водорода, которые содержатся в молекулах органических веществ или в воде. Исключения представляют водородные бактерии, для которых газообразный водород является энергетическим материалом, а также зеленые и пурпурные бактерии, нуждающиеся в особых донаторах водорода в виде сернистых соединений или органических веществ. Аэробные микроорганизмы не могут развиваться без доступа кислорода. Но кислород в данном случае служит только акцептором водорода, отрывающегося от окисляемого субстрата, а поэтому называть атмосферный кислород питательным веществом было бы неправильно.

Для развития микроорганизмов необходимы еще два других органогена — углерод и азот. Вопрос об источниках углерода и азота представляется более сложным и требует специального рассмотрения.

Углеродное питание

Белки и другие органические вещества, из которых построено тело живых существ, представляют собой углерод-содержащие соединения. Поэтому вопрос о питании — это прежде всего вопрос о путях перестройки источников углерода в органические компоненты клетки.

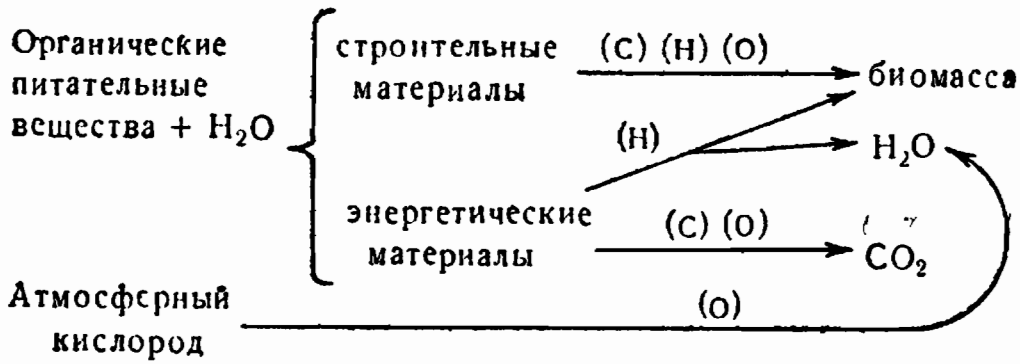
Существуют два основных типа углеродного питания — гетеротрофный и автотрофный. В первом случае источником углерода служат органические вещества, во втором — угольная кислота или ее соли. Автотрофный тип питания подразделяется на фотосинтез и хемосинтез. Фотосинтез, осуществляемый зелеными растениями, известен очень давно. Явление хемосинтеза было открыто только в самом конце прошлого столетия С. Н. Виноградским.

Необходимо подчеркнуть, что наряду со строгими автотрофами существуют организмы, которые могут переключаться с автотрофного типа питания на гетеротрофный. Таковы, например, многие пурпурные несерные бактерии.

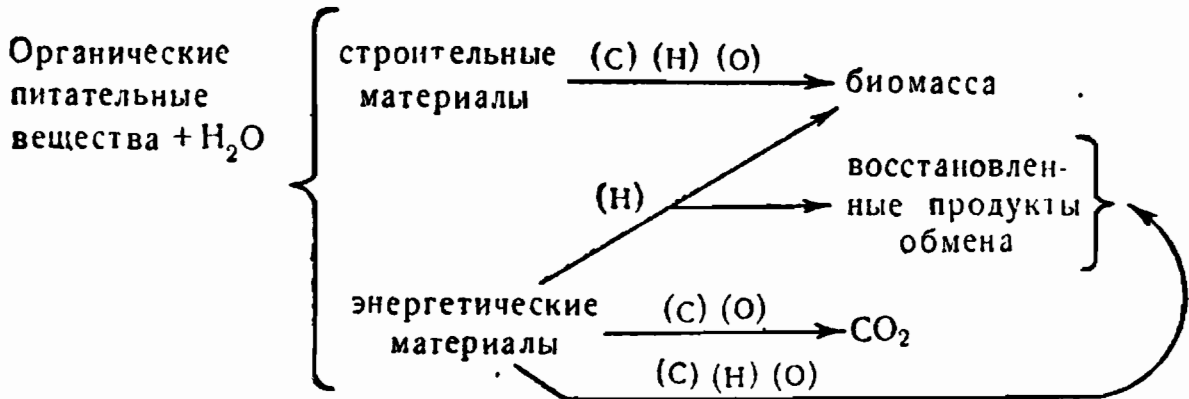
Основные типы гетеротрофного питания можно изобразить двумя нижеследующими схемами, на которых скобками отмечен переход соответствующих атомов от питательного субстрата к веществам биомассы и конечным продуктам обмена.

Разновидностью дыханий являются так называемые окислительные брожения, вызываемые, например, плесневыми грибами и уксуснокислыми бактериями. В этих случаях схему дыхания следует видоизменить, поставив вместо углекислоты (или в дополнение к ней) органические кислоты. Для изображения денитрификации и дисульфатации атмосферный кислород на схеме дыхания необходимо заменить нитратами или сульфатами.

Дыхание



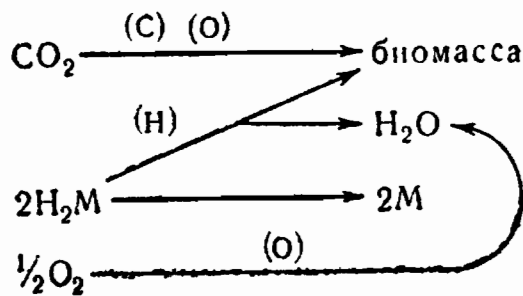
Анаэробные брожения



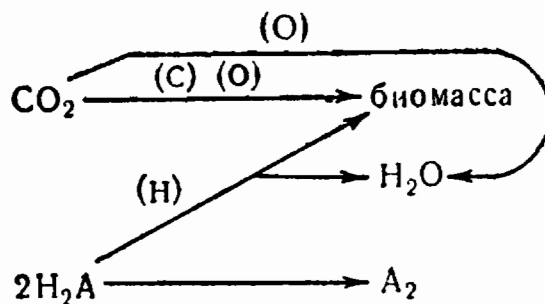
Анаэробные брожения (а равно и гниение) отличаются от аэробных процессов тем, что в качестве акцептора водорода выступает органический субстрат. При этом наряду с показанной на схеме углекислотой, образуются также продукты неполного окисления субстрата — карбоновые кислоты.

На двух следующих схемах изображены автотрофные типы питания:

Хемосинтез



Фотосинтез



Приведенная схема хемосинтеза позволяет заключить, что хемоавтотрофный тип питания отличается от гетеротрофного двумя моментами: во-первых, строительным материалом здесь служит не органическое вещество, а углекислота; во-вторых, в качестве энергетического материала хемоавтотрофы используют вместо органических соединений минеральные вещества (на схеме они обозначены буквой М).

В схеме фотосинтеза под литерой А подразумеваются различные вещества. В простейшем случае H_2A обозначает воду, а A_2 — молекулярный кислород, образующийся при фотосинтезе. Такое положение вещей наблюдается, например, у синезеленых и зеленых водорослей. Сопоставив схему фотосинтеза с дыханием, можно обнаружить коренное различие между ними: углекислота и кислород как бы поменялись местами.

В случае пурпурных несерных бактерий H_2A обозначает какое-либо органическое соединение, а A_2 — его окисленную форму (в частности, CO_2). У пурпурных серобактерий под литерой А может стоять как органическое вещество, так и соединения серы (H_2S , S_2 и пр.).

Перейдем к более подробному рассмотрению источников углерода.

Количество этих источников необычайно велико. За исключением чисто минеральных форм углерода (например, алмаз или графит), нет такого углеродистого соединения, которое не нашло бы себе потребителя среди тех или иных микроорганизмов. Есть микробы, окисляющие нефть, газообразные углеводороды, парафины. Даже резина, капрон, гудрон и прочие материалы, применяемые для изоляции металлического кабеля и тому подобных целей, после пребывания во влажной почве рано или поздно начинают разлагаться микробами.

Только отсутствие влаги может помешать микроорганизмам развивать свою разрушительную деятельность. В связи с этим, например, в сухих песчаных почвах иногда наблюдается мумификация трупов: они высыхают и сохраняются затем в течение многих десятилетий. Отсюда, кстати сказать, и возникла церковная легенда о мощах — нетленных телах святых праведников. Органические материалы могут оставаться неразложившимися и в торфяных болотах, благодаря наличию там антисептических соединений типа гуминовых кислот.

Питательная ценность и усвояемость источников углерода зависит, во-первых, от их физических свойств и химического состава и, во-вторых, от физиологических особенностей микроорганизмов.

Многие органические вещества нерастворимы в воде или же обладают большим молекулярным весом, в силу чего не могут проникнуть внутрь микробной клетки. Первым этапом усвоения подобных веществ должно являться их разложение до низко-

молекулярных соединений. Белки, пектин, крахмал и другие вещества, дающие коллоидные растворы, гидролизуются микробами с помощью выделяемых в среду ферментов. Что касается нерастворимых материалов (парафины, жиры, клетчатка и пр.), то микробы поселяются в воде на границе с их поверхностью и постепенно их разлагают. Вполне понятно, что такого рода источники углерода доступны далеко не для всех микроорганизмов.

Питательная ценность источников углерода зависит также от строения их молекул, в особенности от степени окисленности углеродных атомов. Наиболее окисленным производным углерода является углекислота. Она не содержит в себе доступной для микробов энергии. Поэтому углекислота может служить строительным материалом только в присутствии каких-либо иных источников энергии. Такая картина наблюдается у хемосинтезирующих и фотосинтезирующих микробов. Гетеротрофы могут связывать некоторое количество углекислоты за счет энергии макроэргических связей АТФ.

В карбоксильных группах органических кислот три валентности насыщены кислородом ($R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-OH$) и только четвертая (связанная с радикалом) может еще окисляться. В связи с этим питательная ценность карбоксилов невелика. Лишь немногие микроорганизмы довольствуются такими источниками углерода, как муравьиная ($HCOOH$) или щавелевая кислоты ($COOH$).



Как было уже сказано выше (гл. 3), поглощенные клеткой органические вещества вовлекаются в сопряженные окислительно-восстановительные реакции. Часть атомов углерода окисляется до $-CO-$ и $-COOH$. В дальнейшем из них образуется углекислота (путем декарбоксилирования кетокислот), выделяемая наружу. Другая часть углеродных атомов, восстановившись до радикалов $-CH_3$, $-CH_2$ и $=CH-$, входит в состав клетки. Молекулы аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, стероидов, высших жирных кислот и других соединений, из которых построены вещества протоплазмы, богаты такими восстановленными радикалами. Окислительно-восстановительным превращениям легче всего подвергаются полуокисленные атомы углерода: $-CH_2OH$, $-CHON-$, $=CON-$. Отсюда можно сделать вывод о высокой питательной ценности веществ, содержащих спиртовые группы. Действительно, наиболее доступными источниками углерода для большинства гетеротрофных микроорганизмов являются сахара, глицерин, маннит, молочная, винная и лимонная кислоты и т. д.

Органические соединения с большим количеством метиловых

(—СН₃) и метиленовых (—СН₂) радикалов, как правило, потребляются хуже. К их числу относятся газообразные углеводороды, парафин, высшие жирные кислоты и пр. Они годятся далеко не всем микроорганизмам. В частности, над залежами нефти и природных газов в почве обитают специфические бактерии, способные окислять метан, пропан и другие летучие углеводороды. Их используют для бактериологической разведки месторождений горючих ископаемых.

Слабая усвояемость веществ, содержащих много восстановленных атомов углерода, объясняется плохой растворимостью их в воде. Кроме того, они не могут непосредственно участвовать в сопряженных окислительно-восстановительных реакциях внутри клетки. Усвоение их протекает в два этапа. Сначала эти вещества окисляются, причем освободившаяся энергия бесполезно пропадает для микробов, рассеиваясь в виде тепла. Образовавшиеся полуокисленные соединения углерода вовлекаются в окислительно-восстановительные реакции подобно вышеупомянутым веществам типа сахаров, оксикислот или спиртов.

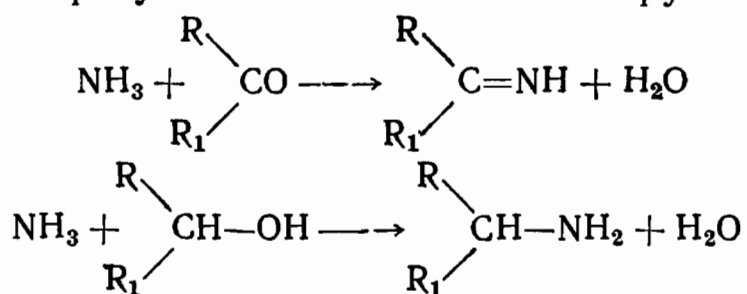
Изложенные здесь общие соображения о питательной ценности источников углерода в конкретных случаях не всегда подтверждаются. Дело в том, что усвояемость органических веществ зависит не только от их растворимости и степени окисленности их атомов углерода, но и от пространственной конфигурации их молекул. Большинство активных компонентов клетки соединения оптически деятельные, причем клетка обычно усваивает лишь определенные оптические изомеры. Например, сахара, участвующие в обмене веществ, относятся к *D*-ряду; аминокислоты (за исключением треонина) к *L*-ряду. Случается, что неестественные изомеры обладают токсичностью. В состав ряда антибиотиков входят *D*-аминокислоты. Лишь немногие микроорганизмы обладают ферментами (рацемазами), превращающими один оптический изомер в другой.

На способность микробов потреблять те или иные органические вещества накладывают свой отпечаток также и те условия, в которых они обитают в естественной обстановке. В почве попадают бактерии, неспособные питаться столь универсальным источником углерода, как глюкоза (с ней им, очевидно, редко приходится сталкиваться), но хорошо усваивающие более простые соединения, например молочную кислоту. Известно, что для разграничения близких форм микробов производят высев на так называемый «пестрый ряд», т. е. на серию сред с различными углеводами и их производными. Способность или неспособность развиваться на определенных источниках С служит диагностическим признаком. Этим показателем обычно пользуются для классификации дрожжей. Дрожжи, обитающие в кефире или кумысе, легко сбраживают молочный сахар (лактозу), тогда как винные дрожжи обычно не способны его

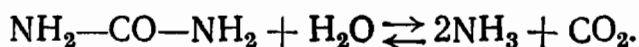
потреблять. Пивные дрожжи, для которых средой обитания является сусло, хорошо усваивают мальтозу — основной углевод сусла.

Азотное питание

Основное назначение источников азота состоит в том, чтобы доставлять организму материал для формирования аминных ($-\text{NH}_2$) и иминных ($-\text{NH}-$) групп в молекулах аминокислот, нуклеотидов, гетероциклических оснований и других химических соединений, входящих в состав протоплазмы. Наиболее доступным источником азота являются ионы аммония (NH_4^+) и аммиак (NH_3). Они легко проникают в клетку, где сравнительно просто преобразуются в имино- и аминогруппы:



Существовавшее ранее представление о том, что некоторые бактерии не способны усваивать аммонийные соли, — неточно. Аммоний может потребляться всеми организмами. Если же микробы иногда не развиваются на средах с минеральными аммонийными солями, то причину надо искать в физиологической кислотности этих солей: после потребления аммиака в среде накапливаются минеральные анионы (SO_4^{--} , HPO_4^{--} , Cl'), благодаря чему рН слишком понижается. Аммонийные соли органических кислот меньше подкисляют среду и поэтому более благоприятны для питания микробов. Физиологически нейтральным источником азота является мочеви́на. После потребления ее азота в среде остается только углекислота:



Неспособность микробов развиваться на среде с аммонийными солями, как единственным источником азота, часто еще объясняется тем, что они нуждаются в готовых аминокислотах (стр. 112).

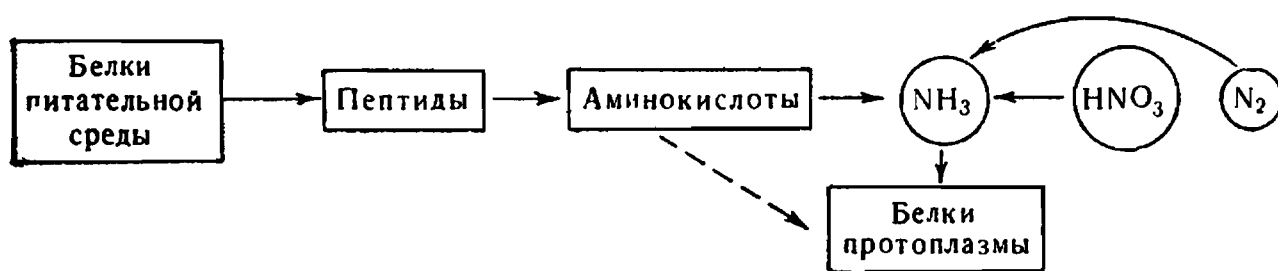
Соли азотной кислоты не обладают физиологической кислотностью — после потребления NO_3 остаются ионы металлов (K^+ , Na^+ , Mg^{++}), в связи с чем среда подщелачивается. Физиологическая щелочность нитратов может даже повредить развитию кислотолюбивых (ацидофильных) микроорганизмов, например грибов. Кроме того, не все организмы способны восстанавливать окисленные атомы азота. Нитраты хорошо усваиваются плесневыми грибами и актиномицетами. Однако даже эти орга-

низмы при развитии на нитрате аммония (NH_4NO_3) в первую очередь потребляют NH_4^+ , причем остающиеся анионы NO_3^- подкисляют среду. Среди бактерий потребители нитратов встречаются значительно реже.

Еще менее доступным источником азота является атмосферный азот. Для его использования микробы должны обладать азотфиксирующей способностью, т. е. улавливать атмосферный азот и восстанавливать его в аммиак. Ранее были известны три основные группы азотфиксаторов: представители рода *Azotobacter* — свободноживущие аэробы, *Clostridium pasteurianum* — анаэробный спорообразующий азотфиксатор и, наконец, клубеньковые бактерии, живущие в качестве симбионтов на корнях бобовых растений. В настоящее время установлено, что азотфиксирующая способность распространена среди низших организмов значительно шире. В частности, ею наделены некоторые синезеленые водоросли. В почвах имеется особая группа бактерий, неспособных фиксировать азот в чистых культурах, но легко это делающих при совместном обитании с другими бактериями.

Перечисленные выше минеральные соединения представляют собой источники азота в точном смысле слова. Степень их усвояемости определяется тем, насколько легко они превращаются в аммиак. Но наряду с этим микробы могут получать азот и из органических веществ, которые являются одновременно как источниками азота, так и источниками углерода.

Потребление органических источников азота сводится к отщеплению от них аммиака и его поглощению клеткой. Таким образом, аммиак является узловым пунктом, куда ведут все пути азотного питания:



Такой способ питания мы в свое время (Иерусалимский, 1949) предложили называть «аминоавтотрофным», имея в виду, что аминокислоты и другие азотсодержащие компоненты клетки строятся заново из органических веществ и аммиака. Аминоавтотрофию не следует смешивать с автотрофным типом углеродного питания, под которым подразумевают усвоение углекислоты путем фотосинтеза или хемосинтеза.

Существует еще второй способ биосинтеза клеточных белков, который был нами назван «аминогетеротрофным». В этом случае организм строит белки своей протоплазмы из готовых

«кирпичиков»—аминокислот, не разлагая последние до аммиака. На схеме этот тип азотного питания показан пунктиром.

Органические источники азота весьма различны по своей усвояемости. Высокомолекулярные белковые вещества не проникают через оболочку грибных и бактериальных клеток. Сквозь нее проходят пептиды, состоящие не более чем из 5 аминокислот. В этом отношении микробы отличаются от амёб, инфузорий и других простейших, которые способны поглощать твердые питательные вещества. Поэтому белками могут питаться только микроорганизмы, выделяющие в среду протеиназы, необходимые для расщепления белковых молекул до пептидов и аминокислот. О протеолитической активности микробов обычно судят по тому, разжижают ли они желатину. Этим свойством обладают гнилостные аэробы из группы *Proteus*, многие спорообразующие аэробы и анаэробы, некоторые грибы и актиномицеты, а также ряд патогенных микробов.

Часто в лабораторной практике в качестве источника азота употребляют пептоны — препараты, получаемые в результате неполного ферментативного гидролиза белков. Пептоны различаются как своим аминокислотным составом (зависящим от того, из каких белков они изготовлены), так и степенью протеолиза. Типичные пептоны получают из белков при помощи пепсина. Они содержат более 80% полипептидов, причем некоторые из этих пептидов обладают высоким молекулярным весом и напоминают своими свойствами белки. Свободных аминокислот в пептонах почти нет. Путем обработки трипсином можно добиться более глубокого протеолиза белковых молекул до низкомолекулярных пептидов. И наконец, посредством кислотного гидролиза достигают полного расщепления белка до свободных аминокислот. Особенно часто применяется гидролизат казеина, содержащий весь набор аминокислот, за исключением триптофана, который под действием минеральных кислот разрушается.

Пептоны, в которых имеется много высокомолекулярных фракций, хорошо усваиваются только протеолизующими микроорганизмами, приближаясь в этом отношении к белкам. Пептоны с большим количеством свободных аминокислот и коротких пептидов находят себе больше потребителей среди микроорганизмов.

Кислотный гидролизат казеина, пополненный триптофаном, является столь же универсальным источником азота для всех микробов, как и аммонийные соли. Имея полный набор аминокислот, микроорганизмы переключаются на аминотетеротрофный тип питания, поглощая аминокислоты в готовом виде. Белковые гидролизаты обладают тем преимуществом перед аммонийными солями, что не подкисляют среду и, кроме того, удовлетворяют потребности микробов, неспособных самостоя-

тельно синтезировать некоторые аминокислоты (о таких микробах будет сказано ниже).

Положение вещей коренным образом изменяется, когда в белковом гидролизате недостает хотя бы одной из аминокислот. В этом случае организм бывает вынужден создавать недостающие аминокислоты путем перестройки других аминокислот, либо путем синтеза их из органических кислот и аммиака. Необходимый для этого аммиак образуется в результате дезаминирования имеющихся аминокислот. Так же обстоит дело и тогда, когда источником азота служат отдельные аминокислоты. Содержащийся в них азот может усваиваться только по аминокавтотрофному способу — после отщепления в виде аммиака.

Следовательно, отдельные аминокислоты являются хуже усвояемым источником азота, чем полная смесь всех аминокислот или аммонийные соли. Они годятся лишь микроорганизмам, наделенным дезаминирующей способностью. Не все микроорганизмы ею обладают. При этом нередко приходится сталкиваться с любопытным явлением, что какая-либо бактерия дезаминирует или декарбоксилирует лишь одну-две определенные аминокислоты, не затрагивая остальных. Такого рода бактерии иногда используются в лаборатории с целью аналитического определения соответствующих аминокислот в животных или растительных материалах.

Т а б л и ц а 8

Усвоение микробами различных источников азота

Источники азота	Физиологические свойства, необходимые для потребления данных источников азота			
	протеолиз	дезаминирование	восстановление нитратов	азотфиксация
Белки	+	+*	—	—
Пептоны	+	+*	—	—
Полная смесь аминокислот	—	—	—	—
Отдельные аминокислоты	—	+	—	—
Аммиак	—	—	—	—
Нитраты	—	—	+	—
Атмосферный азот	—	—	—	+

* Если белки и пептоны содержат полный набор аминокислот, то после протеолиза они могут потребляться по аминокавтотрофному способу. В этом случае дезаминирования не требуется.

Приведенная в табл. 8 классификация источников азота вытекает из современных представлений об азотном обмене веществ. В прошлом, когда этот вопрос был еще мало исследован, существовали другие классификации. В основу их клали способность или неспособность микробов расти на средах с

различными азотистыми веществами, не вдаваясь в то, каким образом используются данные вещества. Такова, например, классификация Бейеринка—Фишера. Названные авторы подразделили микроорганизмы на 7 групп: 1) паратрофы, способные развиваться только за счет сложного комплекса белковых веществ в теле высших организмов; 2) пептонобактерии, которым необходимы пептоны; 3) амидобактерии, довольствующиеся отдельными аминокислотами, но не способные развиваться на аммонийных солях; 4) аммонобактерии, которые обходятся аммонийными солями; 5) нитробактерии, использующие в качестве источников азота нитраты; 6) нитрит-и нитратбактерии, под которыми подразумевались нитрификаторы; 7) азотобактерии, т. е. азотфиксаторы.

Нетрудно заметить, что в этой классификации смешаны различные принципы. Паратрофность означает приспособление к паразитарному образу жизни, но вовсе не потребность в сложных белках. В настоящее время на безбелковых синтетических средах удается выращивать самых строгих паразитов (исключение представляют только вирусы, неспособные существовать *in vitro* из-за неполноценности своего энзиматического аппарата). Не существует и особой группы пептонобактерий. Благоприятное влияние пептонных препаратов объясняется примесью к ним витаминов и других стимуляторов роста.

Отдельные аминокислоты, как было сказано, являются худшим источником азота, чем аммонийные соли. Представление об особых амидобактериях, растущих на аминокислотах, но якобы неспособных развиваться на минеральных солях, сложилось лишь потому, что эти соли обладают физиологической кислотностью.

И наконец, в случае нитрификации аммиак и нитриты служат в первую очередь энергетическим материалом. Поэтому рассматривать нитрификацию, как особую категорию азотного питания, нет оснований.

Обязательные аминокислоты

Вопрос об аминокислотах, обязательных для питания человека и животных, имеет длинную историю. Еще в XVIII веке, во время Великой французской революции, Конвент рекомендовал жителям Парижа желатину в качестве заменителя белков, учитывая существующие тогда продовольственные затруднения. Однако население питалось ею очень неохотно, имея к тому достаточные основания. Желатина, как известно, готовится путем вываривания сухожилий, хрящей и других частей тела животных, состоящих главным образом из кератинов и склеропротеинов. В ней недостает некоторых важных аминокислот. Вполне понятно, что желатина не может заменить полноценные

белки. Впрочем, вопрос об ее биологической недостаточности долго оставался неясным. В 20-х годах нашего столетия один физиолог в порядке эксперимента попытался исключить из своего меню все белки, кроме желатины. Через 1—2 месяца опыты пришлось прекратить из-за сильного расстройства его здоровья. Постепенно стало выясняться, что неполноценность многих белков (желатины, зеина из кукурузы и пр.) связана с отсутствием некоторых аминокислот, обязательных для питания животных. Другие аминокислоты из пищи можно безболезненно устранять, потому что организм самостоятельно их синтезирует. Список незаменимых аминокислот удалось установить не сразу. Только с 1935 г., когда была открыта ранее неизвестная аминокислота — треонин, стало возможным выращивать крыс и других подопытных животных на синтетической диете, содержащей вместо белков 9—10 незаменимых аминокислот. Так рухнул один из канонов старой физиологии, согласно которому для питания животных совершенно необходимы белки.

Идея об обязательных аминокислотах проникла затем и в микробиологию. Ранее существовало мнение о неспособности некоторых патогенных бактерий развиваться в отсутствие белковых веществ. Но развернувшимися в 30-х годах исследованиями было доказано, что белки можно полностью заменить смесью аминокислот. При этом некоторые аминокислоты абсолютно необходимы для микробов, другие только стимулируют их рост, а присутствие третьих вовсе необязательно — микробы сами их хорошо синтезируют из безазотистых органических веществ и аммиака.

В отношении питания аминокислотами, как и во всем остальном, проявилась крайняя пестрота физиологических потребностей микроорганизмов. В то время, как самые различные представители позвоночных животных нуждаются в одних и тех же 9—10 аминокислотах, потребности даже близких форм микроорганизмов могут резко различаться (табл. 9). Существуют бактерии, которым требуется только 2—3 аминокислоты. У других число обязательных аминокислот достигает 17. Есть и такие микробы, которые способны самостоятельно строить все аминокислоты и развиваться в их отсутствие.

Потребностью в готовых аминокислотах обладают главным образом патогенные микробы, а также молочнокислые бактерии, привыкшие жить в молоке, имея в своем распоряжении богатый выбор этих веществ. Наблюдается потребность в аминокислотах и у многих гнилостных микроорганизмов. Грибы, дрожжи и актиномицеты обычно не нуждаются в аминокислотах. Но в присутствии готовых аминокислот рост их ускоряется.

В таблице даны также сведения о потребностях клеток животных (фибропластов цыпленка). Необходимо по этому поводу заметить, что клетки, изолированные из тканей высших

Отношение к аминокислотам разных организмов (+ обязательны, — не нужны, (+). стимулируют рост, угн. — угнетают)

Аминокислоты	Название организмов							
	Млекопитающие	Фибробласты цыпленка	Гемолитический стрептококк	<i>Lact. casei</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	Дифтерийные бактерии		Золотистый стафилококк
						NY	PW8	
Лизин	+	+	+	(+)	+	—	—	—
Аргинин	(+)	+	+	+	+	—	—	—
Гистидин	+	+	+	(+)	—	+	—	—
Фенил-аланин	+	+	+	+	—	+	—	—
Тирозин	—	+	+	+	(+)	—	—	—
Триптофан	+	+	+	+	+	+	—	+
Пролин	—	угн.	+	—	—	—	—	—
Гликоколь	—	—	+	—	+	+	—	—
Аланин	—	угн.	+	(+)	+	—	—	—
Валин	+	+	+	+	—	+	+	—
Лейцин	+	+	+	+	+	—	+	—
Изолейцин	+	—	+	(+)	+	—	—	—
Серин	—	—	+	+	+	—	—	—
Треонин	+	+	+	(+)	+	—	—	—
Цистин	—	+	+	+	(+)	+	+	+
Метионин	+	+	+	(+)	—	+	+	—
Аспарагиновая кислота	—	угн.	—	+	+	—	—	—
Глутаминовая кислота	—	угн.	+	+	+	+	+	—

животных и растений, можно выращивать на искусственных средах *in vitro*, подобно культурам настоящих микроорганизмов. Мы видим, что тканевые клетки отличаются своими потребностями от целого организма. Они нуждаются в большем числе аминокислот, а некоторые аминокислоты угнетают их развитие.

Организмы, неспособные расти без готовых аминокислот, называются «аминогетеротрофами», а список необходимых им аминокислот называется «аминограммой» (Иерусалимский; 1949). В противоположность им «аминоавтотрофы» могут самостоятельно синтезировать все аминокислоты из обычных источников углерода, азота и серы. Однако, как уже было сказано выше, при наличии в среде полного набора аминокислот, аминоавтотрофы переключаются на аминогетеротрофный способ питания. Нередко это влечет за собой ускорение их роста.

Влияние аминокислот на рост микроорганизмов зависит от того, даются ли они в качестве единственного источника азота или же добавляются в среду дополнительно к другим азотистым

веществам. В первом случае микроорганизм вынужден дезаминировать аминокислоту, чтобы извлечь из нее азот; во втором случае он может поглощать ее целиком, без разложения. При этом следует иметь в виду, что легко синтезируемые аминокислоты столь же легко дезаминируются микробами, если же организм плохо синтезирует какую-либо аминокислоту, то расщепляет ее он также с трудом. Первые аминокислоты хороши в качестве единственного источника азота. Однако при наличии других легко усвояемых азотистых веществ они не оказывают заметного эффекта. Если, например, в синтетической среде часть аммонийных солей заменить аспарагином, на росте дрожжей это не отразится. В противоположность аспарагину, лизин и аргинин в отдельности являются довольно трудно усвояемыми источниками азота. Но добавление их в среду с аммонийными солями стимулирует рост дрожжей, так как в этом случае они могут потребляться в целом виде, без предварительного разложения, что освобождает клетку от необходимости осуществлять трудный для нее биосинтез этих аминокислот.

Понятие о ростовых веществах

История вопроса о веществах, регулирующих развитие микробов и других организмов, изложена в соответствующей литературе (см. предисловие) и поэтому мы остановимся лишь на некоторых его этапах.

Первые искусственные среды для выращивания бактерий, дрожжей и грибов были составлены Пастером в 1859—1864 годах. Они включали в себя источники углерода (органические кислоты, спирт или сахара), аммонийные соли и необходимые зольные элементы. От наблюдательности Пастера не укрылась непополненность этих сред: после добавления туда вытяжек из натуральных материалов рост дрожжей улучшался. Некоторые дрожжи могли развиваться на таких синтетических средах только в случае засева большим количеством клеток. При малых засевах они не росли.

Через 40 лет это явление вновь привлекло к себе внимание. В 1901 году студент Вильдье (Wildiers, 1901) обнаружил, что дрожжи нуждаются в каких-то органических веществах, содержащихся в сусле и прочих естественных субстратах, а также в самих дрожжевых клетках. Этим неизвестным веществам он дал название «биос», что в переводе с греческого означает «жизнь».

В 1904 г. русский исследователь Я. Я. Никитинский нашел, что в процессе своего роста плесневые грибы выделяют в среду какие-то органические соединения, которые усиливают рост вновь засеянных грибов, причем эти соединения не принадлежат к обычным питательным веществам.

Открытия Вильдье и Никитинского не получили должной оценки, и исследования по вопросу о стимуляторах роста микробов вскоре заглохли. Объясняется это тем, что в то время имелись лишь самые смутные представления о физиологически активных веществах: витаминах, гормонах и др. Правда, существование таких веществ было замечено еще в 1880 г. Н. И. Луниным. Он обнаружил, что кроме обычных питательных материалов — белков, жиров, углеводов и минеральных солей — подопытные животные нуждались для нормального развития в каких-то неизвестных факторах, содержащихся в молоке. Однако только в 1912 г. К. Функу удалось более обстоятельно исследовать подобного рода факторы. Он нашел, что в рисовых отрубях и других растительных материалах содержатся вещества, излечивающие птиц от заболевания полиневритом, который возникал в результате длительного кормления полированным рисом. Полагая, что эти вещества относятся к числу незаменимых аминокислот, Функ назвал их «витаминами» от латинского слова *vita* — жизнь. Как теперь известно, витамины не тождественны аминокислотам, хотя многие из них и содержат в себе аминокгруппы. В частности, от полиневрита (известного на Дальнем Востоке под названием «бери-бери») предохраняет витамин В₁ (аневрин), которого недостает в полированном рисе. В настоящее время он известен под названием тиамина.

«Гормонами» в 1905 г. Старлинг назвал выделения желез внутренней секреции у животных, а еще через 6—7 лет Фиттинг распространил этот термин на «ростовые вещества» растений (фитогормоны). В настоящее время известно большое количество активных веществ такого рода. Много их было синтезировано искусственно. Они находят все более широкое применение в практике сельского хозяйства для ускорения роста растений или созревания плодов, для замедления прорастания клубней картофеля при хранении, дефолиации (удаления листьев с хлопчатника перед механизированной уборкой), борьбы с сорняками и пр. Эти вещества, называемые гербицидами, чрезмерно форсируют рост сорняков, что приводит к гибели последних.

Стимуляторы роста растений образуются также и микроорганизмами. В настоящее время известность получил гиббереллин, образуемый фитопатогенными грибами из рода *Fusarium* (рис. 49). Он применяется для усиления роста лубяных растений. Под его влиянием ягоды винограда становятся значительно крупнее. Микроорганизмы вырабатывают и ряд других веществ, влияющих на развитие растений.

Гормоны желез внутренней секреции, равно как и фитогормоны, служат регуляторами обмена веществ, усиливая одни и подавляя другие физиологические процессы. Однако они не обязательны для жизни клеток. Кроме того, гормоны (за исключением искусственно синтезируемых препаратов или веществ, об-

разуемых фитопатогенными грибами) вырабатываются самими высшими организмами и, следовательно, имеют эндогенное (внутреннее) происхождение.

В противоположность им витамины поступают в тело животного вместе с пищей (экзогенно). Кроме того, витамины совершенно необходимы для нормальной жизнедеятельности организма. Отсутствие их вызывает серьезные расстройства обмена веществ. Внешняя картина авитаминозов у животных очень сложна, но в основе их обычно лежат нарушения каких-либо довольно простых биохимических реакций. Например, без витамина В₁, который входит в состав кокарбоксилазы, пировиноградная

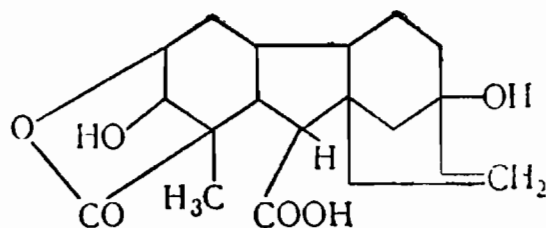


Рис. 49 Гиббереллин А₃ (гибберелловая кислота)

кислота перестает декарбоксилироваться и накапливается в нервной ткани животных; это и служит причиной полиневрита. Недостаток витамина Д ведет к нарушению обмена кальция у детей, что приводит к недоразвитию костей и другим клиническим проявлениям рахита.

По современным представлениям, витамины являются составными частями коэнзимов, катализирующих определенные биохимические превращения. Если организм животного может самостоятельно синтезировать все компоненты данного коэнзима, отсутствие их в пище не окажет на него никакого влияния. Следовательно, понятие витаминов является несколько условным: оно не обозначает какой-то определенной группы химических соединений и указывает лишь на то, что организм не способен самостоятельно их строить из других веществ. Соединения, служащие витаминами для одних организмов, не проявляют никакой активности в отношении других, если последние способны их синтезировать. Столь важный компонент дыхательных коэнзимов, как гем, не попал в список витаминов лишь потому, что он синтезируется в организме животных.

Вернемся к вопросу о стимуляторах роста микроорганизмов (более подробно см. Мейсель, 1950; Одинцова, 1959), изучение которых возобновилось только к концу первой мировой войны в связи с успехами, достигнутыми в изучении витаминов и фитогормонов. Эти исследования протекали по двум направлениям: одни ученые пытались выделить и очистить биос дрожжей, тогда как другие пробовали заменять его известными в то время витаминами, а позднее фитогормонами. Биос оказался

смесью нескольких веществ, причем состав его для разных видов и рас дрожжей сильно различался. Некоторые дрожжи вообще не нуждались ни в каком биосе и прекрасно росли на простых синтетических средах. Выделенные из биоса компоненты (инозит, биотин, β -аланин и др.) казались сначала весьма своеобразными соединениями, непохожими на известные в то время гормоны и витамины. Как мы увидим ниже, эти представления были не совсем правильными.

Существование описанных Никитинским стимуляторов роста грибов долго не подтверждалось: большинство из них обходилось без всяких стимуляторов. Только в 30-х годах Шопфер и другие исследователи натолкнулись на фитопатогенные грибы, неспособные развиваться без фактора «М», который в дальнейшем удалось заменить витамином В₁ или же частями его молекулы.

В 20-х годах Дэвис, Эвери и другие авторы показали, что потребность некоторых гемофильных («кровелюбивых») бактерий в кровяных средах объясняется присутствием в таких средах двух веществ: устойчивого к нагреванию «фактора Х» и термолабильного витаминоподобного «фактора V» (сокращение от слова *vitamin*). В дальнейшем фактор Х оказался пигментом крови — гемином, а фактор V — динуклеотидом, содержащим аденин и амид никотиновой кислоты (см. формулу на стр. 66).

Позже было показано, что ряд других бактерий — не только патогенных, но и сапрофитных — не развивается без определенных «факторов роста». Наряду с обязательными факторами роста были обнаружены вещества, стимулирующие рост и размножение микроорганизмов, но необязательные для их жизни.

Подобного рода биостимуляторы назывались по-разному, как например: вещества группы биос, дополнительные вещества, бактериальные витамины, факторы роста, регуляторы роста, ростовые вещества микробов. Не было единства мнений и по поводу природы и механизма действия всех этих веществ. По данному вопросу наметились две основные точки зрения.

Исследователи, имевшие дело с дрожжами и плесневыми грибами, сближали указанные вещества с ростовыми веществами растений (фитогормонами), поскольку они лишь стимулировали рост, но были не обязательны для развития микроорганизмов.

Исследователи, работавшие по преимуществу с бактериями и протистами, приравнивали факторы роста микробов к витаминам, т. е. экзогенным питательным веществам, обязательным для жизни и ничем иным не заменимым.

Блестящие успехи биохимии позволили в ближайшие годы окончательно решить загадку ростовых веществ микробов и прийти к единой точке зрения. В настоящее время представляется несомненным, что ростовые вещества микробов не име-

ют ничего общего ни с гормонами животных, ни с ростовыми веществами высших растений. Многие из факторов роста микробов принадлежат к водорастворимым витаминам группы В, другие являются нуклеиновыми основаниями или же компонентами простетических групп ферментов. Например, фактор Х оказался гемом — компонентом дыхательных ферментов. Впрочем, и витамины группы В также представляют собой звенья коферментов.

Если микроорганизм может самостоятельно строить перечисленные соединения из обычных источников углерода, азота, серы и других элементов, то отсутствие факторов роста в окружающей среде не повлечет за собой никаких вредных последствий для его развития. И наоборот, в случае неспособности синтезировать какое-нибудь из таких веществ, необходимых для нормальной жизнедеятельности, микроорганизм окажется не в состоянии развиваться в их отсутствие. Нередко бывает и так, что микроорганизм синтезирует такого рода соединения, но делает это недостаточно быстро. В этом случае добавление их в питательную среду ускоряет рост организма (рис. 50).

Таким образом, в зависимости от биосинтетических возможностей микроорганизмов, одно и то же вещество может быть или совсем не обязательным, или проявлять стимулирующее действие, или же, наконец, оказаться столь же необходимым для развития, как и витамины у животных. Именно этим и объясняются трудности и противоречия, существовавшие в прошлые годы, когда изучение факторов роста микробов только еще начиналось.

Следует указать, что название «факторы роста» неточно, так как подобного рода вещества нужны клетке для построения коэнзимов, нуклеотидов и других физиологически активных веществ, регулирующих ее метаболизм. Недостаток этих факторов — своего рода авитаминоз — влечет за собой нарушение биохимических процессов. Замедление же роста носит вторичный характер и является лишь одним из внешних проявлений происшедших нарушений в обмене веществ. Более тщательные исследования (например, М. Н. Мейсель, 1950) показывают, что

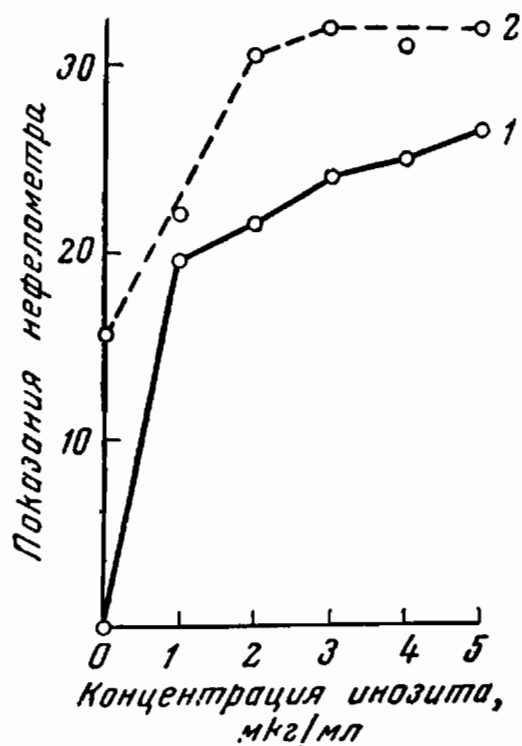


Рис 50 Потребность в инозите двух видов дрожжей

1 — *Saccharomyces carlsbergensis* (обязательный фактор роста), 2 — *Sacch. uvarum* (стимулятор роста).

По Одинцовой, 1959

картина авитаминоза у микроорганизмов довольно сложна. Она включает в себя не только торможение роста, но и изменение ряда морфологических и физиологических свойств клетки (рис. 51).

Несмотря на свою неточность, название «факторы роста» или «ростовые вещества» в силу традиций сохраняются и поныне. В последние годы в понятие факторов роста стали включать также обязательные аминокислоты.

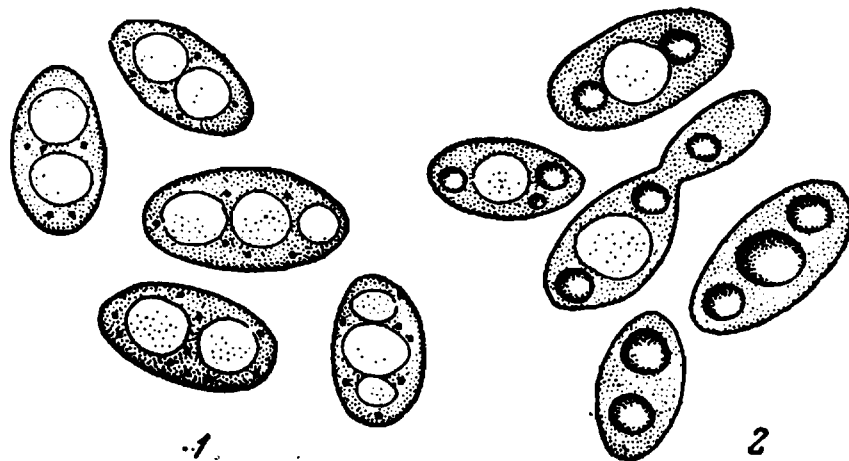


Рис. 51. Влияние пара-аминобензойной кислоты (ПАБК) на морфологию клеток *Rhodotorula aurantiaca*

1 — нормальный вид клеток на среде с ПАБК; 2 — усиленное жи-
ронакопление в отсутствие этого витамина. По Мейселяу, 1950

Потребление микробами витаминов и витаминоподобных веществ по предложению Шопфера (Shoper, 1938) было названо «ауксотрофией». Соответственно этому микробы, нуждающиеся в каком-то из этих веществ, именуются «ауксогетеротрофами», а микробы, способные обходиться без них, — «ауксоавтотрофами». Ауксогетеротрофия по отношению к одному из витаминов может сочетаться с ауксоавтотрофией по отношению к другому.

За последние годы стала применяться новая терминология, предложенная Дэвисом (Davis, 1950). Микроорганизмы, требующие каких-то аминокислот (аминогетеротрофы), объединяются с микроорганизмами, нуждающимися в ростовых веществах (ауксогетеротрофами), в одну группу «ауксотрофов». Соответственно этому «прототрофами» называются микроорганизмы, способные развиваться в отсутствие той или иной аминокислоты, витамина или пиримидинового основания. Следует заметить, что в это название ранее вкладывался совсем иной смысл: в старых учебниках микробиологии под прототрофами подразумевались хемосинтезирующие и азотфиксирующие бактерии.

Витамины и витаминоподобные вещества

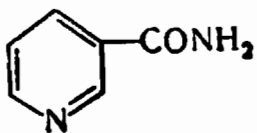
Пуриновые и пиримидиновые основания. В настоящее время известно немало организмов из числа патогенных и молочнокислых бактерий, а также паразитирующих грибов, которые положительно реагируют на упомянутые соединения. Химические формулы некоторых из них были приведены на стр. 55. Наряду с ними некоторые микроорганизмы отзываются положительно еще на один пурин — ксантин. В одних случаях пуриновые и пиримидиновые основания только ускоряют рост микроорганизмов, в других случаях они оказываются для них обязательными.

Эти вещества нужны в основном в качестве строительного материала для нуклеотидов. Об этом косвенно говорят их оптимальные дозы. Если для витаминов эти дозы обычно не превышают 0,1—0,5 мг/л, то пурины и пиримидины приходится давать в количестве 5—10 мг/л. Аминокислоты, входящие в состав белков, применяются в концентрациях 50—200 мг/л. Приведенные цифры соответствуют относительному содержанию в клетке коэнзимов, нуклеотидов и белков. Содержание первых не превышает нескольких десятых процента, нуклеиновых оснований в клетке бывает 5—20%, а количество белков достигает 60—80% от ее сухого веса.

Впрочем, одно из пуриновых оснований — аденин — входит не только в нуклеиновые кислоты, но и в состав нескольких коэнзимов, в частности кодегидраз и коэнзима А.

Факторы X и V. Выше было сказано, что некоторые гемофильные бактерии и трипаносомы требуют для своего развития два различных фактора (вместе или в отдельности): теплоустойчивый фактор X, оказавшийся впоследствии гемом, и менее стойкий фактор V. Дальнейшими исследованиями было установлено, что последний фактор представляет собой одну из двух кодегидраз, которые различаются между собой только количеством молекул фосфорной кислоты. Одна из них (ДПН) содержит две молекулы, другая (ТПН) три молекулы фосфорной кислоты (рис. 32).

Менее требовательные микроорганизмы довольствуются отдельными звеньями фактора V — аденином или же амидом никотиновой кислоты (ниацином)



Ниацин (витамины PP)

Отсутствие ниацина (витамина PP) вызывает у человека заболевание пеллагрой. Этот авитаминоз проявляется в шелуше-

нии кожи и других расстройствах обмена. Ниацин проявляет также активность в отношении многих бактерий, дрожжей и грибов.

Т и а м и н (витамин В₁, аневрин) был первым витамином, который удалось выделить и идентифицировать. Самое название «витамин», получившее в дальнейшем широкое значение, сначала относилось только к нему. Как уже говорилось выше, при недостатке тиамин в пище животные заболевают полиневритом (болезнь «бери-бери» у человека).

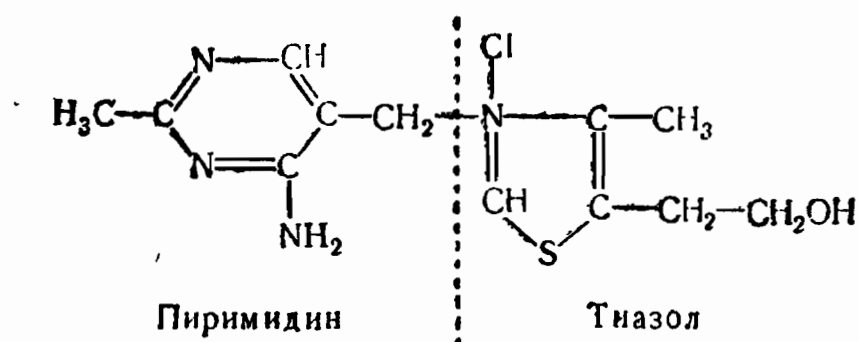


Рис 52 Тиамин (витамин В₁, аневрин)

Начиная с 20-х годов стали накапливаться сведения о том, что добавление в питательные среды тиамин благоприятствует росту некоторых микроорганизмов. С другой стороны, в результате выделения и изучения натуральных ростовых веществ грибов и бактерий выяснилось, что некоторые из них идентичны тиамину или же каким-либо осколкам его молекулы.

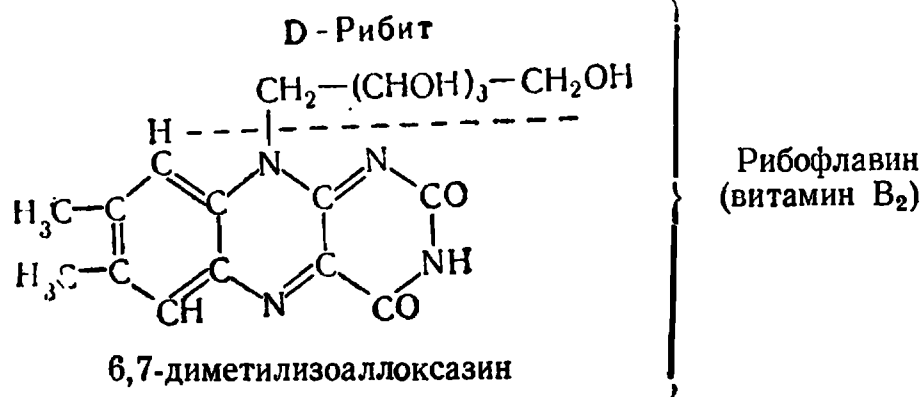
Молекула тиамин построена из двух компонентов: один из них — производное пиримидина, другой — производное тиазола. (рис. 52). Тиамин нестойк: при нагревании его раствора, особенно в щелочной среде, он легко распадается на свои составные части. В соединении с двумя молекулами фосфорной кислоты (тиамин пирофосфат) витамин В₁ является кокарбоксилазой, т. е. коферментом, осуществляющим декарбоксилирование пировиноградной кислоты и других кетокислот. При окислительном декарбоксилировании пирувата образуется уксусная кислота. В этом случае в реакции участвует еще липоевая (тиоктоновая) кислота (см. стр. 72). Она служит ростовым фактором для некоторых протозоа и бактерий.

По потребности в тиамине организмы делятся на несколько групп. Высшие животные и некоторые патогенные трипаносомы нуждаются в целой молекуле. Паразитические грибы и бактерии удовлетворяются смесью пиримидинового и тиазольного компонентов. Многие другие грибы, дрожжи, бактерии и водоросли требуют либо одну пиримидиновую, либо одну тиазольную часть тиамин. И наконец, наименее прихотливые организмы обхо-

дятся без этого витамина, синтезируя его самостоятельно из обычных питательных веществ. Такую же картину мы увидим ниже и в отношении всех остальных витаминов. Одни организмы требуют их в виде целой молекулы, другие обходятся какой-нибудь частью молекулы, третьи могут развиваться при полном отсутствии данного витамина.

В свое время тиамин был основным объектом для исследования специфичности химического строения витаминов. В результате испытания нескольких десятков производных пиримидина и тиазола выяснилось, что малейшее изменение в молекуле лишает её активности. Небольшой активностью обладают лишь те производные, из которых легко может восстановиться натуральная молекула. Следовательно, в химическом отношении тиамин очень специфичен. Дальнейшие исследования показали, что такой же специфичностью обладают и все остальные витамины. Для жизнедеятельности клетки необходимы молекулы вполне определенной структуры.

Рибофлавин (витамин В₂, лактофлавин). Как указывает его номер, этот витамин был следующим после тиамина, химическое строение которого удалось определить достаточно точно.

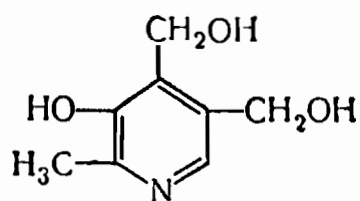


Рибофлавин характеризуется ярко-желтой окраской и большой чувствительностью к свету. Под влиянием облучения он быстро разрушается (особенно в щелочной среде), превращаясь в биологически неактивное вещество — люмифлавин. Это вещество обладает люминесценцией в ультрафиолетовом свете, чем пользуются для колориметрического определения витамина В₂. Желто-зеленоватый цвет молочной сыворотки зависит от рибофлавина и других флавинов, содержащихся там в большом количестве.

Рибофлавин входит в состав флавиновых коферментов, участвующих в дыхательных процессах в качестве переносчиков водорода (рис. 37). Недостаток его в пище животных ведет к сильной утомляемости и другим болезненным явлениям. Из числа микроорганизмов в рибофлавине нуждаются главным

образом молочно-кислые бактерии, обычно получающие его в готовом виде из молока, а также некоторые патогенные бактерии. Напротив, другие микроорганизмы синтезируют этот витамин в столь больших количествах, что культуральная жидкость скрашивается в ярко-желтый цвет. Особенно много образуют его грибки *Eremothecium ashbyii* и *Ashbya gossypii*. В довольно значительном количестве накапливается он также в культурах ацетоно-бутиловых бактерий.

Витамин В₆ (пиридоксин). В отличие от витамина В₁ и В₂, пиридоксин очень устойчив к нагреванию. Он чувствителен к свету, хотя и в меньшей мере, чем рибофлавин. Недостаток его вызывает задержку роста молодых животных, поражение кожи и некоторые другие болезненные симптомы.



Пиридоксин

Существуют два близких производных этого витамина, называвшиеся ранее «псевдопиридоксином»: пиридоксаль и пиридоксамин. В соединении с фосфатом они служат коферментами, участвующими в декарбоксилировании и переаминировании аминокислот (стр. 71).

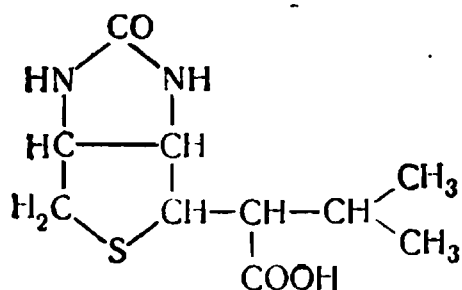
Пиридоксин и оба его производные являются более универсальными ростовыми веществами, чем рибофлавин. В них нуждаются многие бактерии, дрожжи и плесневые грибы.

Биотин. Перечисленные выше физиологически активные вещества были сначала открыты витаминологами. При дальнейших испытаниях их действия на микробные культуры выяснилось, что они обладают активностью также в отношении многих низших организмов. Напротив, комплекс стимуляторов роста, известный под названием «биос», долго считался исключительной принадлежностью дрожжей и прочих микробов. Лишь позднее удалось установить, что некоторые его компоненты представляют собой витамины, необходимые для нормальной жизнедеятельности животных.

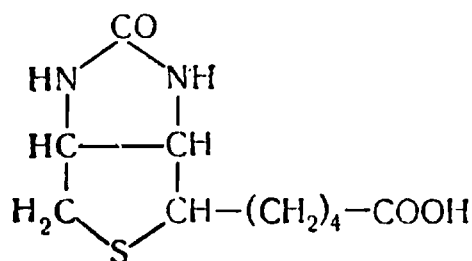
В итоге кропотливых исследований «биос» был расчленен на фракции, которые затем одна за другой очищались и изучались. В 1928 г. удалось выделить инозит (стр. 61). Однако он являлся сравнительно слабым стимулятором роста и к числу главных компонентов «биоса» не принадлежал: дрожжи могли развиваться и в его отсутствие.

В 1935 г. Ф. Кёгль получил в кристаллическом виде очень активное вещество, названное им «биотином» (Kögl, Tönnis,

1936). Биотин наряду с пантотеновой кислотой, о которой будет сказано ниже, является важнейшим компонентом «биоса». Формулу его удалось установить только после семилетней работы. Были найдены два его изомера: α -биотин, выделенный Кёглем, и β -биотин, выделенный, а затем и синтезированный большой группой американских химиков.



α - биотин



β - биотин

Трудности, связанные с изучением биотина, объясняются крайне малым его содержанием в животных и растительных материалах. Кёгль, например, использовал для выделения биотина яичные желтки, поскольку они содержат намного больше этого витамина, чем какое-либо другое сырье. Сначала он взял 1000 яиц, но этого оказалось недостаточно, чтобы получить ощутимые количества биотина. При повторном опыте пришлось уже брать четверть тонны сухих яичных желтков. Названное сырье было подвергнуто длительным и сложным обработкам. Экстракция горячей водой, спиртом и ацетоном, осаждение свинцовым уксусом, фосфорно-вольфрамовой кислотой и другими реагентами, адсорбция углем при различных рН и прочие операции чередовались 16 раз. На каждом этапе производилась биологическая проверка активности отдельных фракций. В процессе выделения количество материала все более уменьшалось, а активность его, наоборот, возрастала. Наконец из 250 кг желтков было получено только 1,1 мг чистого кристаллического биотина. Он был в 3 000 000 раз активнее по сравнению с исходным материалом. Расчеты показывают, что около 95% биотина было потеряно в процессе выделения и очистки. Можно себе представить, как дорого обходилось препаративное получение биотина из натурального сырья!

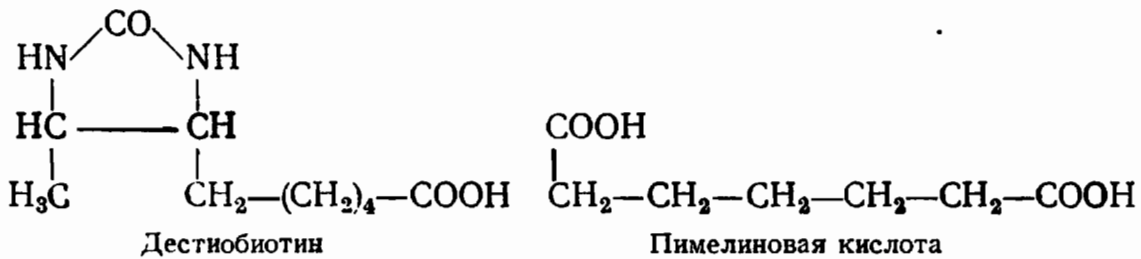
В настоящее время биотин получают путем химического синтеза и он сделался доступным не только для лабораторных исследований, но и в качестве стимулятора роста дрожжей на заводах.

Биотин очень стоек к нагреванию — он выдерживает автоклавирование. В качестве простетической группы ферментов биотин участвует в β -карбоксилировании пировиноградной и других кетокислот. Авитаминоз в отношении биотина у высших животных обнаружить трудно, так как микрофлора кишечника

синтезирует его в достаточном количестве. Однако у цыплят при длительном кормлении их яичным белком происходят нарушения обмена веществ, называемые «яично-белковым заболеванием». Причиной заболевания служит одна из фракций яичного белка, имеющая специфическое сродство к биотину, которая соединяется с ним в нерастворимый и неперевариваемый комплекс. За свое быстрое связывание с биотином этот белок получил наименование «авидин» (сокращение от *avid albumin* — «алчный альбумин»). При нагревании упомянутого комплекса авидин свертывается и биотин вновь освобождается. Яично-белковое заболевание у цыплят удавалось излечивать с помощью витамина, известного в свое время под названием витамина В₇ или Н. В дальнейшем оказалось, что он представляет собой не что иное, как биотин.

Потребностью в биотине обладают не только дрожжи. Он необходим также многим бактериям, протистам и некоторым плесневым грибам. Биотин отличается поразительно высокой активностью. Его влияние на рост бактерий обнаруживается даже в столь малых количествах, как 1 мг на 100 000 л среды, а оптимальная доза его составляет 0,0001—0,01 мг/л.

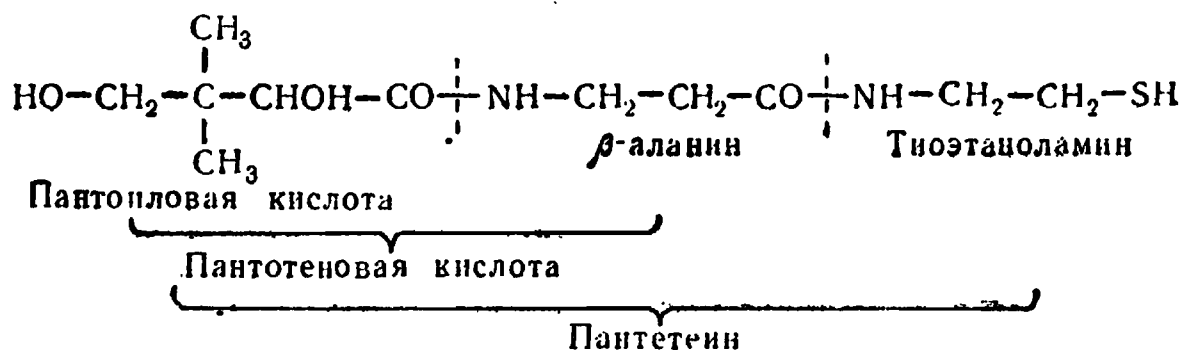
Некоторые микроорганизмы довольствуются дестиобиотином, т. е. биотином без серы.



Атом серы в биотине иногда может быть безболезненно заменен на кислород. Активностью обладают также аминокислоты, получаемые в результате отщепления серы и разрыва верхнего (имидазольного) кольца в молекуле биотина. Дифтерийные и ряд других бактерий обходятся еще более простым осколком биотина — пимелиновой кислотой.

Пантотеновая кислота и ее производные. Особенно много внесли в изучение «биоса» работы лаборатории Р. Вильямса. В 30-х годах сотрудниками лаборатории было обнаружено, что рост дрожжей стимулируется β-аланином. В дальнейшем удалось установить, что β-аланин является составной частью более активного вещества, обладающего кислыми свойствами. Эта кислота очень широко распространена в животных и растительных материалах, и поэтому Вильямс назвал ее «пантотеновой», что в переводе с греческого означает «вездесущая» (Williams, Lyman et al., 1933). Выделение пантотеновой кислоты в чистом виде было нелегким делом. Для этого

приходилось, например, перерабатывать 250 кг бараньей печени, затрачивая несколько месяцев труда. Пантотеновая кислота состоит из β-аланина, соединенного пептидной связью со вторым компонентом — пантоиловой кислотой.



Пантотеновая кислота представляет собой неустойчивую к нагреванию сиропообразную жидкость. Поэтому в питательные среды ее дают в виде кальциевой соли (кальций-пантотената). Роль ее в обмене веществ удалось установить лишь за последние 10 лет. Выяснилось, что в результате присоединения тиоэтанолamina из пантотеновой кислоты образуется пантетеин который в свою очередь входит в состав коэнзима А (рис. 35) Упомянутый кофермент участвует в синтезе высших жирных кислот и стероидов, перенося радикалы уксусной, янтарной и других кислот.

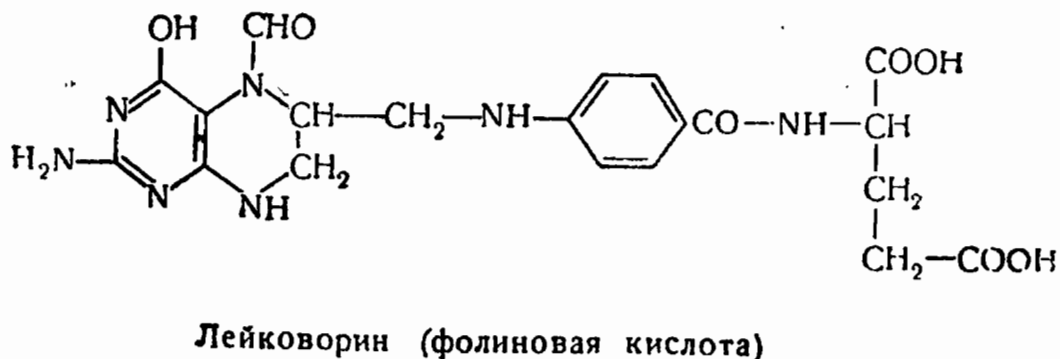
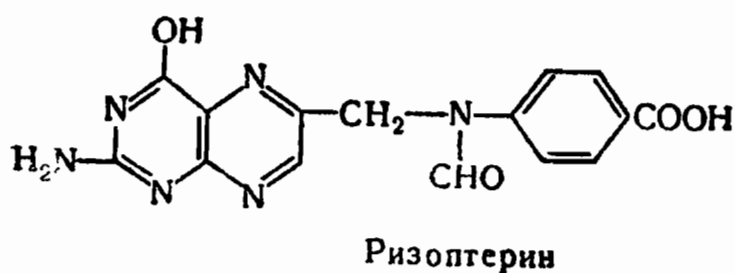
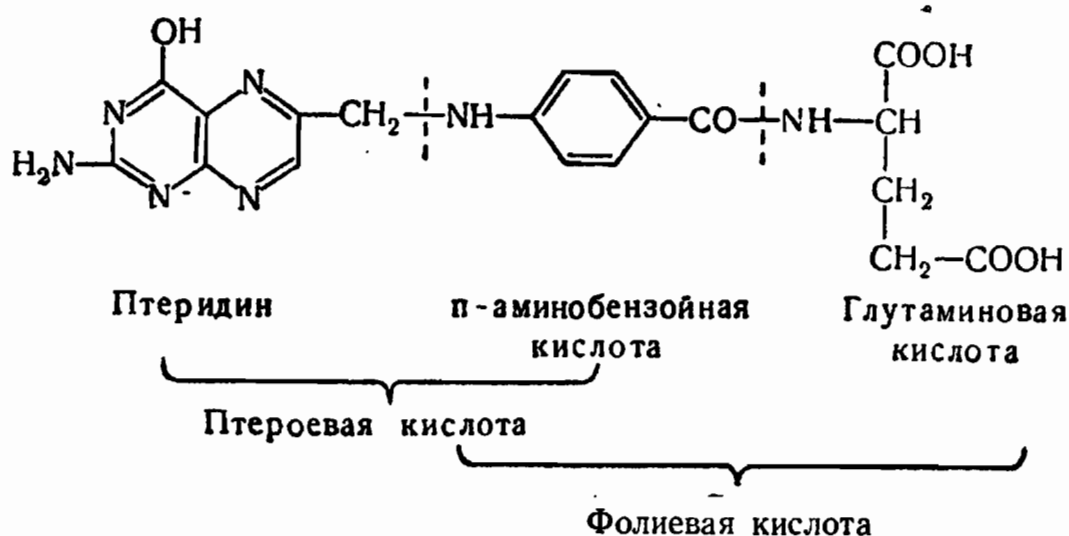
Пантотеновая кислота оказалась тождественной известному ранее витамину В₃, излечивающему животных от некоторых расстройств обмена веществ. Впрочем, авитаминозы, связанные с недостатком пантотеновой кислоты, возникают сравнительно редко, так как животные получают ее в достаточном количестве от микрофлоры кишечника.

В целом виде кофермент А не усваивается, так как он не проникает в клетку, но отдельные его компоненты стимулируют рост микробов. Для хорошего развития некоторых рас болгарской палочки и других видов молочнокислых бактерий требуется целая молекула пантетеина. Остальные представители этой группы бактерий, а также пропионовокислые бактерии, многие патогенные микробы и дрожжи удовлетворяются пантотеновой кислотой. Существуют дрожжи и бактерии, требующие только один β-аланин. Встречаются, наконец, и такие бактерии, которым бывает достаточно пантоиловой кислоты. Тиоэтаноловый компонент пантетеина в отдельности также обладает активностью. Сказанное служит хорошим доказательством того, насколько разнообразны потребности микроорганизмов.

Фолиевая кислота. Исследователи питания высших животных знали о существовании нескольких близких, но не вполне тождественных витаминов: М, В, В₃, В₁₀, В₁₁. Недоста-

ток их вызывал различные расстройства обмена, в частности, нарушение кроветворной способности организма.

Со своей стороны микробиологи в начале 40-х годов обнаружили несколько ростовых веществ, похожих по своим свойствам на упомянутые витамины. Одно из них, выделенное из зеленых листьев Х. Митчелом, Е. Снеллом и др. авторами (Mitchell et al., 1941), получило название «фолиевой кислоты» (от слова *folium* — лист). Фолиевая кислота требовалась для развития *Strept. faecalis* R. Вскоре удалось найти ряд других веществ, близких к ней по химическим свойствам и биологической активности, которым были даны различные наименования в зависимости от того, на какие микроорганизмы они оказывали действие: *Casei*-фактор, лейковорин, ризоптерин и пр. Изучение химического строения и физиологической роли этих веществ растянулось на многие годы. Лишь к настоящему времени в этот вопрос удалось внести некоторую ясность, хотя окончательно разрешенным его еще нельзя считать.



Все упомянутые ростовые вещества представляют собой производные фолиевой кислоты. Сама она состоит из трех компонентов: птеридинового основания, п-аминобензойной и глутаминовой кислот. Ее структурное наименование — птероилмоноглутаминовая кислота.

Фолиевая кислота образует игольчатые кристаллы желтого цвета. Водные растворы ее обладают сине-зеленой флюоресценцией. Под влиянием яркого освещения она разрушается. Кроме приведенных выше соединений к группе фолиевой кислоты принадлежит ряд других веществ. Некоторые из них отличаются от птероил-моноглутаминовой кислоты тем, что содержат в своей молекуле по три или по семь остатков глутаминовой кислоты, соединенных в пептиды.

Представители группы фолиевой кислоты, стимулирующие рост микроорганизмов, необходимы в качестве материала для биосинтеза фолиевых ферментов. Действующим началом таких ферментов является 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота (рис. 36). Это — очень нестойкое вещество, которое легко окисляется в дигидрофолиевую кислоту или же присоединяет к себе одну из следующих групп: формильную ($-\text{CHO}$) — остаток муравьиной кислоты, оксиметильную ($-\text{CH}_2\text{OH}$) — остаток формальдегида и формиминную ($-\text{CH}=\text{NH}$). Фолиевые ферменты служат переносчиками указанных одноуглеродных групп и таким образом участвуют в синтезе пуриновых оснований, тимины, метионина и других важных соединений.

Об отношении микроорганизмов к производным фолиевой кислоты говорилось выше. Представители молочнокислых и некоторых патогенных бактерий проявляют большую разборчивость, требуя либо тех, либо других из этих производных. Менее прихотливые микробы довольствуются осколками молекулы фолиевой кислоты: птероевой кислотой, птерином, п-аминобензойной или глутаминовой кислотами.

В и т а м и н B_{12} (к о б а м и д ы). Этот витамин, как указывает его большой порядковый номер, был найден одним из последних, в 1948 г. (Смит, 1962). Его сложный состав удалось расшифровать только через несколько лет, обрабатывая данные рентгеноскопических анализов с помощью электронно-счетной машины. Витамином B_{12} лечат злокачественную анемию, причем активность его значительно выше, чем у фолиевой кислоты. В чистом виде он представляет собой красные кристаллы. Витамин устойчив к нагреванию, особенно в форме цианида. Молекула его состоит из кобальтсодержащего порфиринового производного, соединенного с нуклеотидом (рис. 53). В качестве основания в этом нуклеотиде находится 5,6-диметилбензимидазол.

Существует много десятков веществ, родственных истинному витамину B_{12} , которые обычно называются «псевдовитами-

нами», так как они неактивны для животных. Не исключено, конечно, что удастся найти какие-то соединения, обладающие такой же или даже более высокой активностью, чем V_{12} . Псевдовитамины обозначались различными литерами (фактор *B*, фактор *C* и т. д.), а истинный витамин назывался «цианкобаламином».

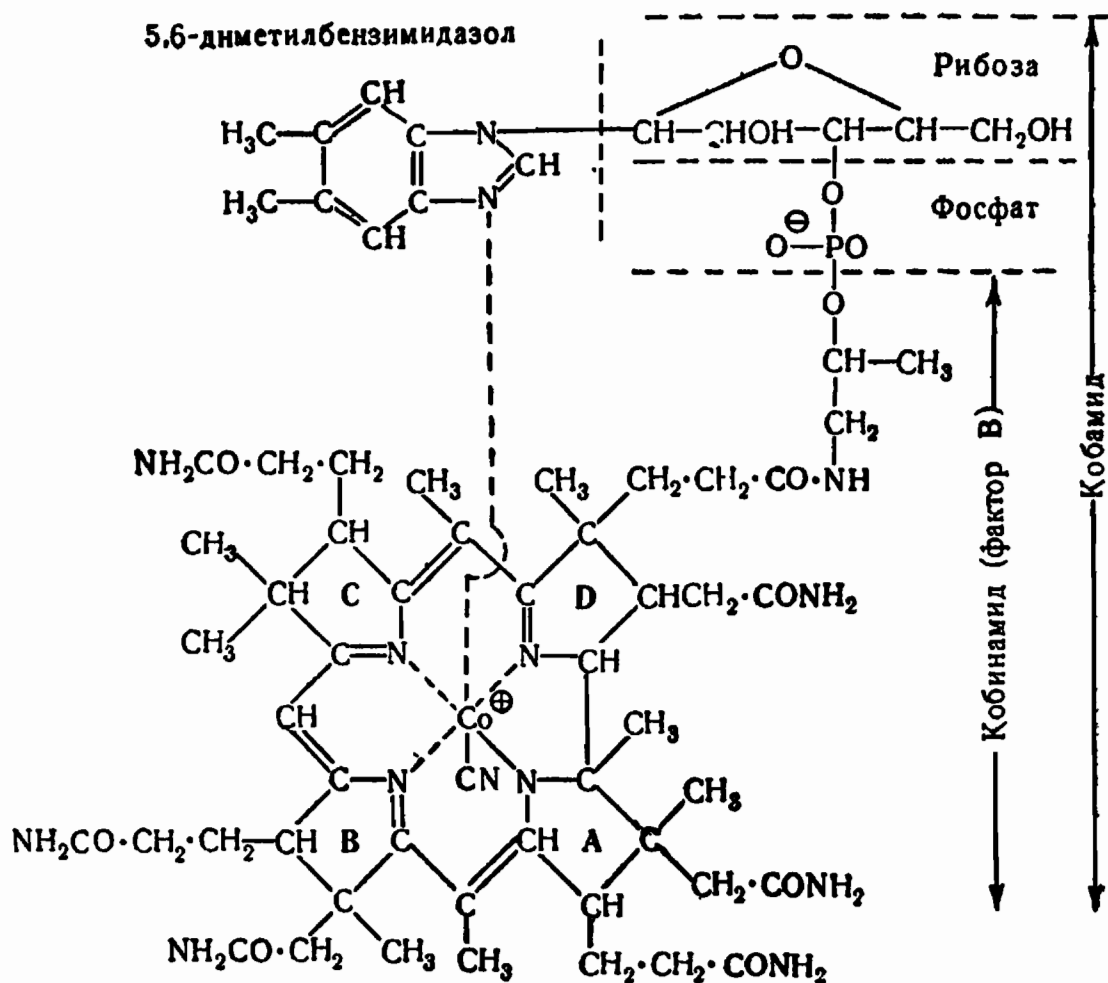


Рис. 53. Витамин V_{12} (5,6-диметилбензимидазол-кобамид-цианид)

В настоящее время предложена новая номенклатура. Порфириновый компонент именуют теперь кобинамидом (прежнее название — фактор *B*). В результате присоединения к нему молекулы фосфорной кислоты и рибозы образуется кобамид. И наконец, к кобамиду могут присоединяться самые различные основания: 5,6-диметилбензимидазол (свойственный истинной форме витамина V_{12}), аденин, гуанин и т. д. Полученные таким образом соединения рассматриваются как соли кобамиды. С этой точки зрения истинный витамин V_{12} следует называть 5,6-диметилбензимидазолкобамид-цианидом.

В отличие от тех порфиринов, которые входят в цитохромы и хлорофилл, порфириновая часть витамина V_{12} богата амидными группами. Имеющийся в ней кобальт соединен с другими

атомами тремя обычными валентностями и тремя дополнительными.

Сравнительно недавно из клеток животных и микроорганизмов удалось изолировать коэнзимные формы витамина В₁₂. По-видимому, существует не один такой коэнзим. От витамина они отличаются присутствием в их молекулах нескольких нуклеотидов, связанных с порфириновым компонентом, а также значительно более высокой светочувствительностью.

Накопившиеся данные убедительно говорят в пользу того, что кобамидные коферменты способствуют переносу одноуглеродных радикалов, напоминая этим фолиевые ферменты. Но вместе с тем они, вероятно, участвуют и в каких-то иных биохимических превращениях.

В тканях высших растений витамина В₁₂ нет. Видимо, растения обходятся без него. Для животных, особенно молодых, он очень нужен. Человек получает его с мясной пищей. Травоядных животных витамином снабжает микрофлора их кишечного тракта, но этого иногда бывает недостаточно. В районах, где почвы бедны кобальтом (например, в Прибалтике), в пищу жвачных животных рекомендуется добавлять соли кобальта, чтобы дать возможность микрофлоре рубца синтезировать витамин В₁₂.

Микроорганизмы самостоятельно образуют необходимые им кобамиды. Особенно много их синтезируют пропионовокислые бактерии и некоторые актиномицеты. Культуры этих микробов применяются при промышленном получении кристаллического витамина В₁₂, а также и кормовых препаратов для животноводства, обогащенных этим витамином. Получать его путем химического синтеза слишком трудно.

Для количественного определения витамина В₁₂ и его производных используется особый мутант кишечной палочки (*Escherichia coli* 113-3), неспособной без него развиваться, а также культуры некоторых жгутиковых водорослей (из родов *Euglena* и *Ochromonas*).

Прочие факторы. Перечень витаминов и витаминоподобных веществ, необходимых микроорганизмам, на этом можно закончить. Следует, однако, иметь в виду, что он не является исчерпывающим. Есть, например, указания на усиление роста некоторых бактерий витамином К. В роли стимуляторов роста микробов могут выступать и такие простые вещества, как холин, ацетат, олеиновая кислота, дикарбоновые кислоты, аспарагин. Некоторые молочнокислые бактерии положительно отзываются на особые пептиды, известные под общим названием «стрепогенин». Эти пептиды представляют собой цепочки из 3—5 аминокислот, причем смесь тех же аминокислот в свободном состоянии оказывает значительно меньшее стимулирующее действие. По-видимому, пептиды нужны в целом виде. Возмож-

но, они являются звеньями каких-то физиологически активных белков. Возбудители плевронеумонии рогатого скота и родственные им организмы, обладающие весьма своеобразным циклом развития (*L*-цикл), объединенные в настоящее время в род *Mycoplasma*, нуждаются для своего развития в холестерине или других стероидах. Появились в печати сведения о новых витаминах, некоторые из них при дальнейших исследованиях могут оказаться активными и в отношении микроорганизмов.

ПУТИ И СПОСОБЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТРЕБНОСТЕЙ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основной способ изучения физиологических потребностей микроорганизмов состоит в том, что их выращивают на средах определенного состава, отмечая при этом скорость роста, урожай биомассы, энзиматическую активность, качественный и количественный состав образующихся продуктов и прочие проявления их жизнедеятельности. Существует множество натуральных, полусинтетических и синтетических сред, применяемых в жидком или агаризованном виде. Необходимость употреблять различные среды диктуется разнообразием физиологических особенностей микроорганизмов и задачами исследования.

Среды, подходящие для длительного поддержания культур микроорганизмов, могут сильно отличаться от сред, предназначенных для получения тех или иных продуктов обмена. В последнем случае нередко приходится настолько форсировать отдельные стороны жизнедеятельности микроорганизмов, что это приводит к гибели последних в конце бродильных и ферментационных процессов. Особые среды нужны для образования спор и других покоящихся форм жизненного цикла. Существуют, наконец, диагностические среды, позволяющие четко выявлять те или иные характерные свойства исследуемых микроорганизмов, но которые, однако, не являются оптимальными для роста последних или длительного сохранения их в активном состоянии.

Перечислять имеющиеся среды было бы слишком долго. Мы ограничимся лишь некоторыми общими методическими указаниями, надеясь, что они могут оказаться полезными в работах по подбору сред и изучению физиологических потребностей микроорганизмов.

Зольные элементы

В микробиологических лабораториях широкое применение находят такие натуральные среды, как мясной бульон, пивное и виноградное сусло, заторы из крахмалсодержащего сырья

(картофеля, муки), молоко, кровяная сыворотка. В них содержится достаточное количество зольных элементов, необходимых микроорганизмам. Но в синтетические среды (а иногда и в полусинтетические) приходится вносить соответствующие минеральные соли. Примерные концентрации этих солей указаны в табл. 10.

Таблица 10

Концентрации минеральных солей, необходимые для нормального роста различных микроорганизмов

Соли	Необходимые концентрации, г/л		Соли	Необходимые концентрации, г/л	
	для бактерий	для грибов и актиномицетов		для бактерий	для грибов и актиномицетов
K_2HPO_4	0,2—0,5	1—2	Na_2MoO_4	0,001—0,005	0,01—0,02
KH_2PO_4	0,2—0,5	1—2	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	—	0,02—0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1—0,2	0,2—0,5	$CoCl_2$	до 0,03	до 0,06
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,005—0,01	0,02—0,1	$CaCl_2$	0,01—0,03	0,02—0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005—0,01	0,05—0,2	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001—0,005	0,01—0,05

Солевой состав сред можно видоизменять с таким расчетом, чтобы суммарная концентрация каждого катиона или аниона соответствовала указанным в таблице количествам. О концентрации минеральных источников азота будет сказано ниже. Вместо внесения микроэлементов иногда ограничиваются тем, что готовят среды на водопроводной воде. Но для некоторых специальных целей бывает недостаточно содержащихся в этой воде микроэлементов. В частности, грибам необходимо добавлять цинк, азотфиксаторам — молибден, микробам, образующим витамин B_{12} , — кобальт. Кальциевые соли совершенно необходимы для азотобактера и спорообразующих бактерий. В остальных случаях хватает тех небольших концентраций кальция, которые имеются в водопроводной воде. Избыток фосфора вредит образованию некоторых антибиотиков (например, тетрациклина). Поэтому в средах для актиномицетов — продуцентов этих антибиотиков фосфор должен присутствовать в виде следов. Избыток железа мешает образованию рибофлавина и витамина B_{12} .

Микроорганизмы могут обходиться значительно более низкими концентрациями солей, чем указано в таблице. Правда, это ведет к замедлению их роста. Применение более высоких концентраций создает повышенное осмотическое давление, что также затрудняет рост микроорганизмов. Исключение представляют галотолерантные микробы, обитающие в соленых водоемах.

Источники углерода

Основной компонент каждой среды — это источник углерода. Для автотрофных организмов источником углерода служит углекислота. Обычно с этой целью в среду вносят бикарбонат. При культивировании гетеротрофов применяют весьма разнообразные органические соединения, чаще всего — углеводы, спирты или кислоты. Иногда рекомендуется давать одновременно несколько разных источников углерода, например, добавлять в глюкозные среды ацетат или другие органические кислоты. В среды для некоторых специализированных микробов дают жиры, парафины, ароматические соединения и даже газообразные углеводороды (метан, пропан и пр.).

Приготовление питательных сред с растворимыми органическими веществами не представляет никаких трудностей. Не следует только забывать, что сахара (и больше других — фруктоза, лактоза и арабиноза) при сильном нагревании, особенно при щелочной реакции, разлагаются, образуя вредные для микробов продукты, окрашенные в коричневый цвет. Поэтому сахарные среды стерилизуют в автоклаве при температуре не выше 105° или же прибегают к дробной стерилизации в аппарате Коха.

Крахмалсодержащие среды (мучные заторы) следует предварительно оклейстеризовать при $60-70^{\circ}$, помешиванием не допуская образования комков. После этого среды прогревают до 100° на водяной бане или в кипятильнике. Затем они стерилизуются в автоклаве при 1,5—2 атмосферах. Чем выше температура стерилизации, тем лучше разваривается крахмал, переходя в растворимое состояние.

Целлюлозу добавляют в среду в виде полосок фильтровальной бумаги (Имшенецкий, 1953). Нерастворимые в воде жиры, парафины и т. п. вещества приводят в соприкосновение с жидкой средой, налитой тонким слоем (Таусон, 1950). Такие вещества, как нефть или жидкие масла, могут находиться на поверхности жидкости в виде тонкого слоя. Если исследуемые микроорганизмы нуждаются в аэрации, колбы ставят на качалку или продувают через нее воздух.

Простые спирты и альдегиды нельзя стерилизовать нагреванием ввиду их летучести. Однако это и не обязательно, так как они сами являются антисептиками. Не позже чем через 1—2 дня случайно попавшие в них споры бактерий полностью погибают, а вегетативные клетки гибнут еще раньше. После выдерживания спирты можно асептически с помощью пипетки добавлять в среды. Посуду, в которой они хранятся, рекомендуется предварительно простерилизовать, чтобы уничтожить микробные клетки, прилипшие к горлышку колбы и к пробке.

Углекислоту, метан и другие газообразные источники углерода либо продувают через среду, либо помещают склянки со

средой в эксикатор, заполненный смесью воздуха и испытуемого газа.

Источники углерода совершенно необходимы только в тех случаях, когда в качестве источника азота применяются минеральные соединения. Органические азотистые вещества нередко одновременно могут служить микробам источниками как углерода, так и азота.

Источники азота

Минеральные формы азота в виде навесок вносятся в среду. Снабжение газообразным азотом осуществляется или просто благодаря соприкосновению питательной среды с воздухом (особенно в тех случаях, когда она помещена на качалку), или же путем продувания через жидкость определенного объема азота — чистого или смешанного с кислородом. Последний способ позволяет аналитически учесть потребление газообразного азота.

Белки. При отсутствии готовых белковых препаратов их можно приготовить путем экстракции из растительных материалов соответствующими растворителями: альбумины (которых, впрочем, в растениях довольно мало) — водой, глобулины — слабым раствором солей. Особенно много глобулинов в фасоли и других бобовых растениях. Спирторастворимые белки выделяют из пшеничной муки 70%-ным спиртом или из кукурузной муки 90%-ным спиртом. Можно также делать экстракцию слабым (0,05 н.) раствором щелочи. Она извлекает почти все свободные запасные белки. Легко доступен также альбумин яичного белка, отделяемый механически от желтка, и казеин, выпадающий из молока после подкисления.

Полученные белки очищают путем повторного переосаждения. Глобулины и альбумины можно осадить спиртом, ацетоном или сульфатом аммония. В зависимости от особенностей данного белка, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ вносят в разных количествах: в одних случаях до полного насыщения (750 г на 1 л белкового раствора), в других случаях — какую-то часть от полного насыщения ($\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ и т. д.). Спирторастворимые белки осаждают водой. Извлеченные щелочью белки (а также казеин) выпадают в осадок при подкислении раствора до изоэлектрической точки (обычно до $\text{pH}=4-5$) уксусной кислотой.

Осадок белка отделяют от жидкости путем центрифугирования и вновь растворяют в соответствующих растворителях, т. е. в воде, солевых растворах, щелочах или спирте. Белок можно освободить от растворителей также путем диализа через мешочки из коллодия.

Осаждение и растворение повторяют несколько раз. Очищенный белок обезвоживают, перенося его в спирт последова-

тельно возрастающих концентраций вплоть до абсолютного, и затем высушивают под вакуумом. Необезвоженный белок при высушивании роговеет и для работы уже не годится.

Чтобы избежать образования сгустков, малодоступных для питания микробов, белок стерилизуют в 0,05 н. растворе КОН при температуре не выше 100°. Хотя белок при этом химически изменяется (денатурируется), но в осадок не выпадает. После стерилизации среду асептически подкисляют фосфорной кислотой до нужного рН. Фосфаты в такую среду добавлять уже не приходится.

Для выявления протеолитической способности микробов обычно применяется продажная желатина. Это — производное натуральных склеропротеинов, потерявшее способность свертываться при кипячении. В качестве азотного питания желатина неполноценна, т. е. в ней недостает много важных аминокислот.

Белки доступны далеко не всем микроорганизмам. Гораздо шире используются пептоны и другие протеолизаты.

Пептоны. Так принято называть продукты неполного расщепления белков протеолитическими ферментами. Они представляют собой смесь разнообразных полипептидов, включая высокомолекулярные, которые приближаются к настоящим белкам (раньше такие пептиды называли «альбумозами» и «протеозами»). Наряду с ними пептоны содержат низкомолекулярные пептиды и даже свободные аминокислоты.

В продаже имеется много марок пептонов. Классический пептон, предложенный еще в прошлом веке, вырабатывался из поступающих с бойни свиных желудков, которые содержат большое количество пепсина — протеолитического фермента желудочного сока. Пепсин вызывает расщепление («переваривание») белков стенок желудка (для этого последний должен быть измельчен). Позднее пользовался известностью пептон Витте. В настоящее время некоторые фирмы производят стандартные препараты пептонов, различающихся между собой степенью протеолиза. Например, протеозный пептон американской фирмы Дифко готовится путем кратковременного воздействия пепсином. Он содержит в себе много высокомолекулярных пептидов. Обычный пептон, состоящий из более коротких пептидов, получается при более глубоком протеолизе. Под названием «триптон» упомянутая фирма выпускает продукт дальнейшего расщепления белков с помощью трипсина — фермента поджелудочной железы. Триптическое переваривание ведет к образованию низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот.

Препараты белковых протеолизатов можно без особого труда приготовить в лаборатории. Типичные пептоны получают путем обработки белков пепсином при рН 1,7—1,9 и темпера-

туре 35—40°. Во время такого переваривания стерильность поддерживается при помощи антисептиков (тимол + хлороформ). Полный протеолиз наступает через 5 и более дней. Полученные пептоны содержат около 10—15% свободных аминогрупп, остальные остаются связанными с карбоксилами.

Чтобы добиться более глубокого протеолиза, полученный после пептического переваривания препарат подщелачивают до рН 8 и подвергают действию трипсина. В последние годы вошел в употребление также фермент папаин (катепсин), действующий на белок при рН 4—5.

Для контроля за ходом протеолиза при препаративном изготовлении пептонов служит биуретовая реакция (10 мл испытуемого раствора + 2,5 мл 33%-ной NaOH + 1 мл 0,2%-ного CuSO₄). Эта реакция исчезает одновременно с разрывом всех пептидных связей. Биуретовую реакцию можно использовать и для количественного определения пептидных связей, измеряя степень окраски в фотоколориметре. Существует ряд других аналитических приемов, позволяющих наблюдать за ходом протеолиза. Описание их дано в практических руководствах по биохимии.

Таблица 11

Состав некоторых протеолизатов

Препараты	Биуретовая реакция	Фракции, % к общему азоту		
		протеазная	пептонная	низкомолекулярная
Пептон Фармакон	+	63,5	9,7	27,8
Пептон Витте	+	44,1	26,7	29,2
» Кальбаум	+	40,2	27,4	32,4
» Гее	+	44,5	23,2	32,3
Пептический протеолизат	+	42,1	25,2	32,7
Пептон Рош	+	25,3	11,7	63,0
Триптический протеолизат	+	2,0	14,9	83,1
Гидролизат глютена	—	0	0	100
» желатины	—	0	0	100

В качестве примера в табл. 11 приведены полученные нами данные о составе различных протеолизатов. При этом высокомолекулярные полипептиды, осаждаемые таннином в присутствии 2% H₂SO₄, условно обозначены «протеозами». Фракция, осаждаемая таннином только при нейтральной реакции среды, в табл. 11 называется «пептонной». Под низкомолекулярной фракцией подразумеваются пептиды и свободные аминокислоты, которые таннином не осаждаются.

Исследованные протеолизаты распадаются на четыре группы. В первую входит пептон, выпускавшийся в 30-х годах

заводом Фармакон, который изготавливался путем легкого гидролиза белка. Высокомолекулярные пептиды достигают в нем 63%. Ко второй группе относятся типичные пептоны — продукты расщепления белков пепсином. Высокомолекулярная фракция в этих препаратах составляет только 40—44%. В триптическом протеолизате указанная фракция почти совсем отсутствует, но зато содержание низкомолекулярных пептидов и свободных аминокислот в нем возросло до 80%. Продажный препарат фирмы Рош занимает промежуточное место. Возможно, что его готовят при помощи трипсина, но действуют последним более короткое время. Четвертая группа — это препараты, полученные в лаборатории путем кислотного гидролиза белка. Они не дают биуретовой реакции, так как состоят из свободных аминокислот.

Белковые гидролизаты. В результате нагревания в сильно кислых или щелочных растворах белки расщепляются до отдельных аминокислот с небольшой примесью коротких пептидов. При этом часть аминокислот разрушается. В случае щелочного гидролиза особенно страдают аргинин и цистеин, а отчасти также гистидин и серин. При кислотном гидролизе разрушается полностью триптофан и частично — цистеин. Существуют два способа кислотного гидролиза.

1. Белок заливают 10-кратным (по отношению к белку) объемом 25—30%-ной H_2SO_4 и кипятят 24 часа (можно с перерывами). Затем разбавляют водой, нейтрализуют кислоту мелом, отфильтровывают выпавший гипс и избыток мела, обесцвечивают углем. Для нейтрализации можно также пользоваться баритом. При этом H_2SO_4 удаляется более полно. Избыток барита осаждают током углекислоты.

2. Белок заливают 5-кратным объемом 20%-ной HCl и кипятят 24 часа или заливают 10-кратным объемом крепкой HCl (уд. вес 1,19) и кипятят 12 часов. По окончании гидролиза раствор упаривают в вакууме, затем доливают водой и повторяют операцию выпаривания несколько раз до полного удаления HCl (контроль отгона с помощью индикатора на pH).

Очищенный гидролизат можно упарить под вакуумом досуха. Однако он очень гигроскопичен и вскоре слипается в комки. В связи с этим гидролизат обычно сохраняют в виде концентрированного жидкого раствора.

Особенно широкое распространение в лабораторной практике получил гидролизат казеина, содержащий все важнейшие аминокислоты кроме триптофана.

Нередко в качестве источника азота берут отдельные аминокислоты или их амиды (чаще всего аспарагин). Применение аминокислот — соединений, водорастворимых и термоустойчивых — не представляет никаких трудностей.

Ростовые вещества

В настоящее время большинство витаминов и их производных изготавливается в промышленном масштабе и продается в виде чистых препаратов. Некоторые свойства их показаны в табл. 12.

Таблица 12

Некоторые особенности факторов роста микроорганизмов

Вещество	Устойчивость к нагреванию в слабо щелочной среде	Светочувствительность	Концентрации, влияющие на рост микроорганизмов, мг/л	
			минимальная	оптимальная
Фолиевая кислота	—	+	0,00001	0,001
П-аминобензойная кислота	+	—	0,00001	0,001
Биотин	+	—	0,00001	0,001—0,01
Тиамин	—	—	0,0001	0,01—0,1
Компоненты тиамина	+	—	0,001	0,01—0,1
Пиридоксин	+	+	0,0001	0,01—1,0
Са-пантотенат	—	—	0,005	0,05—1,0
Рибофлавин	—	+	0,005	0,05—1,0
Ниацин	+	—	0,01	0,1—1,0
β-аланин	+	—	0,1	0,5—1,0
Холин	+	—	0,1	1—2
Инозит	+	—	1	3—6
Пуриновые и пиримидиновые основания	+	—	1	5—10

Все перечисленные в таблице факторы роста более или менее растворимы в воде, кроме пуринов, которые хорошо растворяются лишь при щелочной или кислой реакции среды. Подавляющее большинство ростовых веществ растворяется в 70—90 %-ном спирте. В жировых растворителях (эфире, хлороформе и др.) растворяются только пиримидиновый и тиазольный компоненты тиамина, а также пантотеновая кислота. Цифры, характеризующие биологическую активность ростовых веществ, имеют ориентировочное значение, так как она зависит от состава среды и физиологических особенностей микроорганизмов. Когда, например, организм полностью лишен способности синтезировать данное соединение, следует брать более высокие концентрации, чтобы повлиять на его рост. Если же микроорганизм достаточно быстро синтезирует какое-либо вещество, то оно вообще не окажет на него никакого стимулирующего действия.

В сухом виде все витаминоподобные вещества, необходимые микроорганизмам, сохраняются достаточно хорошо. Рибофлавин, пиридоксин и фолиевую кислоту необходимо беречь от света. В растворах витамины менее устойчивы против действия кислорода, щелочей и микробов. Поэтому посуду предварительно стерилизуют и для растворения витаминов пользуются стерильной водой. При работе с неустойчивыми к щелочам витаминами воду слегка подкисляют соляной кислотой (до рН около 3). После этого растворы витаминов закрывают ватной пробкой и стерилизуют более устойчивые — в автоклаве, менее устойчивые — на водяной бане, повторно. Уровень жидкости в посуде отмечают чертой, чтобы впоследствии можно было асептически пополнять испаряющуюся воду. Взяв стерильной пипеткой раствор витамина, следует каждый раз снова отмечать уровень оставшейся жидкости.

Очень удобно сохранять витамины не в водных, а в 70%-ных спиртовых растворах. В этом случае стерильность наступает приблизительно через сутки; прогревать раствор не требуется. Для биологически активных веществ, не выдерживающих нагревания и в спирту нерастворимых (например, белок авидин) в нашей лаборатории с успехом применялась химическая стерилизация. С этой целью сухую навеску заливают ацетоном и оставляют на несколько дней при комнатной температуре до полного испарения ацетона.

Исходные растворы обычно готовят из расчета от 1 до 500 мг витамина на 1 л воды, в зависимости от его растворимости и степени активности. В питательные среды витамины вносятся в ничтожных количествах, поэтому из исходных растворов приходится делать надлежащие разбавления, соблюдая правила асептики.

За неимением чистых витаминов можно иногда пользоваться натуральными субстратами. Особенно богаты всеми витаминами автолизат печени и автолизат дрожжей. Впрочем, они содержат кроме того много свободных аминокислот. Для приготовления дрожжевого автолизата смешивают 500 г свежих дрожжей (лучше пивных, но можно и пекарских) с 500 мл воды, прокипяченной и остуженной до 60°. Смесь выдерживают 3—4 дня при 45—50°. Отделенный от жидкости, клейкий, очень трудно фильтрующийся осадок промывают 250 мл воды. Обе порции жидкости соединяют, прогревают полчаса в автоклаве при 105° и фильтруют до получения полной прозрачности. Такой автолизат в количестве 20—30 мл на 1 л среды удовлетворяет потребности большинства микроорганизмов, многие же из них довольствуются 0,5—1 мл автолизата на 1 л и даже меньшими количествами.

Хорошим источником витаминов является также дрожжевая вода. Ее готовят путем кипячения 100 г свежих дрожжей в 1 л

воды. После этого дают дрожжам отстояться, жидкость декантируют и фильтруют. Полученная таким образом дрожжевая вода содержит мало сухих веществ (около 0,5%). Преимущество ее в том, что среди этих веществ много витаминов и сравнительно мало аминокислот.

Много витаминов содержится в таких растительных материалах, как отруби, солодовые ростки, картофельный сок. Молоко и молочная сыворотка богаты рибофлавином. Продажные препараты пептонов содержат в себе примесь большего или меньшего количества витаминов. В связи с этим необходимо обращать внимание на марку пептона. Наблюдения, сделанные с одним пептоном, с пептоном другого происхождения могут не подтвердиться.

Аминограммы и ауксограммы микроорганизмов

Под «аминограммой» подразумевается список аминокислот и под «ауксограммой» — список витаминоподобных веществ, проявляющих активность в отношении данного микроорганизма. Некоторые из них абсолютно необходимы для его развития, другие только стимулируют рост, так как микроорганизм синтезирует их сам, хотя и с замедленной скоростью.

Аминограмму выясняют следующим образом. Приготавливают синтетическую среду, содержащую 0,1% аспарагина или аммонийных солей в качестве источника азота, хорошо усвояемые источники углерода, необходимые зольные элементы и витамины. При незнании потребностей микробов в витаминах, в качестве источника последних можно применять дрожжевой автолизат или дрожжевую воду. Исследуя микробы, способные усваивать окисленный азот, аммонийные соли можно заменить нитратами.

Если на указанных синтетических средах не происходит роста или же культура перестает расти при следующем пересеве, в среду добавляют 0,2—0,3% гидролизата казеина +20—50 мг/л триптофана. Появление роста после такого обогащения среды доказывает, что исследуемые микроорганизмы нуждаются в тех или иных аминокислотах. Отсутствие роста культуры указывает на то, что не были учтены какие-то еще потребности организма (в источниках углерода, зольных элементах, рН, гН₂). В таком случае аминокетотрофность остается недоказанной.

Установив аминокетотрофность микроорганизма, можно приступить к изучению его потребностей в отдельных аминокислотах. Для этого требуются строго синтетические среды, не содержащие таких натуральных материалов, как дрожжевой автолизат, в которых всегда имеются аминокислоты. Поэтому следует сначала изучить потребность микроорганизма в витами-

ноподобных веществах. Зная эти потребности, готовят среду, содержащую все необходимые витамины, минеральные соли, источник углерода, аммонийную соль и минимальное количество аминокислот. С этой целью в среду вносят препараты всех аминокислот, в которых могли бы нуждаться микроорганизмы (рис. 26), по 20—50 мг каждой на 1 литр среды или же 0,1% гидролизата казеина + 20 мг/л триптофана. Добавляя в такую среду поочередно отдельные аминокислоты в количестве 100—200 мг на литр, отмечают, какие из них стимулируют рост культуры. Для окончательной проверки из среды удаляют смесь всех аминокислот (или, соответственно, гидролизат казеина), заменив ее одними отобранными аминокислотами, и убеждаются, что после этого культура может нормально развиваться.

Ауксограмма. Перед составлением ауксограммы следует проверить, нуждается ли вообще данный организм в каких-либо витаминopodobных веществах. Для этого берут среды с возможно более чистыми источниками углерода, так как в них нередко имеется примесь витаминов. Рекомендуется еще очистить их активированным углем типа «норит» — сначала при нейтральном, потом при кислом рН (3—4). В качестве источника азота применяют аммонийную соль или, если микроб нуждается в аминокислотах, — гидролизат казеина, свободный от витаминов. Не содержащие витаминов препараты гидролизата казеина имеются в продаже. В случае отсутствия таких препаратов приходится прибегать к довольно кропотливой очистке гидролизата от витаминов с помощью угля и других адсорбентов (например, специальных ионно-обменных смол) при различных рН.

Если на синтетических средах, приготовленных по вышеуказанному способу, организм не развивается, следует сделать вывод о его потребности в каких-либо витаминах. Тогда добавляют 1 мл дрожжевого автолизата на 100 мл среды или же дрожжевую воду в количестве 10—20 мг% по сухому весу. Появление роста на таких средах доказывает, что микроорганизмам действительно необходимы какие-то витамины.

Для выяснения потребностей микробов в определенных витаминах пользуются одним из следующих трех способов.

1. Берут синтетическую среду с добавлением в нее минимальных количеств натуральных источников витамина. На такой голодной среде происходит крайне слабый рост. В нее поочередно вносят те или иные витамины, наблюдая, вызывает ли это усиление роста. Таким путем можно выяснить потребность микробов в определенных витаминах, хотя и не удастся различать, является ли данный витамин обязательным для развития микроба или только стимулирует его рост.

2. Готовят синтетические среды, содержащие смесь всех известных витаминов. Отнимая поочередно то тот, то другой ви-

тамин, нетрудно установить, какие именно из них обязательны, какие только стимулируют рост и какие вовсе не активны в отношении данного микроорганизма (рис. 54). Этот способ наиболее точен и надежен. Однако для проведения такого рода экспериментов необходимо иметь в своем распоряжении полный набор витаминов.

3. Третий способ состоит в избирательном удалении испытуемых веществ из полноценной натуральной среды, насколько

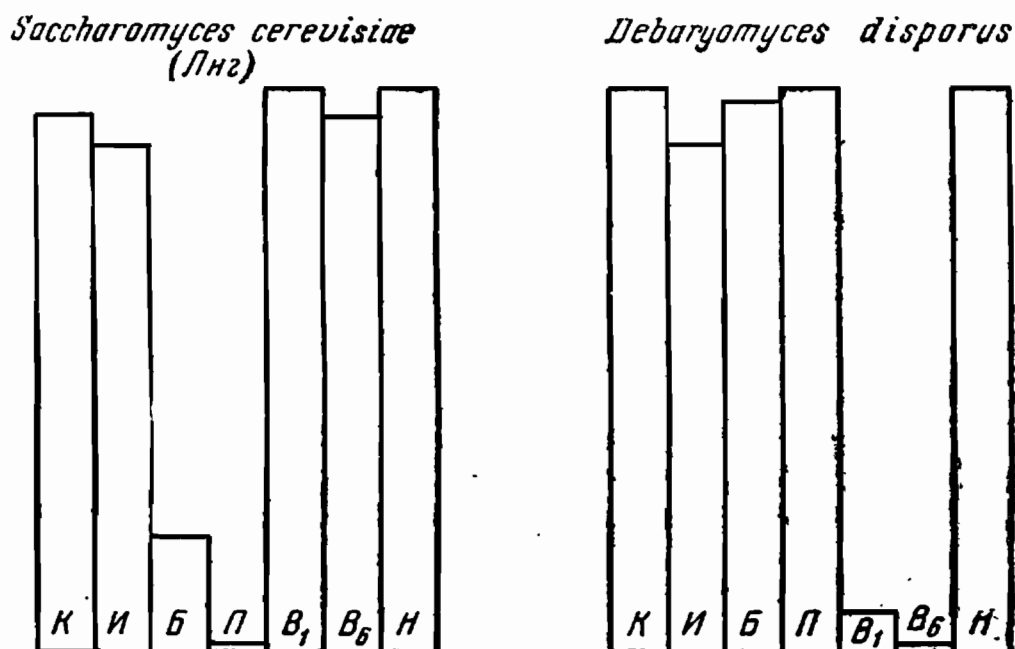


Рис. 54. Рост двух видов дрожжей на синтетической среде с 6 витаминами (К) и на такой же среде без одного из витаминов:

И — без инозита; Б — без биотина; П — без пантотената; В₁ — без тиамина; В₆ — без пиридоксина; Н — без никотиновой кислоты.

По Одинцовой, 1959

это возможно. В качестве средств для удаления витаминов применяют следующие:

а) адсорбция их активированным углем при нейтральной или кислой реакции среды. Вещества с кислотными свойствами (например, пантотеновая, фолиевая, п-аминобензойная и никотиновая кислоты) адсорбируются при рН 3—4, более нейтральные соединения, подобно тиамину, рибофлавиону и инозиту, адсорбируются при рН около 7. Биотин хорошо адсорбируется и в том и в другом случае;

б) разрушение витаминов в слегка щелочной среде (отношение их к нагреванию показано в табл. 12);

в) разрушение светом, что в особенности относится к рибофлавиону. С этой целью раствор, подщелоченный NaOH до 1 н., держат на расстоянии 30 см от лампы в 100 W в течение 6—10 часов, а затем еще сутки на рассеянном свете при комнатной температуре. К сожалению, такая обработка может

повлиять и на некоторые другие органические компоненты, что ухудшит питательные качества среды;

г) биотин можно удалить из среды путем связывания его авидином, а за неимением чистого авидина — яичным белком. Получившийся биотин-авидиновый комплекс отделяется от жидкости диализом в коллоидных гильзах. На связывание 1 мкг биотина требуется около 0,5 г яичного белка.

Микробиологические методы определения аминокислот и витаминов

Обязательные аминокислоты, витамины и другие вещества, объединяемые под названием «факторов роста», представляют собой нечто вроде готовых деталей, используемых клеткой для построения компонентов протоплазмы — белков, нуклеотидов, коэнзимов и пр. В качестве источника энергии эти вещества не используются. Поэтому при определенных условиях прирост биомассы бывает пропорционален их концентрации. Следует различать минимальную или «пороговую» концентрацию, ниже которой организм вообще не отзывается на ростовые вещества, и оптимальную дозу, при которой рост культуры достигает наибольшей величины и больше уже не может повыситься, так как роль лимитирующих факторов теперь начинают выполнять другие компоненты среды (например, азот).

Некоторые аминокислоты и витаминopodobные вещества представляют собой обязательные факторы роста: в отсутствие их микробная культура не развивается. Другие только стимулируют рост, но он протекает и в их отсутствие. С помощью микроорганизмов можно определять как те, так и другие вещества.

Суть микробиологических методов состоит в следующем. Берут полноценную питательную среду, содержащую в избытке все, что только нужно данному микроорганизму, за исключением анализируемых ростовых веществ. Иногда среды состоят из определенных химических ингредиентов, в других случаях готовят полусинтетические среды, предварительно удалив из них испытуемое вещество путем избирательной адсорбции или разрушения (см. выше).

В контрольный ряд пробирок вносят возрастающие количества чистого препарата аминокислоты или витамина. В опытный ряд вносят испытуемые материалы. Сопоставляя урожай микробной биомассы в опыте и контроле, высчитывают содержание определяемого вещества. Рост измеряют одним из общепринятых способов, чаще всего нефелометрически или же косвенно — по кислотообразованию и газовой выделению (гл. 7).

В качестве тест-объекта особенно часто применялись различные молочнокислые бактерии: *Lact. casei*, *Lact. arabinosum*, *Lact. delbrückii*, *Str. faecalis* и др. С их помощью можно определять различные аминокислоты, а также и витамины: рибофлавин, биотин, пиридоксин, фолиевую и пантотеновую кислоты, ниацин и др. (рис. 55).

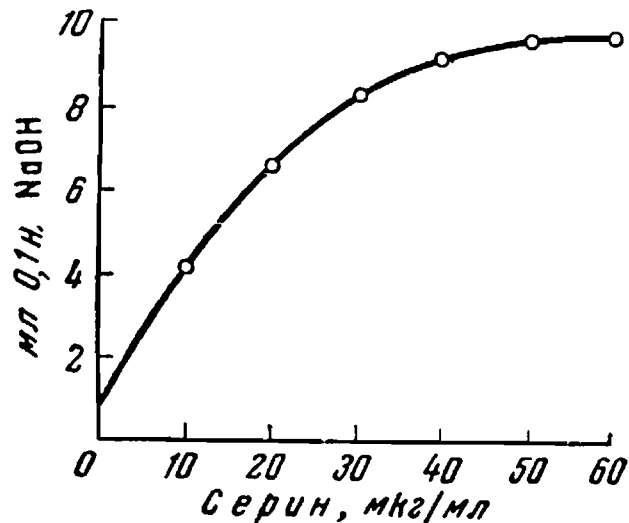


Рис 55. Стандартная кривая для определения серина Тест-объект *Leuconostoc mesenteroides* P-60. По Снеллу, сборник «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот», 1954

Второй обычный тест-объект — различные представители дрожжей. Методы анализа шести витаминов группы В с помощью дрожжей подробно изложены в книге Е. Н. Одинцовой (1959).

Микробиологические методы выгодно отличаются от химических своей высокой чувствительностью. С их помощью можно количественно определять десятые, а иногда и сотые доли микрограмма интересующего нас витамина. Между тем для химических анализов требуется каждый раз брать несколько микрограммов.

Недостатком микробиологических методов является то, что микроорганизмы часто реагируют не только на испытуемые вещества, но и на ряд других близких к ним соединений. Кроме того, микробы обычно нуждаются не в одном, а в нескольких факторах роста, в связи с чем приходится готовить очень сложные синтетические среды, содержащие иногда более 30 компонентов. Сказанное в особенности относится к молочнокислым бактериям.

Чтобы избежать этих трудностей, в качестве тест-объекта стали пользоваться специально полученными мутантами, которые хорошо развиваются на простых синтетических средах и нуждаются лишь в каком-либо одном факторе роста. Таковы,

например, мутанты грибка *Neurospora* и кишечной палочки (*Esch. coli*).

Некоторые витамины, обладающие высоким молекулярным весом, медленно диффундируют по вязким средам. К ним относятся, в частности, фолиевая кислота и витамин В₁₂. Такие витамины можно определять не только с помощью жидких культур, но и методом диффузии в агар. С этой целью агаризованная питательная среда, не содержащая испытуемого витамина,

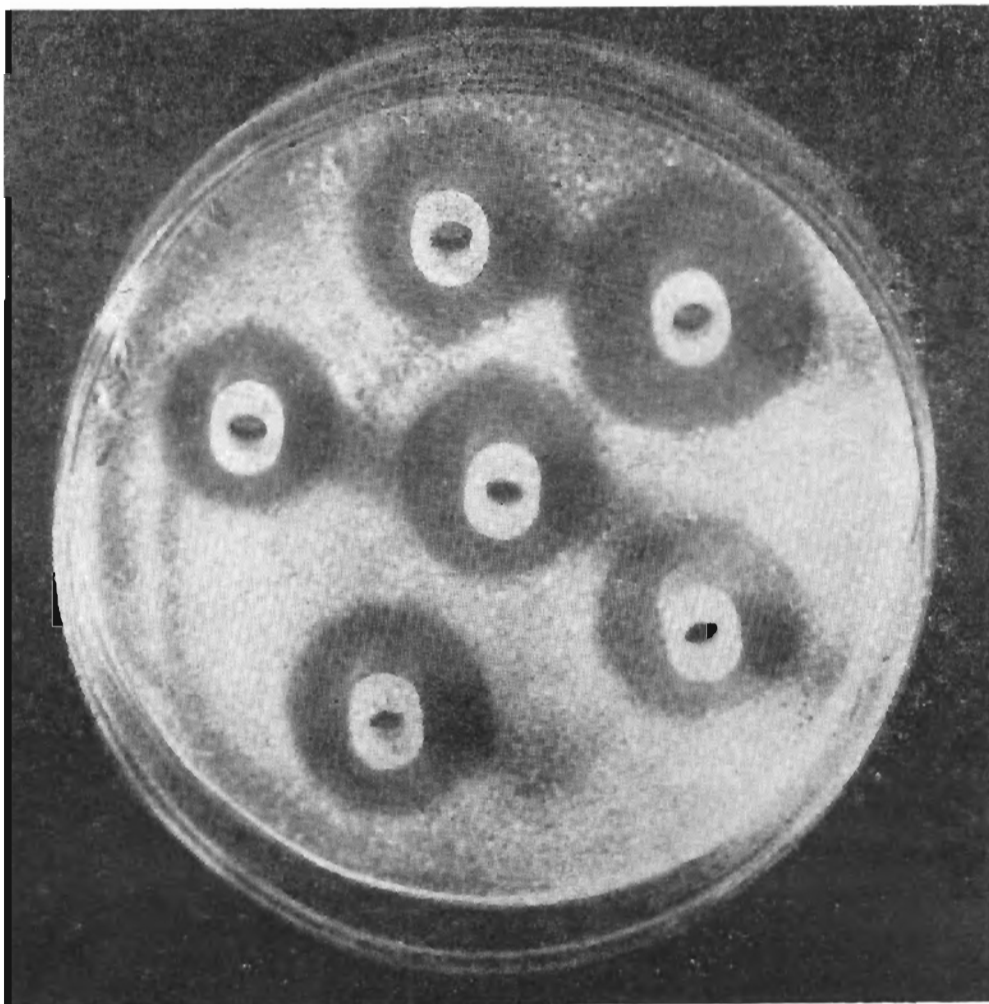


Рис 56 Чашка Петри с цилиндриками для определения антибиотиков по размерам зон угнетения роста

смешивается в расплавленном состоянии (при температуре около 38—40°) с суспензией клеток тест-объекта. На поверхности застывшего агара располагают цилиндрики из стекла или нержавеющей стали (внутренний диаметр — около 5 мм), обычно по шесть цилиндриков на чашку Петри. В каждый из них наливают несколько капель испытуемой жидкости или стандартного раствора витамина. Витамины диффундируют в агар, в связи с чем вокруг цилиндриков образуются круглые зоны роста тест-микроорганизма. За пределами зоны концентрация

витамина слишком низка и роста там не происходит. Измерив диаметры зон, можно с помощью специальных таблиц или номограмм рассчитать количество испытуемого витамина.

Такой же диффузионный метод применяют для определения антибиотиков. Только в данном случае вместо зоны роста появляется, наоборот, зона угнетения. В этой зоне агар остается прозрачным, а дальше он кажется мутным из-за выросших в нем клеток тест-объекта (рис. 56). Вместо цилиндриков можно класть бумажные кружочки, пропитанные стандартными растворами антибиотиков. Наборы таких кружков в готовом виде выпускаются некоторыми фирмами.

Подобно аминокислотам и витаминам, с помощью микробов можно определять количество минеральных веществ, например, фосфатов или солей калия.

ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

Организм неотделим от среды. Можно даже сказать, что он создан ею в процессе эволюции. Связь организма со средой проявляется и в течение его индивидуального развития, причем она имеет многосторонний характер: ассимилируя питательные вещества, организм растет и развивается; на изменение условий питания он отвечает приспособительной перестройкой своего обмена веществ; если же внешние воздействия выйдут за пределы унаследованной им нормы реакций, произойдут те или иные нарушения физиологии организма, которые в одних случаях ведут к его гибели, в других случаях — к изменению наследственности.

В связи со сказанным, вопрос о влиянии среды на обмен веществ микроорганизмов распадается на следующие основные разделы:

- 1) эволюционная приспособленность к среде обитания;
- 2) адаптивно-физиологическая изменчивость;
- 3) нарушения физиологии обмена веществ;
- 4) наследственная изменчивость.

Эволюционная приспособленность микроорганизмов к среде обитания

Физиологическое разнообразие микроорганизмов. Каждый вид живых существ в процессе своего исторического развития приспособляется к определенной среде обитания. Эволюция изменяет строение органов, их функции и отправления, творит новые формы жизни, часто поражающие нас своим бесконечным разнообразием. Что, казалось бы, есть общего между нитчатыми водорослями, которые в виде зеленых прядей плавают в ручейках, и высоким ветвистым дубом? Что есть общего между бабочкой-шелкопрядом и рыбой, улиткой и слоном?

Но несмотря на внешние различия, все зеленые растения наделены одинаковым типом обмена веществ. Для их питания нужны минеральные соли и углекислота, усваиваемая из воздуха путем фотосинтеза. Все они дышат, поглощая атмосферный кислород.

Совпадает в основных чертах и тип питания у всех животных, начиная от одноклеточных протистов и кончая млекопитающими. Кроме солей им требуются еще органические вещества: белки, жиры, углеводы, витамины. Источником жизненной энергии всем им служит кислородное дыхание.

Историческое развитие каждой из этих ветвей дерева жизни — растений и животных — шло, очевидно, не столько по пути специализации обмена веществ, сколько по пути усложнения морфологии, по пути создания многочисленных и разнохарактерных органов, приспособленных к выполнению определенных функций.

В мире микроорганизмов наблюдается противоположная картина. Морфология микробов проста и однообразна. Различить по внешнему виду некоторые бактерии почти нет возможности. Но зато ни в одной другой группе живых существ мы не встретим столь изумительного физиологического разнообразия, как у микроорганизмов. Среди них есть гетеротрофы, более прихотливые в своих потребностях, чем высшие животные, и автотрофы, менее требовательные, чем зеленые растения. Некоторые бактерии дышат без кислорода, а азот берут из воздуха. Другие микробы используют для питания такие трудно доступные вещества, как нефть, сера, газообразный водород или железные соли.

Может создаться обманчивое впечатление, что микробы послужили для природы объектом, на котором она пробовала свои силы, прежде чем нашла два наиболее удачных основных типа питания: животный и растительный. Остановив свой выбор на этих типах питания, она уже не отступала от них при создании всех остальных, более сложно устроенных организмов.

Такое представление было бы неверным. Не следует думать, что микроорганизмы — это лишь неудачные модели природы. Напротив, своеобразие обмена веществ служит микробам могучим средством в борьбе за свое место в экономике природы. Не морфология клетки, простая и однообразная, а крайне специализированная физиология легла в основу эволюционного приспособления микробов к окружающей обстановке. Недаром при диагностике микробов так много внимания уделяют физиолого-биохимическим признакам. Вопрос об эволюции их обмена веществ обстоятельно рассматривается, например, в книге В. Н. Шапошникова «Физиология обмена веществ микроорганизмов в связи с эволюцией функций» (1960).

Энергетический обмен микробов необычайно мощен. Непропорционально большие количества веществ, перерабатываемых ничтожными по величине микробами, позволили в свое время Пастеру говорить о «бесконечно большой роли бесконечно малых существ» (Пастер, 1937). Во введении к этой книге было уж сказано, что бактериальная клетка может потреблять за сутки количество пищи, превышающее в 30—40 раз ее собственный вес. Крупнейшая роль, принадлежащая микробам в круговороте веществ, определяется главным образом их энергетическим обменом.

Интенсивность биохимической деятельности микроорганизмов связана прежде всего с их бурным ростом и размножением. Кроме того, микробы, как правило, не до конца разлагают субстрат и неполностью используют содержащуюся в нем энергию. Благодаря этому им приходится перерабатывать большие количества веществ. И наконец, в качестве материала для биосинтеза компонентов своего тела некоторые бактерии используют такие вещества, как углекислота или атмосферный азот. Для усвоения этих веществ требуются повышенные количества энергии и, следовательно, столь же значительные затраты энергетических материалов.

Особенности энергетических процессов у микроорганизмов зависят от особенностей мест их постоянного обитания. Вполне понятно, что анаэробные бактерии могли появиться и существовать только там, куда не проникает кислород. Разлагающие мочевины бактерии приспособились к обитанию в местах, насыщенных аммиаком, ядовитым для остальных организмов. Железобактерии типа *Gallionella* возникли в результате приспособления к жизни в водоемах достаточно богатых железом, но бедных органическими веществами. Серобактерии обитают в воде, насыщенной сероводородом.

Особой формой приспособления является паразитизм. Некоторые паразиты полностью потеряли способность к свободному образу жизни. Другие приобрели еще более узкую специализацию, приспособившись ко вполне определенным хозяевам и даже к определенным органам своего хозяина.

В почвах, илах и других природных средах деятельность микроорганизмов протекает в определенной преемственности, называемой «метабиозом». Разложение растительных остатков, богатых клетчаткой и другими углеводами, но бедных азотистыми веществами, начинают целлюлозоразлагающие грибы и миксобактерии. В результате их жизнедеятельности накапливаются продукты распада клетчатки, в том числе слизи, органические кислоты, спирты и др. Образовавшиеся органические соединения служат пищей для многочисленной гетеротрофной микрофлоры. Этап за этапом происходит минерализация растительных остатков, пока, наконец, не будет потреблен весь

содержавшийся в них азот и останутся лишь простые безазотистые вещества. Тем самым создается обстановка, благоприятная для развития азотобактера и других азотфиксаторов, способных потреблять азот из атмосферы.

Второй тип метабиоза наблюдается при разложении материалов животного происхождения. Прижизненные отбросы и трупы животных, в том числе одноклеточных протистов, содержат много белков и относительно мало безазотистых веществ. В этом случае минерализацию начинают гнилостные организмы, приспособленные к жизни за счет потребления белковых веществ. Некоторые из них могут расщеплять натуральные белки. Другие организмы, лишенные способности выделять в среду протеиназы, разлагают оставшиеся после первых микробов полипептиды, аминокислоты и безазотистые соединения. В конце концов все органические вещества будут окислены до углекислоты, но в среде останется еще достаточное количество аммиака и сероводорода, образовавшихся при распаде аминокислот. Тогда выступают на сцену нитрификаторы, серобактерии и прочие хемосинтезирующие автотрофы.

Не следует думать, что каждый микроорганизм участвует только в каком-нибудь одном этапе минерализационных процессов. Некоторые из них обладают достаточно широкими возможностями. Они могут переключаться с разложения белковых веществ на углеводное питание, с азотфиксации — на потребление связанного азота, с ассимиляции углекислоты — на усвоение органических соединений и т. д. Но с другой стороны, специализация некоторых микроорганизмов зашла так далеко, что они сохранили способность потреблять только некоторые углеводы или аминокислоты, не затрагивая остальных. Учитывая, что каждый натуральный субстрат характеризуется своими особыми углеводами (ягоды винограда — глюкозой, молоко — лактозой, проросшие зерна ячменя — мальтозой и т. д.), Кудрявцев (1951) использовал отношение дрожжей к сахарам в качестве показателя их приспособленности к определенному местообитанию. Мишустин (1956) на основании изучения микробных ценозов почв и, в частности, наличия в этих ценозах определенных видов бактерий и плесневых грибов, делает заключение о структурных и химических особенностях почв.

Связь между экологией и пищевыми потребностями микроорганизмов. Экологическая среда обитания наложила отпечаток не только на энергетический обмен микроорганизмов, но и на их потребности в готовых аминокислотах, витаминах и других факторах роста. Наиболее прихотливы в этом отношении патогенные бактерии, а также те сапрофиты, которые обычно живут в богатых питательных средах. Таковы, например, молочнокислые бактерии — постоянные

обитатели молока и получаемых из него продуктов. Наоборот, привыкшие к более суровому образу жизни микроорганизмы, подобные азотобактеру и хемосинтезирующим автотрофам, не обнаруживают потребности в факторах роста.

Указанную закономерность легко проследить среди родственных организмов, например, в группе кишечных бактерий. Наиболее требовательны к условиям питания брюшнотифозные бактерии. Наименьшей прихотливостью обладают разновидности кишечной палочки, обитающие в почве и водоемах.

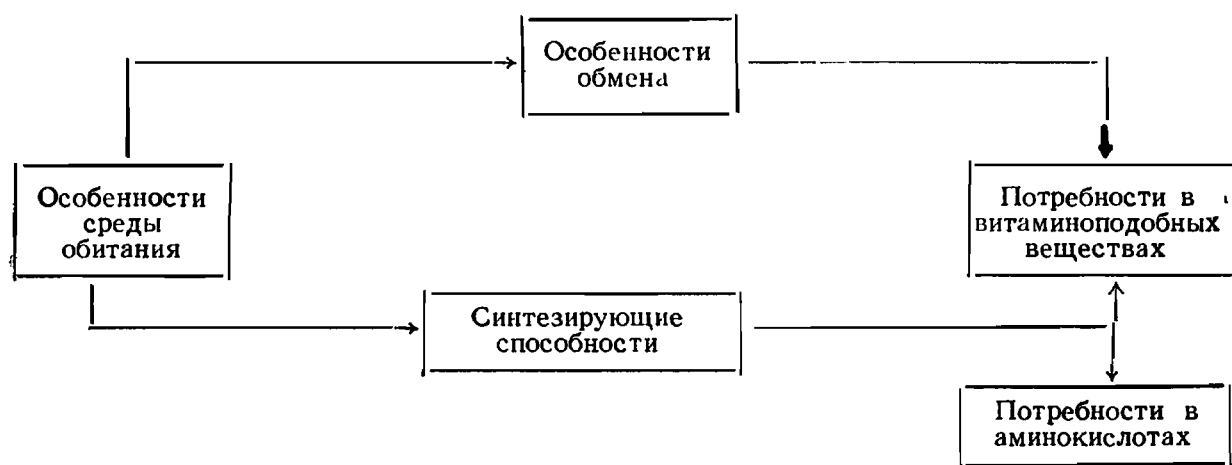
Культурные дрожжи, выращиваемые человеком на полноценных питательных средах (в частности, низовые пивоваренные дрожжи), обычно сильнее нуждаются в витаминоподобных веществах, чем их дикие сородичи. Среди грибов потребность в тиамине или его компонентах наблюдается главным образом у паразитирующих, а не у свободно живущих форм.

Связь между экологией и степенью гетеротрофности обнаруживается также в группе анаэробных клостридиев. К этой группе принадлежат опасные патогенные бактерии — возбудители газовой гангрены (*Cl. perfringens*) и др. Потребность их в факторах роста очень велика. В среды для культивирования некоторых из них приходится добавлять кусочки сырой печени и другие сложные субстраты. Бактерии типа ацетоно-бутиловых и пектинразлагающих, обитающие в прикорневой зоне растений, нуждаются в небольшом количестве аминокислот и 2—3 витаминах (в частности, в биотине и п-аминобензойной кислоте). По нашим данным, маслянокислые бактерии из метантэнков для очистки сточных вод — среды, насыщенной разлагающимися органическими отбросами, — проявляют высокую степень гетеротрофности как в отношении аминокислот, так и в отношении витаминов. Маслянокислые бактерии из перегноя удовлетворяются аммонийным азотом и не требуют готовых аминокислот, хотя последние несколько ускоряют их рост. Ауксогетеротрофия у этих бактерий сохранилась. Маслянокислые бактерии из бедных почв обладают меньшей ауксогетеротрофностью. И наконец, *Cl. pasteurianum* не только не требует аминокислот и витаминов, но и обходится без аммонийных солей, так как фиксирует атмосферный азот.

Таким образом, существует несомненный параллелизм между условиями обитания микроорганизмов и их пищевыми потребностями. Живя в среде, лишенной готовых аминокислот и витаминов, микробы начинают самостоятельно их синтезировать, тогда как в условиях постоянного избытка этих веществ: синтезирующая способность микроорганизмов постепенно утрачивается. Только этим можно объяснить, почему так сильно различаются потребности в аминокислотах у отдельных видов и разновидностей, хотя суммарный аминокислотный состав всех микробных клеток почти одинаков (см. гл. 2). Но в отношении

витаминов и родственных им веществ дело обстоит несколько сложнее.

Упомянутые вещества используются клеткой главным образом в качестве строительного материала для биосинтеза коэнзимов. Но обмен веществ у отдельных микроорганизмов сильно различается, в зависимости от того, к какой среде они приспособлены. Различается, следовательно, и их энзиматический аппарат. Поэтому отсутствие потребностей в каких-либо витаминopodobных веществах может объясняться двумя причинами: либо способностью микроорганизмов синтезировать эти вещества собственными силами, либо тем, что в их обмене не участвуют коэнзимы, в состав которых входят данные витамины. Как то, так и другое (способность к синтезу и характер обмена веществ) зависит в конечном счете от среды обитания микроорганизмов. Сказанное можно изобразить следующей схемой:



Различается, в частности, обмен веществ у организмов, приспособленных к аэробному и анаэробному образу жизни. В клетках аэробных микроорганизмов можно обнаружить полный набор железосодержащих дыхательных ферментов (цитохромов). У факультативных аэробов имеются лишь отдельные геминные ферменты (например, каталаза у молочнокислых бактерий). В клетках облигатных анаэробов такие ферменты полностью отсутствуют. Наоборот, содержание флавиновых дегидраз в клетках анаэробов значительно выше, чем у аэробов (табл. 13).

Неудивительно, что потребность в рибофлавине наблюдается только в группе молочнокислых бактерий и гемолитических стрептококков — тех организмов, в обмене которых флавиновые ферменты выполняют важную роль. Патогенные аэробы (*Bact. influenzae*, трипаносомы и др.) очень прихотливы, они нуждаются во многих аминокислотах и ростовых веществах. Несмотря на это, потребность в рибофлавине у них обнаружить не удастся. Но зато им совершенно необходим фактор X, т. е. гемин. Правда, при переходе от дыхания к анаэробному обмену

Наличие флавиновых и геминных ферментов в клетках разных микроорганизмов

Организм	Содержание рибофлавина, мкг/г	Наличие цитохромов
<i>Acetobacter pasteurianum</i>	10	+
<i>Bac. subtilis</i>	8	+
Пленчатые дрожжи	12	+
Пивные дрожжи	20—40	+
Молочнокислые бактерии (<i>Bact. delbrückii</i>)	80—110	±
Маслянокислые бактерии	90—140	—

потребности микробов могут измениться. К этому вопросу мы вернемся в следующем разделе.

С точки зрения своих пищевых потребностей микроорганизмы могут быть подразделены на несколько категорий. Необходимо прежде всего различать автотрофы, способные обходиться без органических веществ, от гетеротрофов, которым эти вещества необходимы. В свою очередь гетеротрофы распадаются на ряд групп, в зависимости от того, способны ли они восстанавливать нитратный и газообразный азот или же могут питаться только восстановленными формами азота (NH_4^+ , NH_3). Кроме того, некоторые гетеротрофы нуждаются в готовых аминокислотах или витаминах, тогда как другие обходятся без этих веществ, синтезируя их самостоятельно. И наконец, самые требовательные из гетеротрофов (их называют иногда «паратрофами») в состоянии развиваться лишь в клетках макроорганизма — хозяина.

Таблица 14

Типы питания микроорганизмов

Типы	Потребности микроорганизмов в следующих веществах					
	органические соединения	восстановленный азот (NH_4)	аминокислоты	сложные витамины	простые витамины	энзимы макроорганизма—хозяина
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	—
3	+	+	±	—	+	—
4	+	+	—	—	±	—
5	+	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—

В табл. 14 микроорганизмы разделены на шесть типов. Разумеется, такое деление носит несколько условный характер и не охватывает всех существующих случаев. К первому типу принадлежат патогенные вирусы и риккетсии, неспособные существовать вне клеток своего хозяина. В результате паразитизма они настолько физиологически деградировали, что утратили, по-видимому, некоторые важные ферментные системы. Они используют энзиматическую деятельность своего хозяина, который таким образом вынужден обслуживать своих опасных врагов в ущерб собственному благополучию.

Все остальные микробы могут развиваться на искусственных средах, иногда очень сложных по составу. На первом месте среди них (см. тип 2 в табл. 14) стоят патогенные организмы: анаэробные бациллы, вызывающие газовую гангрену и столбняк, гемолитические стрептококки, трипаносомы, плевропневмониеподобные организмы (*Mycoplasma*). Из сапрофитов к ним примыкают гомоферментативные молочнокислые палочки. Организмы этой группы нуждаются в готовых аминокислотах, причем их аминокислоты включают иногда более 10—15 аминокислот. Столь же сложны их ауксограммы. Характерно, что потребность в гемине и рибофлавине наблюдается только у данных микроорганизмов. Сложные соединения (фолиевая и пантотеновая кислоты, фактор V, тиамин) требуются им в виде целой молекулы или же в виде полного комплекса звеньев этой молекулы. При этом названные вещества обычно являются для них не простыми стимуляторами, а обязательными факторами роста. Синтетические среды для таких микробов содержат до 40 различных ингредиентов. И все же иногда чувствуется, что в среде недостает каких-то еще неизвестных факторов роста. Микоплазмам, например, нужен холестерин.

К третьей категории принадлежат многочисленные представители паразитирующей и сапрофитной микрофлоры, например, возбудители тифа и дифтерии, золотистый стафилококк, пропионовокислые и гетероферментативные молочнокислые бактерии, многие гнилостные микробы, свободно живущие анаэробные бациллы, некоторые виды уксуснокислых бактерий и бродящих дрожжей. Потребности этой группы организмов более скромны. Обычно они нуждаются в немногих аминокислотах. Часто последние только стимулируют их рост, но не являются обязательными. Вместо сложных витаминopodobных веществ эти микробы довольствуются отдельными осколками таких веществ (пиримидиновым или тиазольным компонентами тиамина, пантоиловой кислотой, β -аланином, ниацином, п-аминобензойной кислотой и др.) или же простыми термостабильными витаминами: биотином, пиридоксином, холином.

Не менее обширна группа микроорганизмов четвертого типа. В нее входят грамм-отрицательные бактерии типа кишечной

палочки, многие аэробные бациллы, пленчатые дрожжи и фитопатогенные грибы. Микроорганизмы этой группы нормально развиваются в отсутствие аминокислот. Их витаминные потребности покрываются 1—2 веществами, чаще всего — биотином или компонентами тиамин.

К пятому типу относятся обычные обитатели почвы: актиномицеты, микобактерии, грибы, грам-отрицательные бактерии типа *Pseudomonas*, азотфиксаторы и многие другие микроорганизмы. Они обходятся вовсе без аминокислот и витаминов, хотя последние и могут стимулировать их рост. В отличие от предыдущей группы, данные микроорганизмы не требуют аммонийного азота, так как обладают способностью восстанавливать нитраты, а некоторые из них могут фиксировать атмосферный азот.

Последняя группа — это автотрофные организмы, способные развиваться в отсутствие органических веществ, ассимилируя углекислоту.

Необходимо, однако, заметить, что некоторые фотосинтезирующие бактерии и водоросли нуждаются в витаминоподобных веществах. В табл. 14 это не отражено. Существуют и другие отступления от приведенной схемы. Кроме того, под влиянием условий среды тип питания микроорганизмов может изменяться. В частности, некоторые автотрофы способны переходить на питание органическими веществами, а у гетеротрофов может появиться или исчезнуть потребность в отдельных витаминах.

Адаптивно-физиологическая изменчивость

Перестройка типа обмена веществ. В природе микробам часто приходится попадать в самую неожиданную обстановку. Иногда они переживают неблагоприятные условия в виде устойчивых покоящихся форм — спор, конидий, цист. В других случаях они отвечают на изменение условий среды соответствующей перестройкой своего обмена веществ. Возможность такого рода приспособительных физиологических изменений определяется нормой реакций, унаследованной организмом от предков. К вопросу о приобретении новых наследственных потенций мы вернемся ниже.

Классическим примером обратимых физиологических перестроек является переход от аэробного к анаэробному существованию. Загадку анаэробных брожений впервые разрешил Пастер еще в прошлом столетии. Он показал, что основной причиной, заставляющей дрожжи переключаться с дыхания на спиртовое брожение, является недостаток кислорода. При широком доступе воздуха бродильный процесс подавляется. Последнее явление известно под названием «Пастеровского эффекта». Необходимо подчеркнуть, что речь при этом идет не о вторич-

Выделение углекислоты в атмосфере азота и при доступе воздуха

Организмы	Поглощенный или выделенный газ, мм ³ /час/мг сухого веса			$Q_{CO_2}^{воздух} / Q_{CO_2}^{азот}$
	в атмосфере азота, $Q_{CO_2}^{азот}$	при доступе воздуха		
		$Q_{CO_2}^{воздух}$	Q_{O_2}	
Пленчатые дрожжи	260	18	180	0,07
Хлебопекарные дрожжи	274	95	87	0,35
Пивные дрожжи	233	214	8	0,92
Пропионовокислые бактерии	20	4	15	0,20
<i>Lactobac. casei</i>	316	287	0	0,91

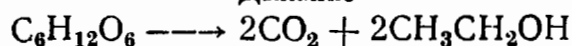
ном окислении продуктов брожения атмосферным кислородом, а о подавлении самого бродильного процесса, поскольку в аэробных условиях общее количество разложенных углеводов уменьшается. Очевидно, кислород парализует работу каких-то энзиматических систем, участвующих в анаэробном разложении сахаров, но каких именно — не совсем еще ясно (Пастер, 1937).

В табл. 15 приведены данные о подавлении некоторых брожений кислородом. Можно видеть, что особенно сильно угнетается брожение у диких пленчатых дрожжей: при доступе воздуха интенсивность его уменьшается приблизительно в 14 раз. Пивные дрожжи в значительной мере утратили способность к аэробному дыханию и поэтому на кислород реагируют очень слабо. Хлебопекарные дрожжи занимают промежуточное положение. В этом отношении к ним приближаются пропионовокислые бактерии. Что касается *Lact. casei*, то эти молочнокислые бактерии совершенно не способны переключаться на кислородное дыхание. Жизненную энергию они получают только за счет молочнокислого брожения.

Биологический смысл Пастеровского эффекта вполне понятен: как только представится возможность, организм возвращается к аэробному типу обмена, который для него более выгоден, так как при полном окислении молекулы сахара до углекислоты в процессе дыхания должно выделяться значительно больше энергии, чем при спиртовом брожении, где из шести атомов углерода только два окисляются до углекислоты.



Дыхание



Спиртовое брожение

Биоэнергетическая эффективность анаэробного распада сахара снижается еще благодаря тому, что второй продукт

брожения — спирт — образуется путем восстановления ацетальдегида, на что затрачивается некоторое количество энергии. Приблизительное представление об энергетических балансах дыхания и брожения дает разница в теплоте сгорания исходного материала и образовавшихся продуктов: в первом случае она составляет 674 ккал на грамм-молекулу сахара, во втором — только 55 ккал.

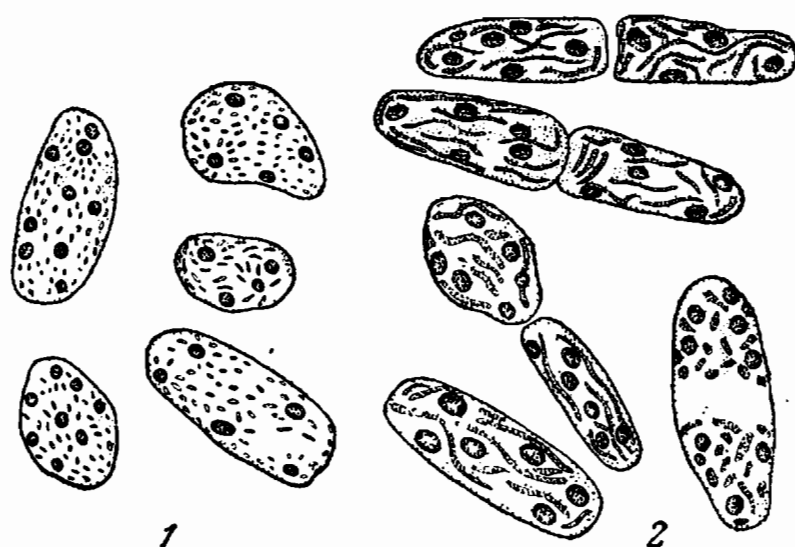
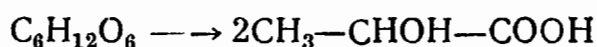


Рис. 57. Влияние тиамина на морфологию клеток *Endomyces magnusii*

1 — клетки, выросшие на синтетической среде без витамина;
2 — то же с витамином. По Мейселю, 1950

В случае молочнокислого брожения часть энергии, освободившейся при окислении двух атомов углерода в молекуле сахара до —СООН, расходуется на восстановительные реакции, ведущие к образованию метильного радикала (—СН₃) в молекулах молочной кислоты:



Молочнокислое брожение

Такая же картина наблюдается и при всех остальных анаэробных процессах типа брожения или гниения: органический субстрат окисляется не до конца и вдобавок к этому какое-то количество освободившейся энергии поглощается продуктами обмена. Вполне естественно, что при анаэробном энергетическом обмене организм вынужден перерабатывать значительно больше материалов, чем при аэробном.

Переход к анаэробному обмену сопровождается изменением ферментатического аппарата клетки и ее пищевых потребностей. В частности, гемофильные бактерии перестают нуждаться в «факторе X» (геме), так как в этих условиях цитохромная система не может функционировать. По данным некоторых авто-

ров, содержание цитохромов в клетках дрожжей при затрудненном доступе воздуха падает от 262 мкг/г сухого веса до 62 мкг/г. Наоборот, содержание тиамин и кокарбоксылазы значительно увеличивается — отчасти благодаря более быстрому синтезу тиамин самой клеткой, отчасти благодаря усиленному поглощению его из окружающей среды.

Анаэробные условия влияют не только на физиологию, но и на морфологию дрожжевой клетки. Клетки, растущие при широком доступе воздуха, бывают сильно удлинены, тогда как в глубине жидкости они приобретают округлую, эллипсоидную форму. Как показали исследования М. Н. Мейселя и Е. Н. Одиной, изменяется также тонкое строение дрожжевой клетки. В частности, хондриосомы заметно укрупняются; увеличиваются и размеры ядер. Клетка перестраивается из «дышащего типа» в «бродильный» (Мейсель, 1950).

Таким образом, переход к брожению, вызванный недостатком кислорода, влечет за собой изменение морфологии клетки и увеличение в ней содержания тиамин. Но вышеупомянутые авторы показали, что эту зависимость можно искусственно повернуть в обратном направлении. Давая дрожжевым организмам повышенные дозы тиамин, удается заставить их клетки перестроиться в бродильный тип, несмотря на доступ кислорода (рис. 57). Одновременно с этим возрастает их бродильная активность (табл. 16).

Таблица 16

Поглощение O_2 и выделение CO_2 культурой *Endomyces magnusii*, выращенной на агаре с различными дозами тиамин
(по данным М. Н. Мейселя, 1950)

Источник азота	Концентрация тиамин, мкг/мл	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Источник азота	Концентрация тиамин, мкг/мл	Q_{O_2}	Q_{CO_2}
Сульфат аммония	0	32	8	Гликокол . . .	0	28	27
»	0,01	32	8	» . . .	0,5	34	73
»	0,1	34	38	» . . .	5,0	31	72
»	0,5	42	55				

В связи с тем, что бродящим клеткам приходится разлагать повышенные количества углеводов, в них возрастает также содержание дегидраз, составной частью которых является ниацин. Наблюдается и обратная зависимость: добавление в среду ниацина усиливает спиртовое брожение у гриба фузариум, не влияя на его рост.

Второй тип перестройки обмена веществ — это переключение микробов с гнилостного распада на разложение углеводов и прочих безазотистых соединений. По-видимому, последний тип

энергетического обмена осуществляется легче первого, так как при добавлении в белковые среды углеводов микробы перестают расщеплять белки и дезаминировать аминокислоты. У паратифозных, дизентерийных и некоторых других бактерий в этом случае возрастает потребность в никотиновой кислоте.

Вообще говоря, живой организм всегда идет по линии наименьшего сопротивления и из альтернативных процессов выбирает те, которые легче осуществимы. Об одном из таких случаев говорилось в гл. 4: при наличии в среде полного комплекса аминокислот микроорганизмы предпочитают брать их в готовом виде, а не синтезировать заново из обычных источников азота и углерода. У молочнокислых бактерий на таких средах исчезает потребность в пиридоксине. В этом нет ничего удивительного, поскольку аминокислотные декарбоксилазы и переаминазы, в состав которых входит указанный витамин, становятся ненужными бактериями.

В присутствии аммонийных солей азотобактер перестает фиксировать атмосферный азот. Морфология его при этом заметно изменяется.

Еще один из примеров перестройки обмена веществ — это переход с автотрофного питания на гетеротрофное. Такое явление наблюдается, например, у пурпурных серобактерий. Фотосинтезирующие одноклеточные водоросли в отсутствие света также могут расти на готовых органических веществах.

Кроме коренных перестроек обмена веществ, влекущих за собой изменение химического состава, строения и характера развития микроорганизмов, существуют менее значительные физиолого-биохимические реакции на воздействия среды, затрагивающие лишь отдельные ферментные системы.

Адаптивные ферменты. Давно было замечено, что образование некоторых ферментов резко усиливается в присутствии того специфического субстрата, на который они действуют: на белковых средах микробы выделяют больше протеиназ; сахара вырабатывается на средах, содержащих сахарозу; мальтаза — на мальтозных средах и т. п. В 30-х годах Карстрём (Karström, 1930) предложил называть такие ферменты «адаптивными». Ферменты, которые образуются клеткой как в присутствии, так и в отсутствие соответствующего субстрата, получили название «конститутивных». К их числу относятся энзимы, необходимые для потребления глюкозы.

Если культура, выращенная на глюкозной среде, будет пересажена на среду с другим сахаром, для потребления которого необходим адаптивный фермент, то клетки не смогут размножаться, пока не начнут вырабатывать указанный фермент. На это требуется известное время. Приобретая такую способность, клетки затем продолжают бесперебойно синтезировать необходимый им фермент и разлагать соответствующий субстрат.

Влияние условий предварительного выращивания молочнокислых стрептококков на сбраживание ими галактозы и глюкозы
(по данным Rahn, 1938)

Сахар, на котором была выращена культура	Сахар, в раствор которого перенесены клетки	Образование молочной кислоты, г на 100 мл			
		часы:			
		1	2	3	4
Глюкоза	Глюкоза	0,24	0,36	0,42	0,47
»	Галактоза	0	0	0	0
Галактоза	Глюкоза	0,16	0,30	0,37	0,42
»	Галактоза	0,18	0,27	0,40	0,41

Например, после переноса с глюкозной среды на галактозную, молочнокислые бактерии в течение первых четырех часов не образуют молочной кислоты, тогда как при вторичном пересеве на галактозную среду они немедленно приступают к брожению (табл. 17).

Рис. 58 показывает, как клетки кишечной палочки постепенно обогащаются адаптивным ферментом (β -галактозидазой) после внесения в среду соответствующего субстрата (этил- β -галактозида).

Необходимо заметить, что адаптивные ферменты могут синтезироваться не только размножающимися, но и покоящимися клетками, если последние сохранили достаточную жизнеспособность.

После разложения имевшихся запасов субстрата синтез соответствующего адаптивного фермента прекращается. С помощью

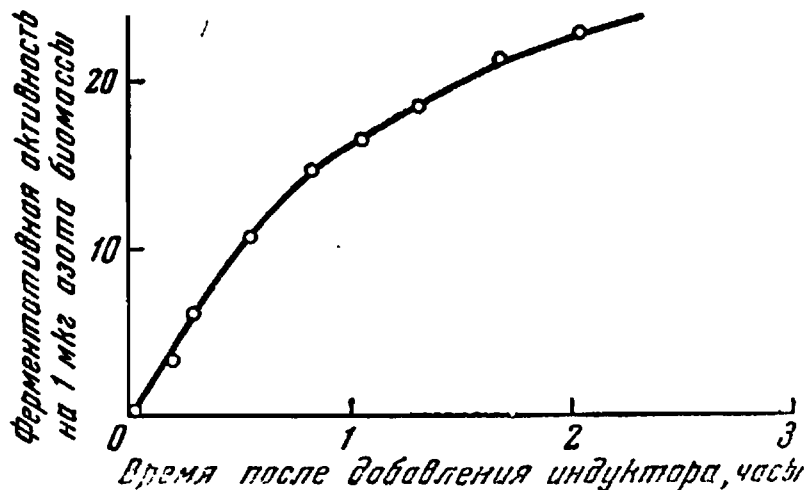


Рис. 58. Накопление β -галактозидазы в размножающихся клетках кишечной палочки после внесения индуктора (этил- β -галактозида). По Monod и Cohn, 1952

точных анализов установлено, что накопившийся ранее фермент распределяется между делящимися клетками. Благодаря этому содержание его в единице биомассы постепенно понижается, тогда как суммарное количество фермента во всей клеточной популяции остается постоянным.

В исследованиях по адаптивным ферментам наибольшее внимание уделялось β -галактозидазе (лактазе) — ферменту, гидролизующему лактозу на глюкозу и галактозу. Было установлено, что у некоторых рас кишечной палочки β -галактозидаза образуется в отсутствие лактозы, как конститутивный фермент, у других она является типичным адаптивным ферментом, третьи же вовсе не способны ее вырабатывать. При этом выяснилось следующее любопытное обстоятельство. Оказалось, что некоторые родственные лактозе вещества (мелибиоза, метил- α -D-галактозид и др.) хотя и вызывают биосинтез β -галактозидазы, но не гидролизуются ею. Наоборот, о-нитрофенил- α -L-арабинозид и некоторые другие соединения разлагаются данным ферментом, но не влияют на его образование клеткой. Таким образом, понятия «субстрат» и «индуктор» (возбудитель биосинтеза фермента) не всегда между собой совпадают. В связи с этим вместо образования адаптивных ферментов иногда предпочитают говорить об индуцированном синтезе ферментов.

Подобная же картина наблюдается и в отношении других адаптивных ферментов, например пенициллиназы (фермента, разлагающего пенициллин).

Адаптивные энзимы, как правило, вырабатываются только в тех случаях, когда соответствующий субстрат является единственным источником углеродного или азотного питания. Наличие в среде других легко усвояемых веществ задерживает биосинтез адаптивных энзимов. Примером могут служить наши опыты, в которых ацетоно-бутиловые бактерии выращивались на белково-глюкозной среде с добавлением или без добавления белкового гидролизата (табл. 18).

Таблица 18

Протеолитическая активность ацетоно-бутиловых бактерий в присутствии и в отсутствие белкового гидролизата

Источник азота	Расщеплено белка, % к исходному		Анализы на 28 часу		
	20 час.	28 час.	численность клеток, $10^9/мл$	выделено газа, г/л	кислотность, $mл$ 0,1 н NaOH в 10 $mл$ среды
0,4% альбумина	52	83	3,1	4,1	3,0
0,4% альбумина + 1% белкового гидролизата	8	40	10,7	10,0	5,6

Можно видеть, что при добавке в среду белкового гидролизата протеолиз альбумина ослабевает. Несмотря на это, брожение и рост культуры усиливаются. Очевидно, из двух имеющихся в среде источников азота бактерии предпочитают использовать гидролизат, как более легко усвояемый.

Подобная же картина наблюдается на средах с двумя различными углеводами. Микробы сначала разлагают углевод, который для них более доступен. Только после того, как он будет полностью потреблен, начинают вырабатываться ферменты, необходимые для разложения второго углевода. В связи с этим

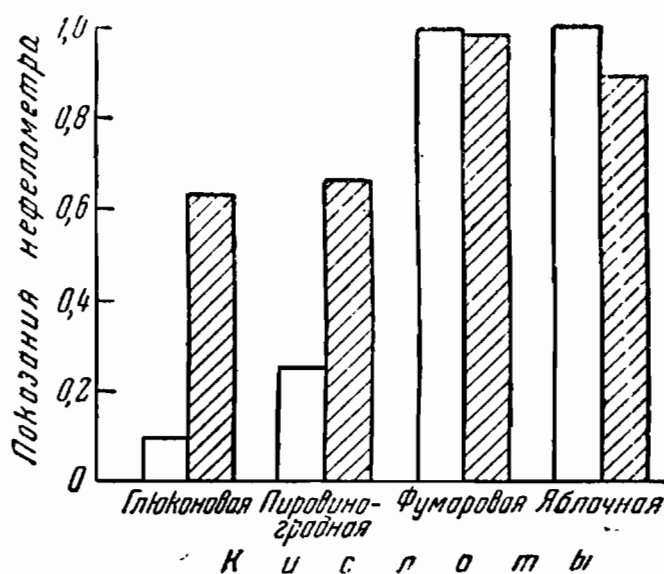


Рис. 59. Влияние биотина (1 мкг/л) и разных органических кислот (0,03 моля) на рост культуры *B. idosus*

Светлые колонки — синтетическая минеральная среда с 5 г/л глюкозы без биотина; затрихованные колонки — то же с биотином, к среде добавлена та или иная кислота. По Иерусалимскому, Гришанковой и Шевченко, 1962

замедлившийся рост культуры снова ускоряется. К явлению вторичного роста («диауксии») мы вернемся в следующей главе.

В заключение необходимо указать, что между адаптивными и конститутивными ферментами нет резкой границы. Небольшие количества первых обнаруживаются и в отсутствие субстрата. И обратно, конститутивные ферменты не безразличны к субстрату: в присутствии последнего они синтезируются в больших количествах, чем при его отсутствии.

На образование энзимов оказывает влияние не только субстрат, но и ряд других внешних факторов, в частности, витамины. Если микроорганизмы не способны самостоятельно синтезировать какой-либо витамин, то без его наличия в среде не смогут синтезировать и те коферменты, в состав которых он входит. На этом основан способ изучения физиологической роли витаминов. Одни клетки выращиваются при избытке, другие — при остром недостатке необходимого им витамина. Сопоставляя энзиматическую деятельность тех и других клеток, можно получить представление о биохимических функциях, для осуществления которых необходим исследуемый витамин (точнее говоря, образующийся из него коэнзим). Таким путем, например, А. Львов впервые выяснил физиологическую роль факторов X и V в обмене трипаносом и гемофильных бактерий (Lwoff et Lwoff, 1937a; 1937b).

В других случаях недостающий витамин заменяют предпола-

гаемыми продуктами нарушенной энзиматической реакции. В частности, некоторые бактерии, нуждающиеся в *p*-аминобензойной кислоте, могут развиваться в отсутствие последней, если в среде имеется фолиевая кислота, в состав которой она входит. При этом наблюдается прямое соответствие между концентрацией в среде *p*-аминобензойной кислоты и содержанием в клетках фолиевой кислоты. В свою очередь, фолиевая кислота может быть частично заменена метионином или тиминном. Это служит подтверждением того, что фолиевые коферменты участвуют в синтезе названных веществ.

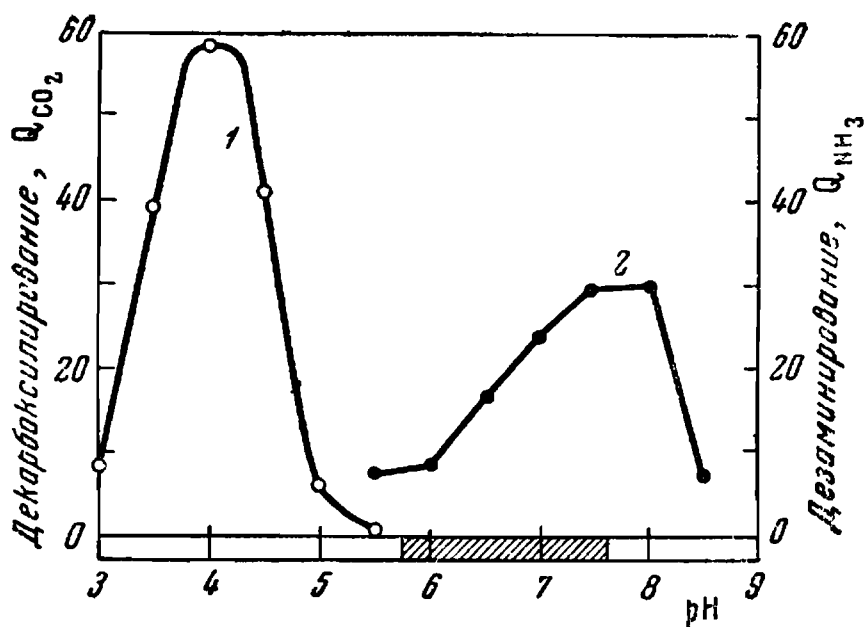


Рис 60 Влияние pH среды на активность декарбоксилазы и дезаминазы глутаминовой кислоты у кишечной палочки
1 — декарбоксилаза, 2 — дезаминаза. Оптимальная зона pH заштрихована. По Gale, 1940

По нашим наблюдениям, *B. idosus* перестает нуждаться в биотине, когда в среде есть фумаровая или яблочная кислоты (рис. 59). Сказанное вполне понятно, поскольку биотинсодержащие энзимы катализируют синтез щавелевоуксусной кислоты, а это вещество легко образуется из упомянутых дикарбоновых кислот.

По данным некоторых авторов, содержание тирозин-декарбоксилазы в культуре молочнокислых бактерий возрастает в 20—50 раз при избытке пиридоксина, который, как известно, служит материалом для построения аминокислотных декарбоксилаз.

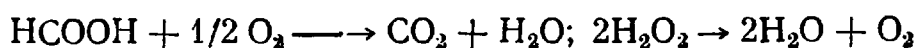
На образование ферментов оказывает влияние и ряд других условий среды, например: некоторые минеральные соли, окислительно-восстановительный потенциал, pH. Реакция среды пред-

ставляет собой весьма сильно действующий фактор и поэтому на вопросе о ней следует остановиться подробнее.

Реакция среды (рН). Многие микроорганизмы обладают способностью регулировать рН окружающей среды, перестраивая соответствующим образом свой обмен веществ. По данным Е. Гэйла (Gale, 1943), такой приспособительный характер имеет деятельность аминокислотных декарбоксилаз и дезаминаз у кишечной палочки. В более кислой среде усиливается работа декарбоксилаз, в результате чего накапливаются щелочные амины. Наоборот, при щелочных условиях среды повышается активность дезаминаз, ведущая к образованию органических кислот (рис. 60).

В клетках, выращенных при рН 5—6, декарбоксилазы содержатся в значительно большем количестве, чем дезаминазы; в клетках, выращенных при рН 7—8, наблюдается обратное. Таким образом, реакция среды может повлиять не только на активность ферментов, но и на самый их синтез.

Случается, что при рН, неблагоприятном для деятельности данного энзима, клетка образует его в повышенных количествах, компенсируя тем самым его пониженную активность. В результате такой компенсации фактическая деятельность энзима при всех значениях рН остается одинаковой. По данным Гэйла (Gale, 1943), так обстоит дело с дегидрогеназой муравьиной кислоты, каталазой, уреазой и некоторыми другими ферментами, основное назначение которых сводится к обезвреживанию соответствующих продуктов обмена веществ (муравьиной кислоты, перекиси водорода и т. д.):



Действие дегидрогеназы муравьиной
кислоты

Действие каталазы

Способностью смещать рН среды в благоприятную сторону наделены также бродильные организмы, образующие из углеводов наряду с карбоновыми кислотами еще и нейтральные соединения: этиловый и бутиловый спирты, ацетон, ацетоин, 2,3-бутенгликоль и др. Соотношение этих продуктов может меняться. При рН выше 6,3—6,5 в среде накапливаются главным образом кислоты, вследствие чего рН понижается. Наоборот, по мере подкисления среды баланс брожения сдвигается в сторону нейтральных продуктов, причем это сопровождается потреблением накопившихся в среде кислот. На рис. 61 показано, как влияет рН среды на образование ацетоно-бутиловыми бактериями ацетона и кислот (уксусной и масляной).

Нечто подобное наблюдается у *Aerobacter aerogenes* (табл. 19).

Как показывает табл. 19, при более высоких значениях рН соотношение продуктов сдвигается в сторону кислот. Особенно

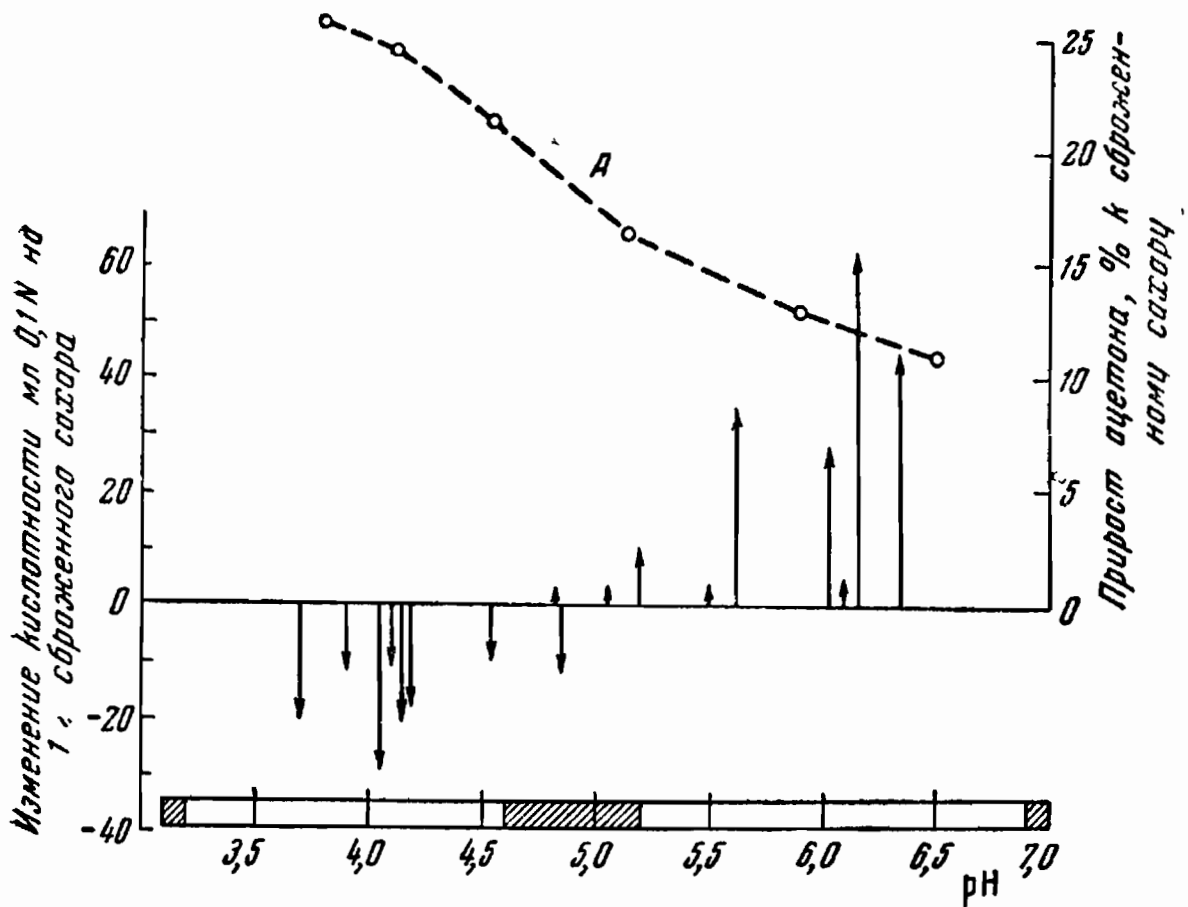


Рис. 61. Влияние рН среды на интенсивность образования ацетона и на потребление и накопление кислот в культуре ацетоно-бутиловых бактерий

A — ацетон; стрелки — изменение кислотности. Оптимальная зона рН заштрихована. По Иерусалимскому, 1942

резко падает выход ацетона и 2,3-бутиленгликоля. При этом сумма последних продуктов и летучих кислот остается приблизительно постоянной, что говорит об общности происхождения всех этих веществ.

Таблица 19

Влияние рН на баланс брожения *Aerobacter aerogenes*
(по данным Н. В. Орловой, 1950)

рН		Соотношение продуктов, в экв. %					
начальный	конечный	нейтральные			кислые		
		этиловый спирт	ацетон + бутилен- гликоль	сумма	уксусная и муравьи- ная кисло- ты	молочная кислота	сумма
6,0	5,2	33	36	69	18	13	31
8,5	6,8	26	4	30	51	19	70

Влияние реакции среды на соотношение бродильных продуктов обнаруживается также у ацетоно-этиловых, гетероферментативно-молочнокислых и других бактерий.

Нарушения обмена веществ под влиянием ядов

Понятие ядов. Под ядами в широком смысле слова подразумеваются все те химические соединения, которые нарушают нормальную жизнедеятельность клетки, вступая в реакцию с ее веществами или же подавляя в ней определенные звенья обмена веществ. Яды крайне разнообразны как по своему химическому

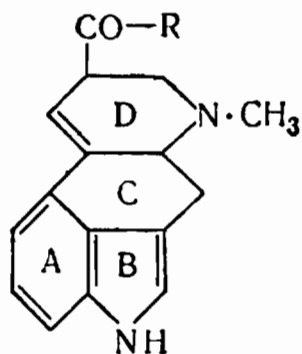


Рис. 62 Строение эргоалкалоидов. Все они состоят из лизергиновой кислоты, к которой присоединен тот или иной радикал (R)

составу, так и по характеру действия на живой организм. К их числу относятся токсины патогенных бактерий — возбудителей столбняка, ботулизма, дифтерии, газовой гангрены и других заболеваний. Бактериальные токсины — это вещества белковой природы. Белками являются и токсины ядовитых животных — змей, скорпионов, пауков. Белковые токсины обычно наделены ферментными свойствами. Их сильное отравляющее действие связано с тем, что они разрушают в организме определенные коэнзимы, отщепляя, например, от них фосфаты.

Алкалоиды — азотсодержащие ядовитые вещества растительного происхождения. Они обладают щелочными свойствами, так как содержат в своей молекуле гетероциклические основания или аминные группы. Алкалоиды широко распространены в растительном царстве и известны человеку с незапамятных времен. Не случайно, что народные названия «зелье» и «отрава» имеют общие корни со словами «зелень» и «трава». В литературе описано более 1000 алкалоидов. Некоторые из них образуются грибами. Таковы, например, алкалоиды спорыньи (эргоалкалоиды), продуцентом которых является гриб из рода *Claviceps*, паразитирующий на злаках (рис. 62). В настоящее время он выращивается в виде чистых культур с целью промышленного получения упомянутых алкалоидов. В малых дозах алкалоиды используются как лекарственные вещества. Механизм их фармакологического действия не всегда ясен. Он сводится к подавлению или усилению тех или иных биохимических процессов в организме.

Вещества, которые применяются для уничтожения микробов, вызывающих заболевания или повреждающих древесину и другие материалы, носят название «антисептиков». Существует много сотен антисептиков, чрезвычайно разнообразных по своему

химическому составу. Среди них есть и минеральные вещества, и органические соединения. Некоторые из них изготавливаются путем химического синтеза, другие получаются из продуктов переработки угля или нефти и имеют не вполне определенный состав. Сила действия антисептиков характеризуется так называемым «фенольным коэффициентом», т. е. тем, во сколько раз они активнее по сравнению с фенолом (карболовой кислотой). Путем присоединения к фенолу различных боковых радикалов, удается повысить его антисептическую активность в 150—200 раз. Так же поступают при синтезе других антисептиков. Взяв за основу какой-либо простейший антисептик (хлор, окись мышьяка, сулему и пр.) синтезируют его производные; некоторые из них по силе действия во много раз превосходят исходное вещество.

Механизм действия разных антисептиков не одинаков. Чаще всего он сводится к повреждению каких-либо составных частей клетки. Так, например, формалин, фенол и ртуть образуют прочные комплексы с белками протоплазмы. Окислители, к числу которых относятся производные хлора, перекись водорода и перманганат, инактивируют важные компоненты протоплазмы путем окисления. Спирт, эфир, ацетон и другие плазмолитики разрушают липоидную оболочку клетки.

Своим широким действием на разнообразные вещества, входящие в состав клетки, антисептики отличаются от ферментных ядов и антиметаболитов, специфически подавляющих отдельные звенья обмена веществ. На этих направленно действующих веществах в дальнейшем мы остановимся более подробно.

Необходимо подчеркнуть, что ядовитость является довольно относительным понятием. Знаменитый врач средневековья Парацельз говорил, что не существует ни ядов, ни лекарств; только доза делает яды лекарствами. Действительно, в очень низких концентрациях ядовитые вещества обычно стимулируют жизнедеятельность организма. Так называемые «бактериостатические концентрации» приостанавливают рост микробов, не вызывая, однако, их немедленной гибели. В более высоких количествах те же вещества проявляют бактерицидное действие, быстро убивая микроорганизмы.

Не следует также думать, что все яды представляют собой случайные, совершенно чуждые для организма вещества. Уже то обстоятельство, что многие из них подавляют определенные звенья обмена веществ, говорит об их химическом сродстве к нормальным компонентам клетки. И действительно, помимо попадающих извне отравляющих веществ, в клетке всегда имеются и свои собственные депрессоры обменных процессов. Они предназначены для подавления тех биохимических реакций, которые в данный момент не нужны. Попеременно вводя в действие то эти депрессоры, то стимуляторы и биокатализаторы, клетка

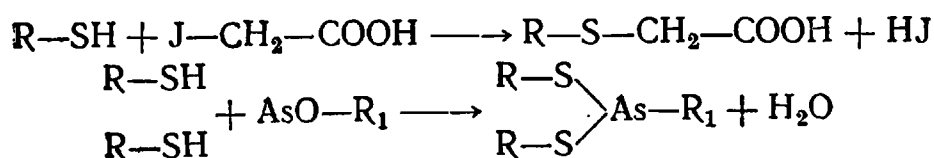
регулирует ход биохимических превращений. В качестве депрессоров энзиматических реакций могут выступать сами продукты реакций. Известно, что накопление внутри клетки избыточного количества неиспользованных продуктов тормозит деятельность соответствующих ферментов. Указанное явление называют «обратной связью», позаимствовав этот термин из электротехники. Обратная связь обеспечивает автоматическое регулирование интенсивности энзиматических реакций.

Изучение действия ядов на клетку является одним из важнейших способов исследования биохимизма обмена веществ. Наряду с этим ядовитые вещества имеют огромное практическое значение в качестве средства борьбы с патогенными микробами, насекомыми и другими вредными организмами.

Ферментные яды (ингибиторы). Относящиеся сюда вещества специфически подавляют определенные биохимические реакции. Они вступают в химическое соединение с теми или иными ферментами, коэнзимами и кофакторами, тем самым выводя их из строя. Ферментные ингибиторы применяются при энзиматических исследованиях. Некоторые из них носят название «дыхательных ядов», поскольку они подавляют деятельность окислительных ферментов, участвующих в аэробном дыхании. Угарный газ (СО) и цианиды (например, KCN) образуют нерастворимые комплексы с железом, входящим в состав цитохромоксидазы и других геминных ферментов, и тем самым инактивируют их. Разница только в том, что угарный газ соединяется с закисной формой железа (Fe^{++}), а цианиды — с окисной (Fe^{+++}). Люди, отравившиеся угарным газом или цианистым калием, быстро погибают от удушья. Но микроорганизмы в большинстве случаев сравнительно безболезненно выносят действие этих ядов, так как переключаются с дыхания на анаэробный тип энергетического обмена.

К числу дыхательных ядов принадлежит также азид натрия (NaN_3) и сероводород (H_2S). Необходимо, впрочем, заметить, что все эти яды реагируют не только с железом, но и с медью, цинком и другими тяжелыми металлами, входящими в состав коэнзимов. Поэтому по современным представлениям действие их является менее целенаправленным, чем это казалось раньше.

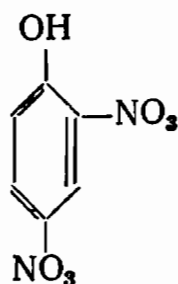
Другие яды признавались за специфические ингибиторы анаэробных брожений. К их числу относятся, в частности, моноiod-уксусная кислота и мышьяковистые соединения. Более внимательные исследования показали, что они связывают сульфгидрильные группы ферментов и коэнзимов:



Поэтому упомянутые вещества подавляют не только работу альдегид-дегидраз, участвующих в брожениях, но и ряд других энзиматических процессов, в которых играет роль группа — SH.

Спиртовое брожение, осуществляемое бесклеточным дрожжевым препаратом, под влиянием фтористого натрия прерывается и в среде накапливаются фосфоглицериновая и глицеринфосфорная кислоты. Объясняется это тем, что ионы магния, служащего кофактором энолазы пировиноградной кислоты, выводятся из реакции в виде фтористо-фосфорного комплекса: $MgFPO_4$.

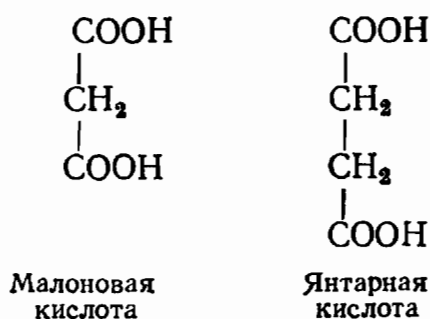
Нередко при энзиматических исследованиях применяется 2,4-динитрофенол, блокирующий аэробное фосфорилирование:



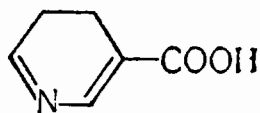
Существует много других ферментных ингибиторов. Общим для всех является то, что они связывают те или иные атомы и радикалы, необходимые для осуществления определенных энзиматических процессов, и таким образом подавляют последние.

Антиметаболиты. Второй тип взаимодействия между ядовитыми веществами и компонентами клетки основан на сходстве их химического строения и носит конкурентный характер. Вещества, участвующие в нормальных биохимических превращениях, известны под общим названием «метаболитов». Сюда входят как биокатализаторы типа коэнзимов, так и химические соединения, на которые действуют эти биокатализаторы. Конкурирующие с метаболитами вещества, соответственно, получили название «антиметаболитов». Вторгаясь в определенные биохимические реакции, антиметаболиты вытесняют сходные с ними метаболиты и становятся на место последних. Это и служит причиной нарушения нормального хода реакций.

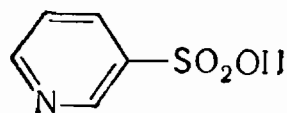
Отдельные случаи конкурентного взаимодействия были описаны в 20—30-х годах. Было, например, установлено, что малоновая кислота тормозит энзиматическое дегидрирование янтарной кислоты, аналогом которой она является:



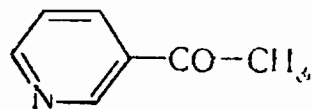
Позднее удалось заметить, что два близких производных никотиновой кислоты — пиридин-3-сульфоновая кислота и 3-метил-



Никотиновая
кислота
(витамин PP)



Пиридин-3-
сульфоновая
кислота



3-метилпиридин

пиридин не только не заменяют этот витамин, но и оказывают токсическое влияние на подопытных животных. Их вредное влияние можно устранить, добавляя в корм достаточное количество никотиновой кислоты.

Законченная теория взаимодействия антиметаболитов и метаболитов была сформулирована только около 20 лет тому назад в связи с изучением новых противомикробных препаратов.

Лечебные препараты, токсичные для микробов, но сравнительно безвредные для человека, называются «химиотерапевтическими». К ним относятся некоторые растительные алкалоиды, применяемые для борьбы с заразными заболеваниями. Так, например, индейцы Южной Америки издавна употребляли кору и листья хинного дерева в качестве противомаларийного средства. В дальнейшем алкалоид хинного дерева был получен в чистом виде под названием хинина. Наряду с натуральными алкалоидами, в настоящее время имеется много химиотерапевтических препаратов, синтезированных искусственно.

Основателем химиотерапии по справедливости следует считать Пауля Эрлиха (Ehrlich, 1909). В начале нашего столетия он начал систематические исследования в этой области, продолжавшиеся много лет. Им было взято лечебное вещество, содержащее мышьяк, которое подавляло развитие патогенных трипаносом и других простейших, но было не безвредным и для самого человека. Под руководством Эрлиха химики приготовили огромное количество производных этого вещества. В конце концов были получены препараты сальварсана, порядковые номера которых (606 и 914) позволяют судить о том, как много было синтезировано соединений, оказавшихся при проверке негодными для лечебных целей, либо из-за недостаточной эффективности, либо вследствие их токсичности для животных и человека.

Эрлих образно сравнивал химиотерапевтические средства с волшебной пулей, метко попадающей в назначенную цель — микробную клетку, не задевая человека. Впоследствии оказалось, что эта «волшебная пуля» бьет еще точнее, чем думал Эрлих. Она нарушает в микробной клетке определенные звенья обмена веществ, выводя из строя соответствующие метаболиты. Вопрос

этот впервые стал ясным при исследовании сульфамидных препаратов.

Родоначальник всех сульфамидов — белый стрептоцид, синтезированный в 30-х годах, быстро завоевал признание в качестве эффективного лекарственного вещества при крупозном воспалении легких и других воспалительных процессах, вызываемых кокками.

Позднее Вудс (Woods, 1940) обнаружил в дрожжевых экстрактах какое-то вещество, защищавшее микробную клетку от сульфамидов, которое при ближайшем рассмотрении оказалось п-аминобензойной кислотой (ПАБК). ПАБК служит фактором роста для некоторых микроорганизмов и входит в состав фолиевой кислоты (гл. 4). Сходство строения ПАБК и стрептоцида невольно бросается в глаза.



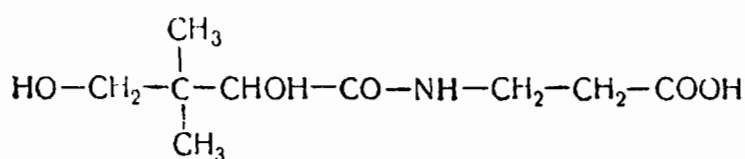
Это сходство послужило толчком к созданию теории конкурентного взаимодействия метаболитов и антиметаболитов (Вулли, 1954). Антиметаболиты достаточно близки по своему строению к метаболитам, чтобы вытеснить их из биохимической реакции. Однако выполнять функции последних они неспособны. Существует общеизвестное выражение, что фермент подходит к своему субстрату, как ключ к замку. В этом плане антиметаболиты можно сравнить с плохо подобранным ключом, который входит в замочную скважину, но не может отпереть замок.

Антиметаболиты вытесняют соответствующие метаболиты своей массой. Количество их должно в десятки и сотни раз превосходить количество метаболитов, с которыми они конкурируют. Добавив в среду повышенную дозу метаболита, можно обезвредить антиметаболит.

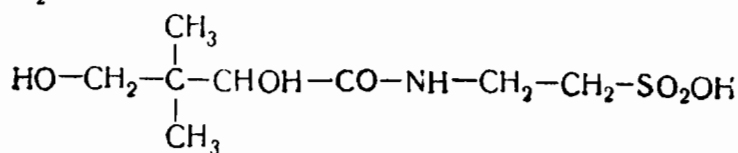
В ближайшие годы по примеру Эрлиха начали синтезировать производные стрептоцида, присоединяя к его сульфамидной группе различные радикалы ($\text{—SO}_2\text{—NH—R}$). Так было получено более 12 000 производных. Некоторые из них, оказавшиеся значительно активнее стрептоцида, прочно вошли в лечебную практику. В качестве примера можно упомянуть о сульфидине, норсульфазоле, сульфозине, сульфодимезине, этазоле, фталазоле, сульгине.

Наряду с сульфамидными препаратами, антагонистом ПАБК является п-аминосалициловая кислота, применяемая в качестве противотуберкулезного средства.

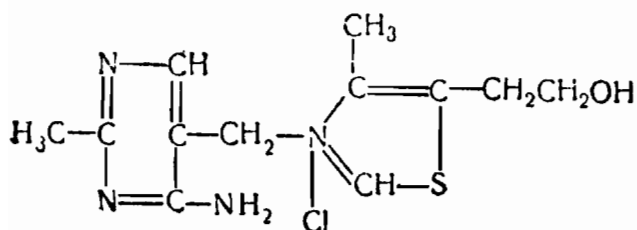
Успехи в работе с сульфидами окрылили исследователей. Казалось, в руки им попал способ планомерного получения новых химиотерапевтических средств; достаточно остановить свой выбор на каком-нибудь факторе роста микробов и приготовить его антиметаболит. Действительно, было доказано, что пиридин-3-сульфоновая кислота (формула которой приведена выше) является конкурентом никотиновой кислоты и подавляет рост бактерий, нуждающихся в последней. Вскоре были синтезированы антиметаболиты пантотеновой кислоты, тиамина, пиридоксина, аденина и других ростовых веществ. Формулы некоторых из этих препаратов приведены ниже.



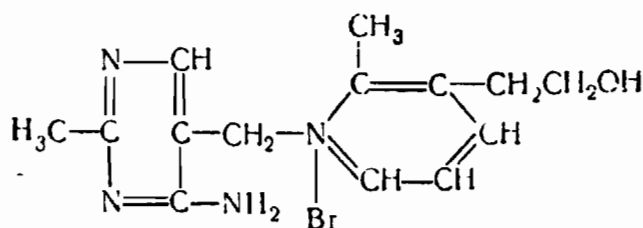
Пантогеновая кислота



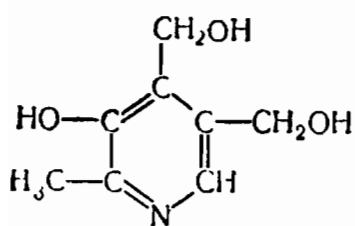
Пантоил-таурин



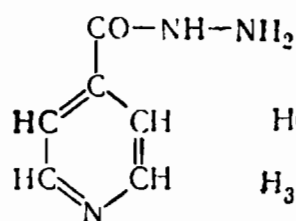
Тиамин



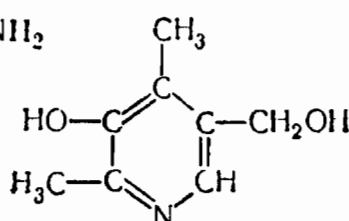
Пиритиамин



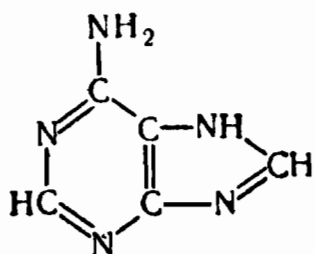
Пиридоксин



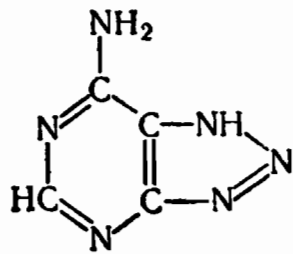
Изониазид



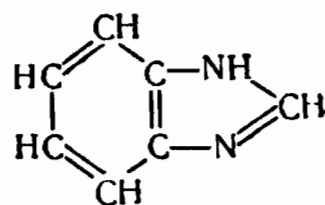
Дезоксипиридоксин



Аденин



Аминотриазол-
пиримидин



Бензимидазол

Антагонисты рибофлавина были созданы путем замены углеродом одного из атомов азота в изоаллоксазиновом кольце, а также замещением двух боковых метильных радикалов атомами хлора. Высокоактивным антагонистом фолиевой кислоты оказался аминоптерин (4-аминоптероилглутаминовая кислота). Один из антиметаболитов биотина содержит в своей молекуле вместо —S— цепочку —CH—CH—; в другом атом серы окислен до сульфоновой группы $>SO_2$. Приготовлены были также аналоги аминокислот и многие другие антиметаболиты, тормозящие рост микроорганизмов.

Следует заметить, что в большинстве случаев они подавляют рост только тех микробов, которые не способны синтезировать данный метаболит и получают его в готовом виде из окружающей среды. Лишь немногие антиметаболиты, в том числе сульфамиды, действуют на все микроорганизмы.

Первоначальные надежды на возможность целенаправленного получения новых химиотерапевтических средств не оправдались. Помимо сульфамидов, других практически ценных препаратов найти не удалось. Некоторые антиметаболиты оказались вредными для самого человека, другие легко разлагаются в организме, третьи слишком быстро выводятся наружу. Но антиметаболиты представляют большой интерес для физиологических и биохимических исследований.

В частности, путем применения авитаминов можно вызвать соответствующие авитаминозы у подопытных животных, не прибегая к строго синтетической диете. Исследуя нарушения обмена веществ, вызванные антиметаболитами, можно понять физиологическую роль соответствующих метаболитов. Было, в частности, обнаружено, что вредное действие сульфамидов снимается не только ПАБК, но и веществами, далекими от них по своему химическому строению: пуринами, пиримидинами, метионином. Это обстоятельство подсказывало, что названные вещества представляют собой конечные продукты той цепи реакций, в начале которой стоит ПАБК. Получая эти продукты в готовом виде, микробная клетка может обойтись без ПАБК, выведенной из строя сульфамидами.

В то время, как некоторые аналоги метаболитов являются их антагонистами, другие могут заменять микробам натуральный метаболит. Такая замена возможна лишь при том условии, что микроорганизм способен перестроить данный аналог в нормальный метаболит. Не все микроорганизмы к этому способны. Поэтому нередко наблюдается, что какое-либо химическое соединение для одного микроба является заменителем метаболита, а для другого — угнетающим веществом. Так действует, например, дестибиотин (биотин, лишенный атома серы).

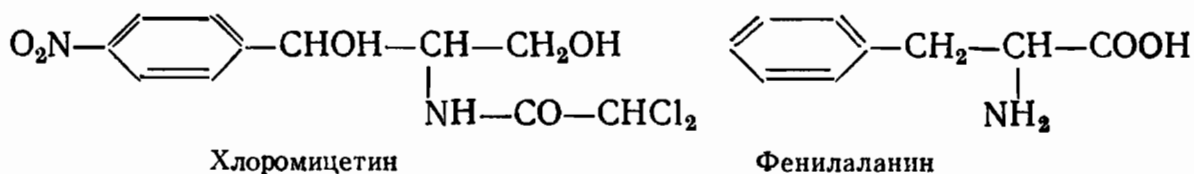
Необходимо заметить, что при несбалансированном составе среды даже нормальные питательные вещества могут вести себя

подобно антиметаболитам. В частности, при этих условиях некоторые аминокислоты начинают угнетать развитие микроорганизмов. Их токсическое действие можно снять, добавив в среду небольшое количество другой аминокислоты, близкой по своему строению к первой. Такого рода конкурентные взаимоотношения существуют между серином и треонином, лизином и аргинином, а также между аланином, с одной стороны, и глицином, серином или треонином, с другой стороны.

Таким образом, граница между метаболитами и антиметаболитами является несколько условной.

Антибиотики. К синтетическим препаратам и растительным алкалоидам, применяемым в химиотерапии, близки по своим свойствам антибиотики, образуемые рядом микроорганизмов. Некоторые из них представляют собой типичные антиметаболиты. Например, йодинин, образуемый *Chromobacterium iodinum*, близок по своей структуре к витамину К. Бактериостатическое действие йодинина на гемолитические стрептококки можно устранить с помощью витамина К.

Хлоромицетин, образуемый актиномицетом *Streptomyces venezuelae*, представляет собой аналог фенилаланина. Их конкурентное взаимодействие подтверждено опытами с кишечной палочкой и другими бактериями.



Стрептомицин подавляет деятельность биотинсодержащих ферментов, которые катализируют присоединение углекислоты к карбоновым кислотам. В его молекуле имеются две гуанидиновые группы:

$$\begin{array}{c} \text{NH} \\ | \\ -\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$$

В молекуле биотина присутствует остаток мочевины: $-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-$. И гуанидин, и мочевиновая часть биотина легко присоединяют к себе углекислоту. Поэтому не исключено, что стрептомицин является антиметаболитом биотина, конкурируя с ним за углекислоту. Впрочем, конкурентное взаимодействие этих двух веществ экспериментально еще не доказано.

Пенициллин задерживает биосинтез белков, в частности, включение в их молекулу глутаминовой кислоты. Таким образом, этот антибиотик подобно всем остальным нарушает определенные звенья обмена веществ.

Некоторые антигрибные антибиотики подавляют деятельность дыхательных ферментов. Механизм действия других антибиотических веществ недостаточно еще выяснен. Но по современным представлениям, все они оказывают специфическое

влияние на жизнедеятельность микробной клетки, выступая в роли конкурентов метаболитов или же угнетая определенные биохимические процессы иным способом, не имеющим конкурентного характера.

То же самое можно предположить по поводу других химиотерапевтических препаратов, механизм действия которых на микробную клетку остался еще невыясненным.

Наследственная изменчивость

Основная тема настоящей книги — это физиология питания микроорганизмов. Поэтому мы не можем слишком далеко вдаваться в столь важную и интересную область, как проблема изменчивости микробов, являющуюся достоянием генетики (Адаптация у микроорганизмов, 1956; Вагнер, Митчелл, 1958; *Microbial Genetics*, 1960). Вопрос о причинах и условиях изменения наследственности дебатруется в течение нескольких десятков лет. В 1901 г. Г. Де-Фриз ввел понятие «мутации». Под этим названием он подразумевал изменения наследственных свойств, происходящие крайне редко, и притом в силу каких-то внутренних законов, без всяких внешних влияний. Большим шагом вперед явилось открытие Г. А. Надсона и Г. С. Филиппова (1925), которые установили, что радиоактивные излучения могут внезапно изменить наследственные свойства дрожжей. Надсон назвал эти внезапные изменения «сальтациями», что по сути дела равнозначно мутациям. В дальнейшем в его лаборатории было показано, что наследственные изменения происходят и под влиянием других сильнодействующих факторов, в частности, химических веществ. В 1927 г. Х. Мёллер (см. Вагнер и Митчелл, 1958) получил такие же экспериментальные мутации у плодовых мушек — этого излюбленного объекта генетических исследований.

Первоначально предполагалось, что мутагенные факторы лишь ускоряют процесс спонтанного мутирования, который в более медленном темпе протекает и без их влияния (Надсон, 1935). Надо заметить, что спонтанные мутации очень редки. По подсчетам генетиков-микробиологов, некоторые из них случаются в среднем по 1 разу на каждые 10^4 — 10^{10} клеточных поколений. Однако в 50-х годах стало накапливаться все больше данных, говорящих в пользу того, что мутагенные факторы не только ускоряют изменение наследственных свойств, но и служат их побудительной причиной. Некоторые типы мутаций не удается обнаружить в естественной обстановке — они возникают только под влиянием сильных воздействий. Оказалось также, что природа мутагенных факторов далеко не безразлична для организмов. Если, например, облучать микробные клетки ультрафиолетовыми лучами с разной длиной волны, то каждому диапазону волн будет соответствовать особый комплекс мутаций.

Наряду с ультрафиолетовыми лучами, в качестве мутагенных факторов часто применяются различные ионизирующие излучения: рентгеновы и γ -лучи, а также частицы, образующиеся при распаде атомов: нейтроны, α и β -частицы. Ионизирующие излучения производят в субстрате химические изменения, вызывая появление весьма активных свободных радикалов и перекисей. Все эти активные вещества непосредственно действуют на клеточные компоненты. Изменения, которые они производят в компонентах клетки и в первую очередь — в ДНК, служат причиной изменения ее наследственных свойств.

Радиационные воздействия удастся заменить некоторыми химическими реагентами, названными в связи с этим «радиомиметическими». В качестве химических мутагенных факторов чаще всего применялся иприт (горчичный газ), известный с первой мировой войны как одно из сильнейших отравляющих веществ, а также его азотные аналоги. Кроме иприта употребляются многие другие химические соединения, например: эпоксиды и диэпоксиды, различные перекиси, формальдегид, этиленмин, аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, антибиотики и даже минеральные соли — железные, марганцевые, алюминиевые и пр.

Таким образом, трудно говорить о существовании каких-то особых агентов, ответственных за мутационные изменения. Результат зависит от их дозировки и продолжительности действия. В очень низких дозах они могут не оказать никакого влияния на клетку или даже стимулировать ее жизнедеятельность. В очень больших количествах они вызовут немедленную гибель клетки. При каких-то промежуточных дозах физические и химические воздействия выступают в роли мутагенных факторов. Нечто подобное наблюдается при применении ядовитых соединений (см. предыдущий раздел): в зависимости от концентрации, они ведут себя то как биостимуляторы, то как отравляющие вещества.

Данные, полученные в работах с мутагенными факторами, постепенно стали склонять генетиков к той точке зрения, что даже спонтанные мутации, возникающие без видимых причин, на самом деле вызываются какими-либо внешними воздействиями, не поддающимися учету. Причиной таких спонтанных мутаций могут быть космические лучи, перепады температур и прочие случайные воздействия, которым подвергаются отдельные клетки в микробной популяции.

Таким образом, старое представление о мутациях, как стихийно протекающих изменениях наследственности, начинает себя изживать. Становится ясным, что структурно-функциональные изменения, лежащие в основе мутаций, являются результатом прямого действия внешних факторов на химические компоненты клетки, и прежде всего — на ее нуклеиновые кислоты

Природа действующих факторов накладывает свой отпечаток на характер происшедших изменений.

Необходимо вместе с тем иметь в виду, что мутагенные факторы производят в клетке весьма разносторонние повреждения, исход которых зависит от ее индивидуальных особенностей, а также от ряда привходящих обстоятельств, учесть которые невозможно. Поэтому отдельные клетки по-разному реагируют на облучения и прочие сильные воздействия: значительная часть их погибает, у других происходят те или иные наследственные изменения, третьи оправляются после перенесенных повреждений и восстанавливают свои прежние свойства. Мутационная изменчивость носит в значительной степени случайный характер.

Более слабые воздействия не производят насильственной ломки структурно-функционального аппарата клетки. Клетка встречает их «в боевой готовности». В ответ на неблагоприятные воздействия в ней происходят физиологические изменения, направленные на обезвреживание этих воздействий. Такого рода физиологические реакции имеют много общего с приспособительной изменчивостью, рассматривавшейся во втором разделе настоящей главы. Они происходят в рамках наследственной нормы реакций, присущей микроорганизму.

В некоторых случаях клетка защищается против ядовитых веществ путем усиленного синтеза ферментов, разлагающих эти вещества. Например, устойчивость некоторых бактерий к пенициллину обусловлена образованием пенициллиназы.

В других случаях микробы начинают синтезировать повышенные количества метаболитов, конкурирующих с данным ядовитым веществом. Так, под влиянием сульфамидных препаратов бактерии вместе с повышением устойчивости образуют значительно больше ПАБК — антагониста этих препаратов (рис. 63 и 64).

Часто случается, что при подавлении каких-либо биохимических процессов ядовитыми соединениями, в клетке усиливаются иные, заменяющие их процессы, доставляющие ей энергию или строительные материалы; обмен веществ направляется тогда по обходному пути. Например, блокировка дыхательных ферментов цианидом приводит к тому, что у дрожжей повышается бродильная активность.

Защитные реакции против вредных химических веществ могут также выражаться в понижении проницаемости клеточной оболочки. Такие защитные реакции имеют сложный характер и происходят значительно медленнее и с большим трудом, чем упомянутые выше. С трудом приспособляются микробы и к повышенным температурам.

Создать неблагоприятные для жизни условия можно не только при помощи ядовитых веществ, но и путем изъятия из среды тех или иных питательных ингредиентов. При отсутствии хорошо

усвояемых источников углерода клетка потребляет трудно доступные вещества, образуя соответствующие адаптивные ферменты. При недостатке в среде готовых аминокислот или витаминов клетка начинает их самостоятельно синтезировать (если, конечно, она не лишена способности к таким синтезам).

Рассмотренные выше адаптивно-физиологические изменения имеют специфический, целенаправленный характер. Они происходят не у единичных клеток, а захватывают основную массу особей в микробной популяции. В этом состоят их отличия от мутаций. Кроме того, они протекают в границах наследственной нормы реакций, чем также отличаются от мутаций, которые связаны с изменением наследственных свойств.

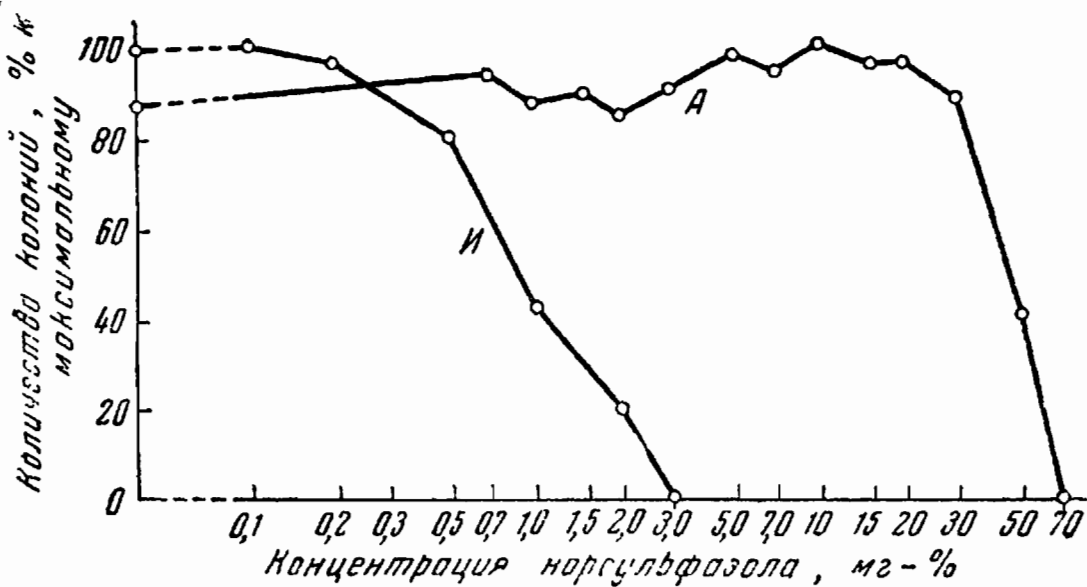


Рис 63 Отношение *Bac megaterium* к норсульфазолу

И — исходная раса, А — раса, адаптированная к норсульфазолу

По Иерусалимскому и Шафоростовой, 1962

Есть, однако, основания полагать, что приспособительные реакции со временем могут принять наследственный характер (Иерусалимский, 1959а). Чем дольше подвергаются клетки неблагоприятным воздействиям, тем более усиливаются и закрепляются у них соответствующие изменения. В конце концов происшедшие в клетке физиологические изменения начинают сохраняться даже в отсутствие вызвавших их факторов среды (рис. 64).

В качестве второго примера можно сослаться на опыты Кона и Хариса (Kohn, Harris, 1942), в которых кишечная палочка длительно выращивалась в присутствии бактериостатических доз сульфамидных препаратов, причем в среду добавлялся метионин — продукт биохимических реакций, подавленных сульфамидом. Это давало возможность клеткам развиваться в присутствии указанного антиметаболита. По прошествии достаточного срока клетки переносились на нормальную среду без сульфа-

мидных препаратов. Оказалось, что они потеряли способность развиваться в этих условиях. Для их развития теперь необходимо было добавлять в среду готовый метионин, в котором они раньше не нуждались. Очевидно, длительное подавление биохимических реакций, ведущих к синтезу метионина, привело к их необратимой утрате (своего рода «атрофии»).

Можно было бы привести и ряд других примеров, показывающих возможность перерастания адаптивно-физиологических изменений в стойкие наследственные свойства. Особенно много данных по этому вопросу получено лабораторией С. Хиншельвуда — горячего сторонника теории физиологических адаптаций, которым он отдает явное предпочтение перед спонтанными ненаправленными мутациями (Адаптация у микроорганизмов, 1956).

Необходимо заметить, что при обычном способе адаптации микробных культур (путем систематического пассирования их через среды с возрастающими концентрациями ядовитых веществ) трудно бывает с достоверностью решить, от чего зависят происшедшие изменения: объясняются ли они прямой адаптивной изменчивостью большинства клеток или же отбором и накоплением единичных устойчивых мутантов, имевшихся в популяции. Предложен ряд методов для разграничения этих двух типов изменчивости. Не углубляясь дальше в данную область, заметим только, что оба типа изменчивости не исключают один другого. В одних случаях может преобладать отбор случайных мутантов, в других случаях — приспособительно-физиологическая изменчивость, в третьих случаях возможно сочетание того и другого.

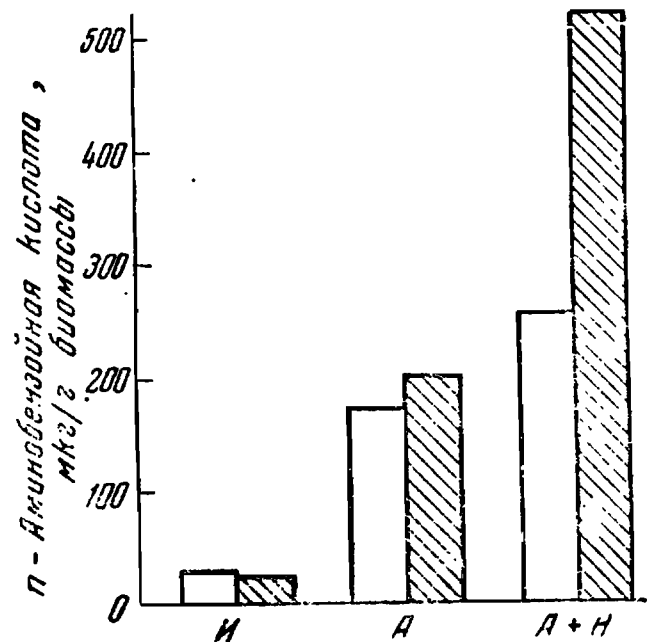


Рис. 64. Биосинтез ПАБК двумя расами *Bac. megaterium*

И — исходная и А — адаптированная к норсульфазолу расы. Светлые колонки — содержание ПАБК внутри клеток, заштрихованные — выделение ПАБК в среду; Н — в среду внесено 15 мг% норсульфазола. По Иерусалимскому и Шафоростовой, 1962

РОСТ И РАЗВИТИЕ

Общие понятия

Связь между питанием, ростом и развитием. В основе жизни лежит непрерывный обмен веществ, который складывается из поглощения питательных веществ, их переработки внутри организма и выделения наружу продуктов обмена. Положительным итогом питания является синтез составных частей организма и увеличение его биомассы, т. е. рост.

Синтез отдельных компонентов живого тела протекает неравномерно. Количество одних из них увеличивается быстро, других — медленно, третьи вообще не накапливаются, четвертые даже разрушаются и количество их убывает (в последнем случае можно говорить об «отрицательном росте»). Вследствие неравномерного роста частей живого тела, их соотношение смещается; химический состав, строение и ферментный аппарат организма с течением времени меняются. Другими словами, происходят все те морфологические и физиологические изменения, которые объединяются понятием развитие.

Одним из результатов развития является размножение, т. е. воспроизведение организмом новых особей при помощи половых клеток или вегетативным способом (путем деления, почкования, образования бесполок спор и др.).

Так связаны между собой основные жизненные явления. Связь эта изменчива и непостоянна. Размножение может происходить в отсутствие роста, как это бывает, например, при сегментации или фрагментации мицелия актиномицетов на глубинные споры. Наблюдается и обратная картина, когда неблагоприятные условия среды останавливают размножение клеток, не прекращая их роста, в результате чего клетки разрастаются в гигантские формы. У некоторых низших организмов (актиномицетов, мукоровых грибов) рост без размножения представляет собой нормальное явление: из посеянной в среду споры вырастает разветвленный многоядерный мицелий, не расчлененный на клетки. Пока

он не начал отмирать или распадаться на споры, внутреннее строение и биохимические свойства растущих гиф остаются постоянными. Следовательно, в этом случае отсутствует не только размножение, но и развитие. Наблюдается простой рост мицелия за счет удлинения гиф и увеличения их биомассы.

Правда, внутри гиф происходят изменения, связанные с делением ядер. Но эти циклически повторяющиеся изменения не отражаются на общем состоянии мицелия. Нечто подобное наблюдается в вегетативных клетках бактерий, размножающихся при постоянных условиях среды. В клетке протекает ряд струк-

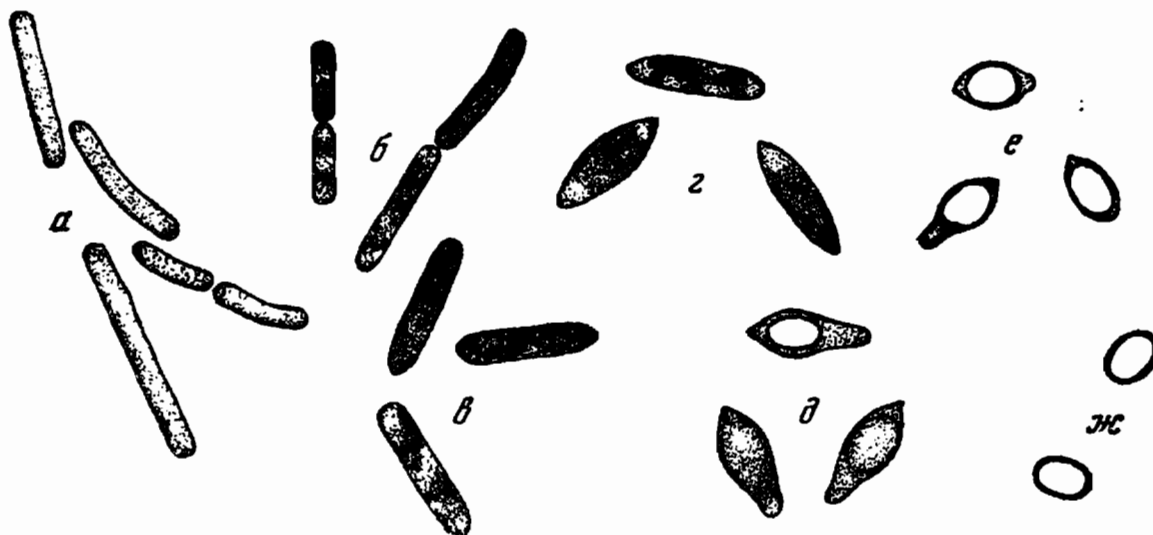


Рис. 65. Ход спорообразования у маслянокислых бактерий

а — делящиеся вегетативные клетки; *б* — отложение в клетках гранулёзы; *в* — постепенное утолщение клеток; *г* — клостридиальные формы; *д* — появление проспор; *е* — оформление спор; *ж* — свободные зрелые споры

турно-биохимических изменений, связанных с циклом ее деления. Но отделив от себя дочернюю клетку, материнская клетка каждый раз возвращается в прежнее физиологическое состояние. Благодаря этому бактерии не продвигаются по пути своего онтогенетического развития.

Иная картина наблюдается при превращении вегетативных клеток в покоящиеся споры или половые клетки. В этом случае имеет место типичное онтогенетическое развитие. Проследим за ходом спорообразования у каких-либо бактерий, например маслянокислых (рис. 65). Сначала в вегетативной клетке накапливается большое количество гранулёзы, окрашиваемой йодом в темно-синий цвет. Затем с одного конца клетки начинает дифференцироваться спорогенное зерно — зачаток будущей споры. Клетка утолщается и принимает веретеновидную (клостридиальную) форму. Спора постепенно все более оформляется, а цитоплазма лизируется и уменьшается в объеме, пока, наконец, не останется одна только спора.

Рассмотренный пример подтверждает то, что в основе развития лежит неравномерный рост составных частей клетки (в том числе и «отрицательный рост», выражающийся в распаде веществ цитоплазмы). При этом размеры клетки почти не возрастают, а на заключительном этапе спорообразования (при превращении клостридия в свободную спору) биомасса ее даже уменьшается. Следовательно, развитие может протекать и в отсутствие видимого роста. То же самое происходит при образовании аскоспор внутри дрожжевой клетки.

Разумеется, бывает и так, что процессы роста, развития и размножения протекают одновременно.

Сказанное выше о взаимосвязи роста и развития клетки в основных чертах относится и к многоклеточным организмам, а равно и к микробным культурам. Рост таких многоклеточных образований также складывается из роста и размножения их составных элементов, в данном случае, клеток. При этом часть клеток может отмирать. Иногда процессы отмирания и нарастания клеток уравниваются так, что суммарная биомасса культуры будет держаться на постоянном уровне. В этом случае придется констатировать, что культура в целом прекратила свой рост, хотя отдельные клетки в ней продолжают расти и размножаться.

Не менее сложное явление представляет собой и процесс развития всякого рода многоклеточных коллективов. Он обуславливается как изменением морфо-физиологических свойств отдельных клеток, так и сдвигом соотношения между разными типами клеток. Последнее особенно наглядно проявляется у многоклеточных организмов, состоящих из специализированных тканей и органов. Даже низшие многоклеточные организмы (например, грибы) образуют наряду с вегетативным мицелием особые органы плодоношения.

Процесс развития культур одноклеточных существ сводится к превращению их вегетативных клеток в покоящиеся формы. Однако при обычном способе культивирования судьба отдельных клеток не совпадает. Одни из них быстро заканчивают процесс спорообразования, у других он затягивается, третьи погибают и лизируются раньше, чем успеют превратиться в споры. В связи с этим за ходом развития культуры можно следить по изменениям соотношения различных форм жизненного цикла (рис. 66). Можно прийти к выводу, что рост и развитие отдельных клеток является иным понятием, чем развитие целой клеточной популяции.

Значение чистых культур. Наблюдения за ростом и развитием микробных культур имеют не меньшее значение, чем наблюдения за развитием отдельных одноклеточных особей. Более того, на практике редко приходится иметь дело с одиночными клетками, так как для этого необходима специальная иссле-

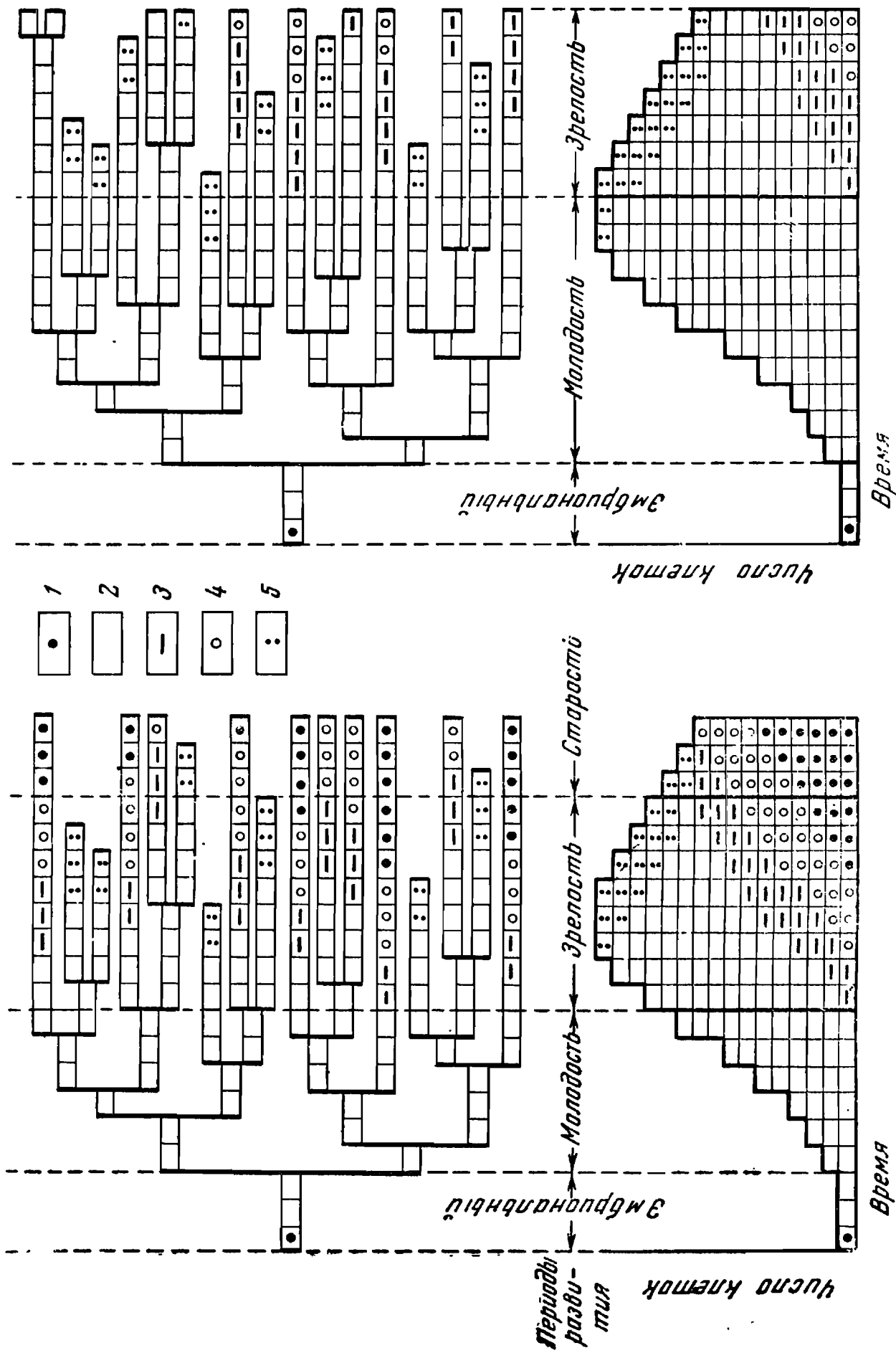


Рис. 66. Схема роста и развития бактериальной культуры

1 — споры; 2 — вегетативные клетки; 3 — клетки с отложением гранулёзы; 4 — споры; 5 — отмирающие клетки по Иерусалимскому, 1959б

довательская методика, иногда довольно сложная. Поэтому обычно пользуются культурами, состоящими из огромного числа особей. Путем исследования жизнедеятельности таких популяций выясняют морфологические, культуральные и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов, разрабатывают оптимальные технологические режимы. Многие из современных микробиологических производств не могли бы нормально работать без чистых культур.

Чистые культуры иногда встречают к себе недоверчивое отношение. Некоторые авторы считают их артефактом и полагают, что свойства микроорганизмов, обнаруженные в условиях чистых культур, не соответствуют тому, что имеет место в природе, где микроорганизмы живут в условиях постоянного взаимодействия с другими живыми существами, при ином режиме питания.

Действительно, еще Виноградский (1952) не раз подчеркивал, что при неразборчивом употреблении таких стандартных сред, как МПБ и МПА, трудно составить правильное представление о физиологических особенностях микроорганизмов. Хорошо известно, что около 95—98% представителей почвенной микрофлоры вообще не может развиваться на подобных средах. Еще хуже обстоит дело с микроскопическими обитателями океанов и морей. Лишь единичные представители их растут на сложных органических субстратах. Очевидно, все эти микроорганизмы приспособились в природе к иным условиям питания.

Однако отсюда вовсе не следует, что физиологические потребности микроорганизмов недоступны для изучения. Выяснив экспериментальным путем эти потребности, можно приготовить среды, отвечающие естественным условиям существования микроорганизмов. В ряде случаев эту задачу удавалось успешно разрешить. Так, Виноградский предложил немало специальных элективных сред для различных хемосинтезирующих бактерий. Поскольку некоторые из этих бактерий не потребляют, а иногда и боятся органических веществ, плотные среды для них готовятся на кремневом геле вместо агара или желатины. Существование микробиологической науки было бы невозможно, если бы исследователи не умели выделять в виде чистых культур микроорганизмы даже со столь необычным обменом веществ, как нитрифицирующие, водородокисляющие или тионовые бактерии.

Возражением против метода чистых культур часто выдвигают то, что в природе микробы живут в условиях тесного взаимодействия с другими организмами — высшими или низшими. Это возражение правильно лишь отчасти. Действительно, создать *in vitro* нормальные условия развития для облигатных паразитов и симбионтов довольно трудно, но свободно живущие

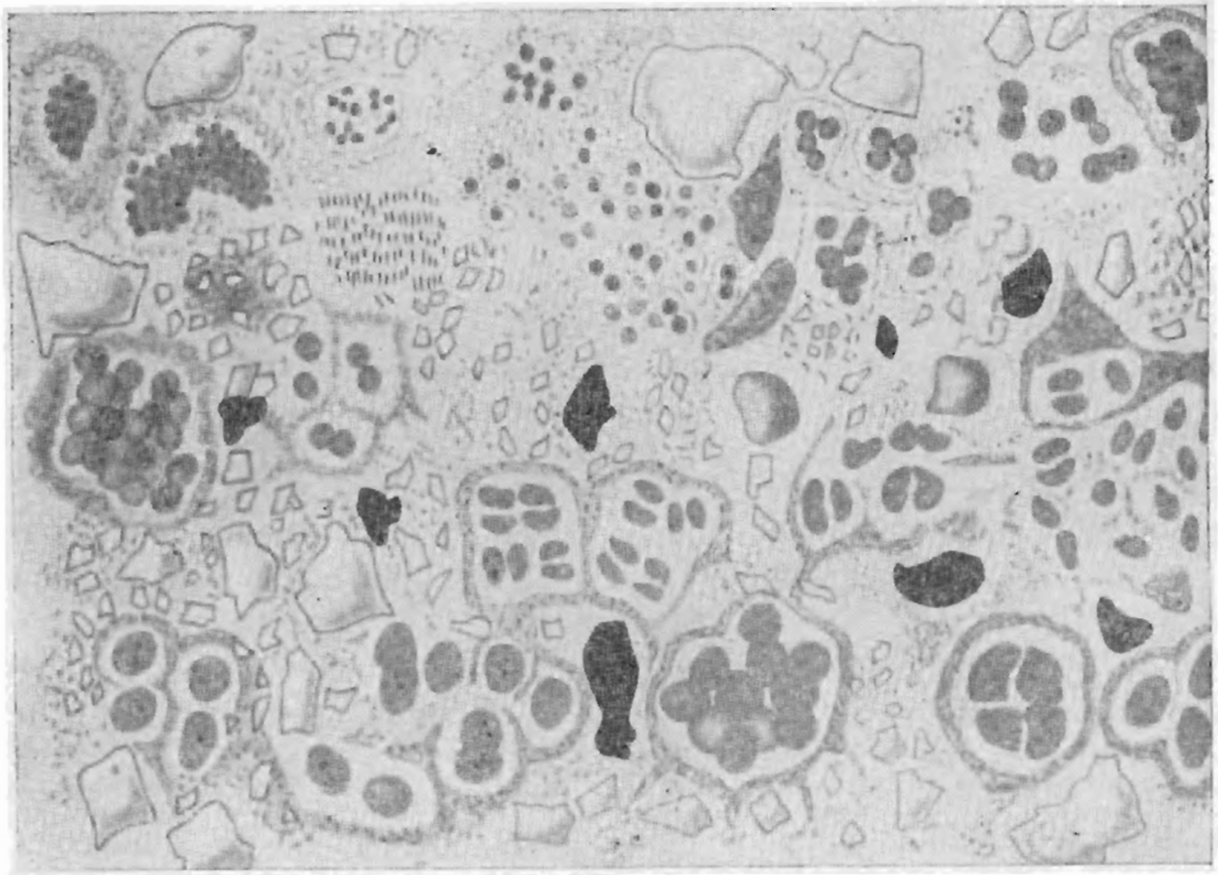


Рис. 67. Препарат почвы, окрашенный эритрозином. Видны изолированные скопления микробных клеток. По Виноградскому, 1952

микробы могут образовывать некоторое подобие чистых культур и в природной обстановке.

Возникновению естественных чистых культур способствует то обстоятельство, что микроорганизмы обычно ведут прикрепленный образ жизни на поверхности твердых тел. Адсорбция бактерий почвенными частицами была установлена около 30 лет назад Н. Н. Худяковым и другими исследователями. В водоемах микробы также обнаруживаются главным образом на поверхности минеральных и органических частиц. Исключение представляют некоторые подвижные бактерии, свободно плавающие в воде подобно планктонным организмам.

Необходимо также иметь в виду необычайно быстрое размножение микробных клеток, в результате которого они образуют мельчайшие колонии там, где прикрепятся. При прямом микроскопировании почвы (рис. 67) и при просмотре стекол обрастания, помещенных по методу Холодного в почву или водоем, нетрудно заметить такого рода естественные микроколонины, состоящие из однородных клеток.

Известно, что клетки бактерий и грибов могут питаться только растворенными веществами. По мере потребления этих веществ, их концентрация возле клетки понижается, причем на смену им из окружающей среды диффундируют новые порции.

Но диффузия — более медленный процесс, чем поглощение веществ клеткою. Поэтому концентрация питательных веществ вокруг самой клетки всегда остается пониженной. Обратная картина наблюдается в отношении продуктов жизнедеятельности микробов. Их содержание в непосредственной близости к клетке бывает выше, чем в более отдаленных точках, где эти продукты потребляются другими организмами. Поэтому вокруг микроскопических скоплений клеток в природных условиях создаются застойные микрозоны, содержащие пониженные количества питательных веществ и повышенную концентрацию продуктов обмена.

О существовании застойных микрозон можно косвенно судить по тому, что микробы более устойчивы к продуктам своего обмена, чем посторонние организмы. Например, кислотообразующие микроорганизмы характеризуются ацидофильностью, а дрожжи выдерживают повышенные концентрации спирта. Видимо, микроорганизмы привыкли подвергаться воздействию продуктов собственной жизнедеятельности и стали поэтому малочувствительными к ним. В особенности это касается таких сильнодействующих веществ, как антибиотики. Для распознавания внешне схожих форм актиномицетов Н. А. Красильников (1958) предложил проверять их отношение к определенным антибиотическим веществам, учитывая, что антибиотики сравнительно безвредны для самих продуцентов.

Микрозоны, окружающие скопления клеток в почве и других природных средах, играют для микробов защитную роль, удерживая их противников на почтительном расстоянии. Благодаря этому в одном и том же комочке почвы удастся найти резкие антагонисты, которые при совместном культивировании на лабораторных средах быстро подавляют друг друга. Между тем в почве они могут длительно сосуществовать, будучи разобщены защитными микрозонами.

Недостатком лабораторных сред является то, что в них быстро истощается запас питательных веществ и накапливается много вредных продуктов обмена, останавливающих размножение микробов. В связи с этим развитие лабораторных культур имеет периодический характер. Такая периодичность, по мнению ряда авторов, противоречит образу жизни микроорганизмов в природной обстановке. Предполагается, что там они находятся в условиях постоянного размножения.

Нельзя, конечно, отрицать, что в почве и других естественных средах обитания не может накапливаться большого количества продуктов обмена, так как они потребляются другими микроорганизмами. Однако цикличность развития наблюдается и в природных условиях. Как было уже давно отмечено Виноградским, Коном и другими видными почвенными микробиологами, состав почвы крайне неоднороден. Она представляет

собой своеобразную мозаику из различных органических и минеральных веществ. Далеко не всегда почвенные микробы располагают необходимой пищей. Часто они находятся в покое, как бы ожидая того момента, когда рядом с ними появятся запасы питательных веществ. Источником питания могут служить растительные остатки, отбросы и трупы животных, а также вещества, выделенные какими-то другими микроорганизмами. После их появления в почве наступает бурная вспышка размножения и микроорганизмы образуют колонии.

Но рано или поздно запасы питания истощаются. Новые пополнения поступают к микроколонии с большим трудом отчасти потому, что перехватываются по дороге какими-то другими организмами, отчасти из-за крайней медленности диффузионного перемещения веществ по такой гетерогенной среде, как почва, состоящая из минеральных и органических частиц, разделенных жидкими и газовыми прослойками. Микробы снова попадают в условия голодания. Колонии их распадаются, клетки вымирают или превращаются в покоящиеся формы с замедленным обменом веществ. В таком виде они остаются в ожидании лучших дней.

Из всего сказанного вытекает, что некоторые особенности чистых лабораторных культур свойственны микробам и в естественных условиях. Большинство свободно живущих микроорганизмов обитает в природе в виде микроскопических скоплений родственных клеток, причем развитие их носит циклический характер. Уже тот факт, что микроорганизмы могут образовывать те или иные покоящиеся формы, свидетельствует об их приспособленности к периодическому наступлению условий, непригодных для дальнейшего роста и размножения.

Измерение роста клеток и клеточных популяций

Измерение роста отдельных клеток в микрокамере под контролем микроскопа производят с помощью специального окуляр-микрометра. Периодически измеряя длину и поперечник клетки, вычисляют затем ее объем и таким образом определяют скорость роста. Иногда для этих целей применяют кино съемку или фотографирование через определенные интервалы времени. Полученные изображения клеток увеличивают и измеряют с помощью линейки. (рис. 68 и 69).

Измерение роста отдельных клеток представляет собой довольно кропотливую задачу. Кроме того, при этом остается неизвестным, как изменяется химический состав клетки в течение цикла ее развития — от одного деления до другого. В связи с этим в настоящее время стали применять метод синхронизации, позволяющий преодолеть указанные затруднения.

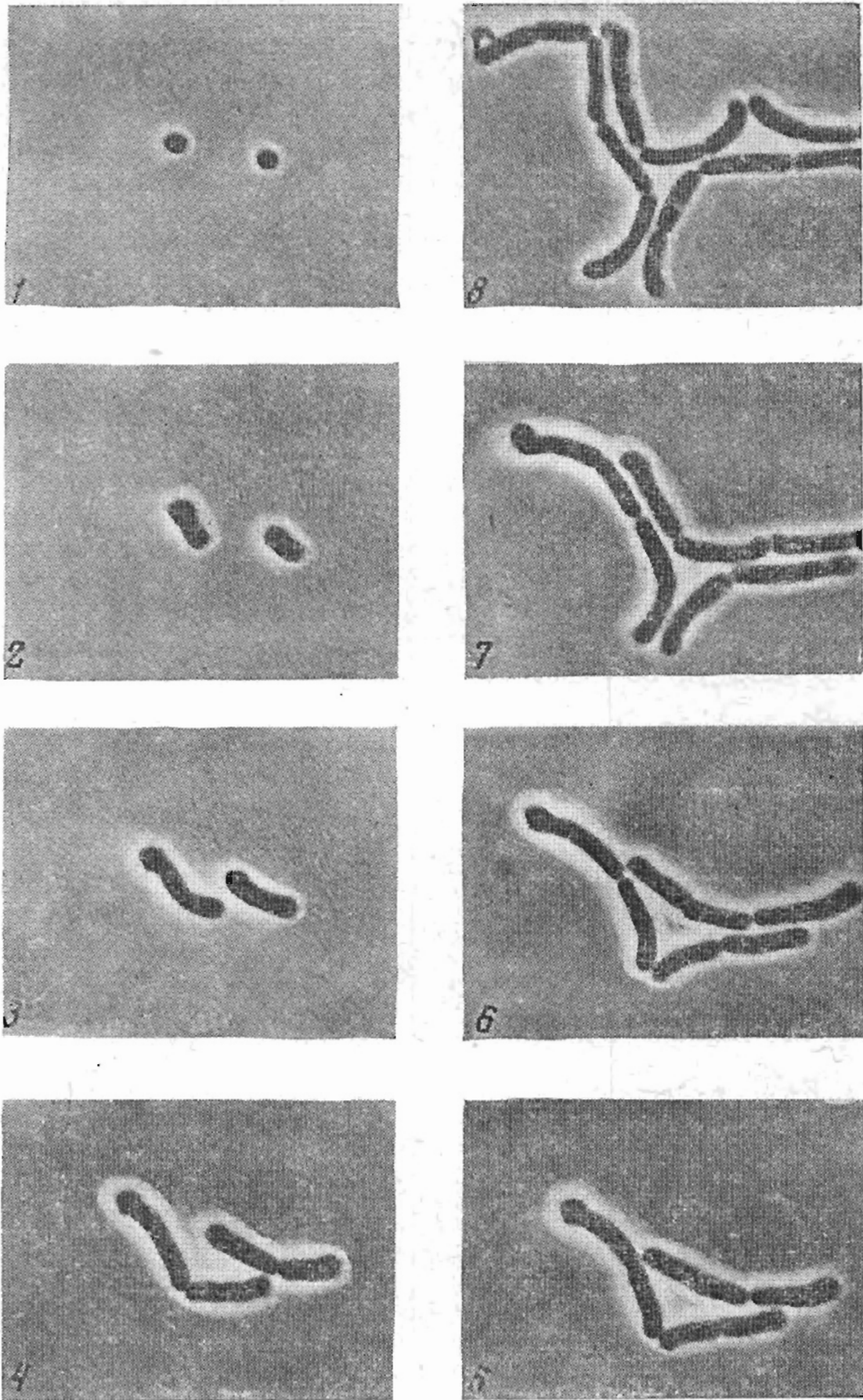


Рис. 68. Рост клеток *Bac. megaterium*. Отдельные кадры из микрокинофильма Е. А. Рукиной и В. М. Новгородцева

1 — две споры; 2 — они же через 126 мин. (прорастание); 3 — через 163 мин.; 4 — через 194 мин.; 5 — через 212 мин.; 6 — через 225 мин.; 7 — через 244 мин.; 8 — через 274 мин.

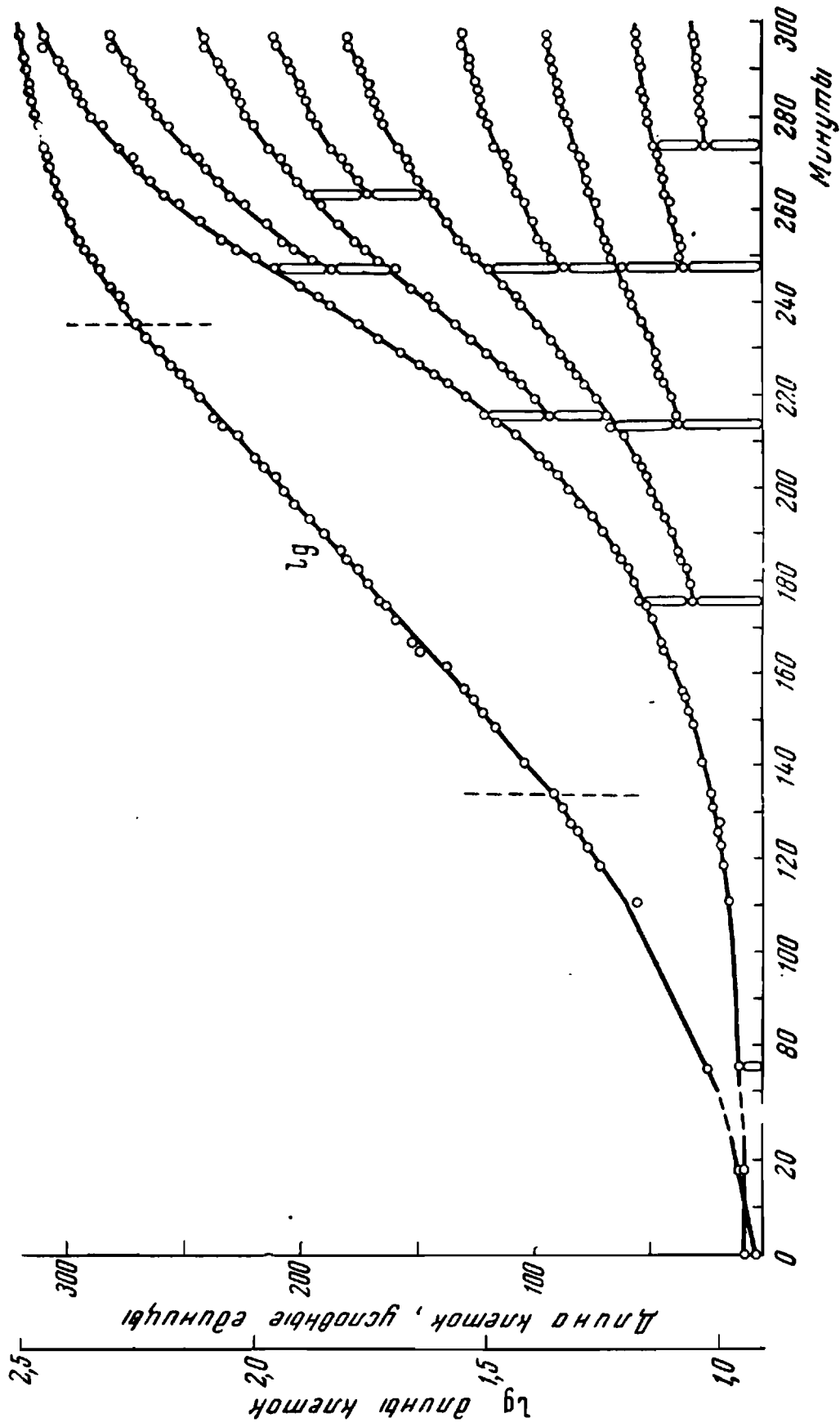


Рис. 69. Кривые роста микрокультуры *Bac. megaterium*, построенные по данным микрокинофильма. Нижние кривые — длина клеток в условных единицах; \lg — суммарная длина всех клеток в логарифмическом выражении. Двойными линиями показана длина клеток, образовавшихся в результате деления

Культуру подвергают какому-нибудь воздействию, задерживающему деление клеток. После этого ее переносят в нормальные условия, где все клетки начинают делиться почти одновременно. Когда клетки поделятся, численность их держится на постоянном уровне до начала нового синхронного деления. Что касается суммарной биомассы клеток, то она все время возрастает.

Отделяя в разные моменты клетки от среды и анализируя их, мы получаем представление о биохимических изменениях, происходящих в процессе роста клетки между двумя делениями.

Синхронизацию можно вызвать разными средствами. Прибегают, например, к охлаждению культуры в течение 30—40 минут, небольшим повышением температуры или же переносу клеток на голодную питательную среду, а с нее обратно на полноценную среду. К сожалению, такие сильные воздействия могут иногда нарушить нормальный рост и физиологию клетки. Более надежные результаты получаются при механическом отделении крупных, готовых к делению клеток от мелких, только что разделившихся. Для этого культуру фильтруют через мембранные фильтры определенной пористости или же делят ее на фракции путем центрифугирования.

На рис. 70 изображен синхронный рост культуры *Azotobacter vinelandii*. В фазу деления клеток синтез ДНК прекращается, относительное количество ее падает. Наоборот, количество свободных аминокислот в это время возрастает. Синтез РНК происходит столь же равномерно, как и синтез протоплазменных белков, на протяжении всего цикла развития клетки.

Измерение роста микробных культур. Рост микробной культуры складывается из двух величин: увеличения численности клеток и изменения их размеров. Когда размеры клеток колеблются вокруг одного и того же среднего уровня, подсчет их численности отражает вместе с тем и нарастание суммарной биомассы культуры. Если же размеры клеток не остаются постоянными (например, клетки постепенно мельчают) или же часть их с течением времени отмирает, биомассу культуры приходится измерять какими-то иными методами. Для этих целей применяются следующие способы.

1. Отделив клетки от среды путем центрифугирования или фильтрования через мембранный фильтр, высушивают их до постоянного веса и взвешивают на аналитических весах. Более простой, хотя и менее точный способ заключается в измерении объема клеток, осевших на дно градуированной центрифужной пробирки (гематокрита).

2. Широкое распространение получили нефелометрические методы. В соответствующих фотонейфелометрах измеряют количество света, проходящего через суспензию клеток. Количество поглощенного света зависит как от численности клеток, так и от их размеров. Следовательно, оно пропорционально величине

не микробной биомассы, содержащейся в 1 мл. Желательно, составить график зависимости между показаниями нефелометра и концентрацией микробной биомассы, чтобы иметь возможность переводить эти показания в весовые единицы.

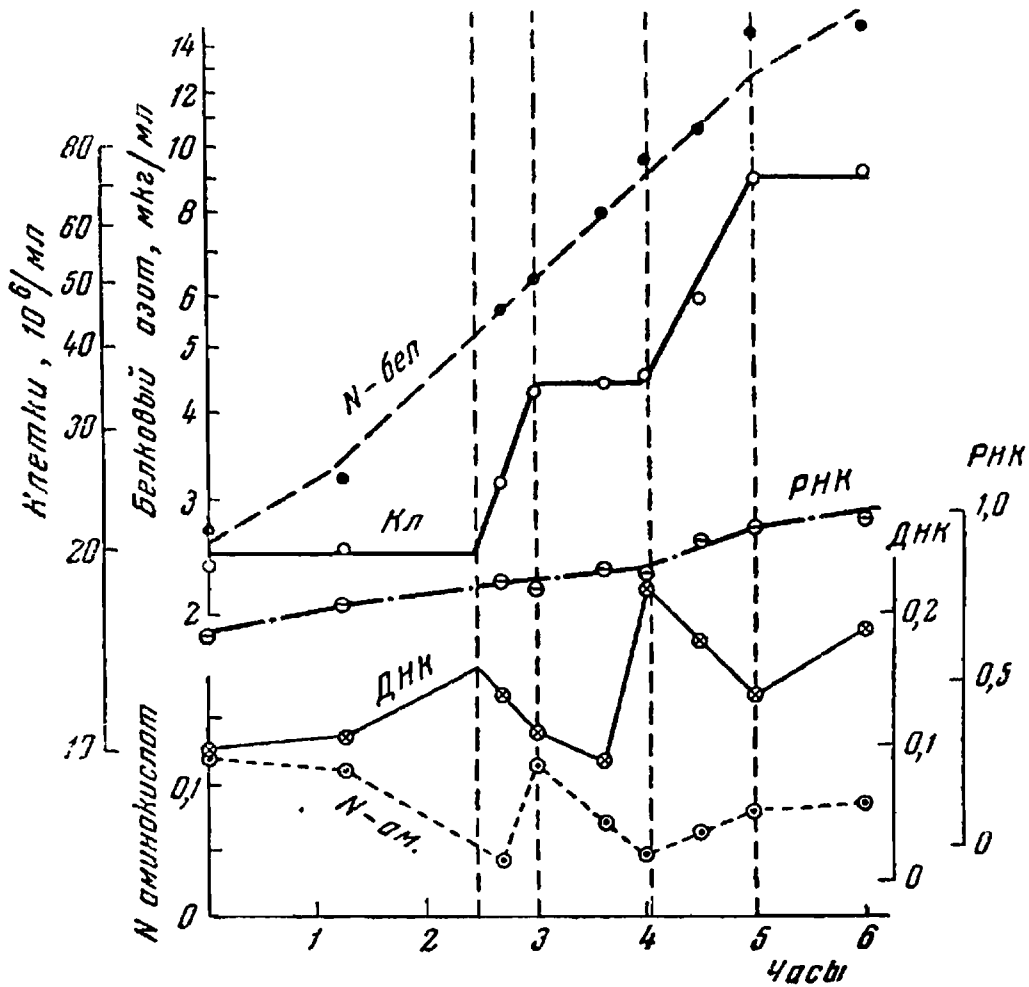


Рис. 70. Синхронная культура *Azotobacter vinelandii*.

N-бел. — белковый азот; *Кл.* — численность клеток; *РНК* — соотношение между РНК и белковым азотом; *ДНК* — соотношение между ДНК и белковым азотом, *N-ам.* — соотношение между азотом свободных аминокислот и белковым азотом. Вертикальными пунктирными линиями разграничены фазы роста и фазы деления клеток. По данным Зайцевой, Хмель и Белозерского, 1961

3. Отфильтровав или отцентрифугировав микробную биомассу из определенного объема среды, анализируют ее на содержание углерода или азота. По количеству последнего можно достаточно точно судить о количестве активной протоплазмы, поскольку азот входит главным образом в состав белков и нуклеотидов. Что касается углерода, то анализ его дает завышенные данные об активном живом веществе, если клетки окружены толстыми слизистыми капсулами или содержат большие запасы безазотистых органических отложений. Но определение углерода в биомассе необходимо для составления баланса превращений органических веществ или ассимиляции углекислоты.

4. Весовые, нефелометрические и химико-аналитические методы пригодны только в тех случаях, когда среда прозрачна и не содержит взвешенных частиц. В сложных же натуральных средах (например, солодовом или мучном заторе) за нарастанием биомассы культуры приходится следить по косвенным показателям: газовыделению, накоплению в среде кислот и т. д. Количество продуктов брожения не строго пропорционально микробной биомассе, однако известное соответствие между ними существует. Поэтому такого рода косвенные методы могут дать приближенное представление о нарастании биомассы культуры.

Определение численности клеток. Недостатком методов, основанных на определении суммарной биомассы, является то, что они не отвечают на вопрос о численности микробных особей. Численность клеток измеряют либо методами прямого счета, либо путем посевов.

1. При прямых методах количество клеток подсчитывают в специальных счетных камерах (Тома, Горяинова и др.).

С той же целью применяется метод прямого счета Виноградского (1952), предложенный им для изучения почвенной микрофлоры, но пригодный и для исследования чистых культур. Капля культуры определенного объема, смешанная с 1—2 каплями 0,5% агара, размазывается по предметному стеклу на определенную площадь (обычно 2×3 см). Подсохший мазок окрашивается эритрозином и просчитывается с помощью сетчатого окуляр-микрометра.

В молочной промышленности применяется прямой метод Дрейера-Королева. Бактериальная культура смешивается в определенной пропорции со стандартной суспензией дрожжей, предварительно покрашенной. Зная титр дрожжевой суспензии и определив соотношение между дрожжевыми и бактериальными клетками в поле зрения микроскопа, рассчитывают численность последних в 1 мл.

2. Количество живых клеток определяют с помощью общеизвестного метода посева на чашки, а также метода предельных разбавлений. Последний состоит в том, что из культуры делают ряд последовательных разбавлений в соотношении 1:10 и отмечают то наибольшее разбавление, при котором еще обнаруживается рост культуры в нескольких параллельных пробирках. Наличие роста только в отдельных пробирках свидетельствует о том, что при данном разбавлении численность клеток в разливаемой жидкости стала меньше числа пробирок. Для вычисления результатов определения пользуются особыми таблицами.

Ростовые методы обладают тем преимуществом перед методами прямого счета, что погибшие клетки при этом не учитываются. К сожалению, не всегда можно ручаться за то, что

культура действительно распалась на отдельные клетки: нередко остаются цепочки, зооглеи или слипшиеся клетки. В результате этого количество выросших колоний (или титр клеток по методу разведения) оказывается ниже действительного числа живых клеток. Заниженные результаты могут получаться и потому, что одиночные клетки бактерий (особенно анаэробов) иногда с трудом приступают к размножению. И наконец, ростовые методы показывают только количество клеток, способных размножаться при данных условиях, но не общее число живых клеток. В категорию нежизнеспособных форм могут ошибочно попасть, например, предспоровые формы бактерий, неспособные прорасти раньше, чем они превратятся в зрелые споры. После некоторых воздействий на культуру (например, ультрафиолетового облучения) часть клеток впадает в неактивное состояние — они как бы находятся на полпути между жизнью и смертью. При высеве на одни среды такие клетки реактивируются и начнут размножаться, при высеве же на другие — не прорастут и поэтому будут приняты за мертвые.

Следовательно, каждый метод отвечает только на какой-нибудь один вопрос. Используя параллельно несколько методов, мы составим более полное представление о ходе развития культуры. В частности, сочетание прямого счета клеток с весовым или нефелометрическим определением биомассы культуры позволяет вычислить средний вес одной клетки. Для этого вес биомассы культуры надо поделить на численность клеток. Еще более точное представление о культуре дают прямые измерения размеров отдельных клеток и разбивка их на определенные категории соответственно размерам.

Специальные цитологические методы с применением обычных или флюоресцирующих красок позволяют отличить живые клетки от мертвых и установить таким путем процентное соотношение между ними. Прием этот особенно ценен при работе с культурами мицелиальных организмов, где определение числа живых клеток путем посева на чашки не дает точных результатов.

Закономерности роста и размножения клеток

Скорость роста клеток. При исследовании ростовых процессов нужно различать, во-первых, растущую биомассу клеток и, во-вторых, даваемый ею прирост. Иногда прирост сразу же отделяется от клетки и биомасса последней не увеличивается. Примером может служить процесс отшнуровывания покоящихся спор (конидий) на конце особой цилиндрической клетки (стеригмы) у грибов-пенициллов, что схематически дано на рис. 71 А. Но значительно чаще образующийся

прирост присоединяется к растущей биомассе, вызывая тем самым ее увеличение.

Для количественной характеристики ростовых процессов пользуются двумя показателями: 1) абсолютной (валовой) и 2) относительной (удельной) скоростью роста.

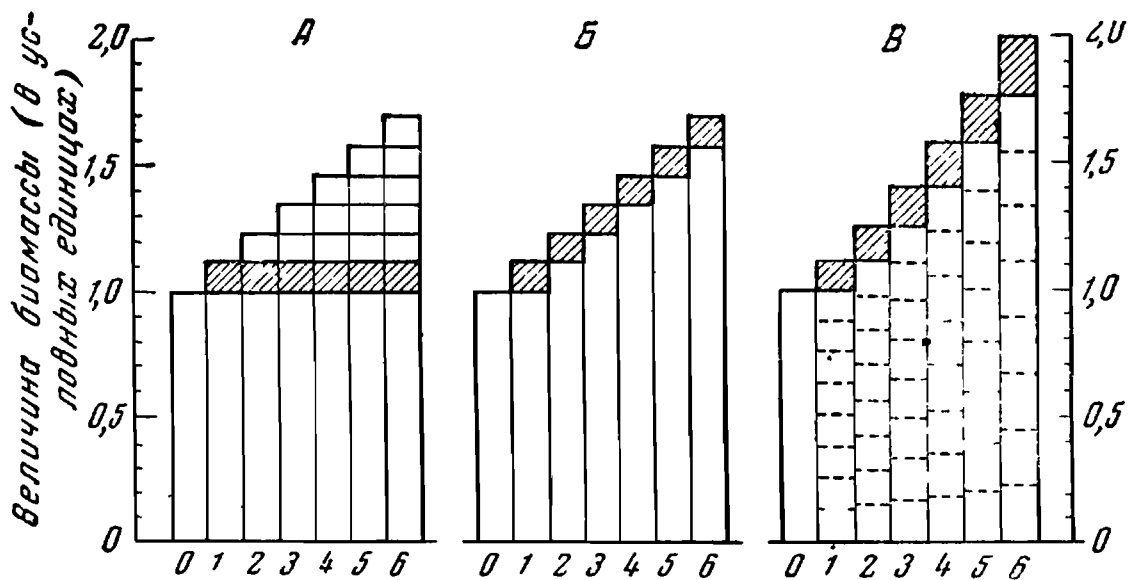


Рис. 71. Три типа роста клеток. Прирост за каждый данный отрезок времени заштрихован. На оси абсцисс отложено время в условных единицах. Объяснения см. в тексте

Валовая (общая) скорость роста (v) характеризуется абсолютным приростом биомассы за единицу времени (обычно — за 1 час). В дифференциальной форме она выражается уравнением:

$$v = \frac{dm}{dt}, \quad (1)$$

где dm обозначает приращение микробной биомассы за бесконечно малый отрезок времени dt .

Среднюю скорость роста ($v_{\text{ср}}$) за какой-либо конечный отрезок времени $t_1 - t_0$ вычисляют по следующей формуле, в которой m_0 обозначает величину биомассы в начале и m_1 — в конце этого отрезка:

$$v_{\text{ср}} = \frac{m_1 - m_0}{t_1 - t_0}. \quad (2)$$

От валовой скорости следует отличать удельную (или относительную) скорость роста (μ), под которой подразумевается часовой прирост, пересчитанный на единицу растущей биомассы:

$$\mu = \frac{v}{m} = \frac{dm}{dt} \cdot \frac{1}{m}. \quad (3)$$

Пользуясь известной формулой дифференциального исчисления $\left(\frac{d(\ln m)}{dm} = \frac{1}{m}\right)$ и сделав соответствующую подстановку в последнее выражение (3), можно его преобразовать так:

$$\mu = \frac{d(\ln m)}{dt} \quad (4)$$

Средняя удельная скорость роста ($\mu_{\text{ср}}$) за какой-либо период времени $t_1 - t_0$ равна:

$$\mu_{\text{ср}} = \frac{\ln m_1 - \ln m_0}{t_1 - t_0} = \frac{2,3 (\log m_1 - \log m_0)}{t_1 - t_0} \quad (5)$$

Вывод, к которому приводят полученные уравнения, на первый взгляд представляется несколько неожиданным: оказывается, относительная скорость роста характеризуется увеличением натуральных логарифмов биомассы за единицу времени. Этим она отличается от валовой скорости роста, которая измеряется приростом абсолютных величин биомассы.

С течением времени скорость роста может оставаться постоянной, увеличиваться или убывать. Соответственно этому ростовой процесс может иметь равномерный, ускоряющий или затухающий характер.

Схема А (рис. 71) изображает случай, когда одновременно с новообразованием биомассы происходит ее выключение из ростового процесса, в результате чего масса растущей клетки не изменяется. Выше говорилось, что именно так образуются конидии по базипетальному способу у плесневых грибов. Фактические приросты клетки за каждый отрезок времени сохраняют здесь одну и ту же величину, и, следовательно, валовая скорость роста остается постоянной. Постоянной остается и удельная скорость, т. е. соотношение между приростом и растущей биомассой. В математической форме сказанное выражается следующим образом:

$$\mu = \text{const}; \quad v = \text{const}; \quad m = \text{const}.$$

На рис. 71, схема Б, мы видим, что приросты также остаются одинаковыми по своей абсолютной величине. Но в отличие от предыдущего случая, они не отделяются от клетки, вследствие чего биомасса последней равномерно возрастает по наклонной прямой линии. Удельная скорость роста при этом постепенно падает, так как соотношение между приростами и растущей биомассой с каждым разом уменьшается.

Прямолинейный рост в математической форме характеризуется так (c обозначает некоторую константу):

$$\begin{aligned} v &= c; \quad \mu = \frac{c}{m}; \\ m_1 &= m_0 + c(t_1 - t_0). \end{aligned} \quad (6)$$

Такого рода более или менее равномерный рост наблюдается у мицелиальных организмов, например плесневых грибов. Обычно они растут только кончиками гиф. Благодаря верхушечному (акропетальному) росту, гифа постепенно удлиняется в одном направлении, причем наиболее молодые клетки находятся на ее конце. Путем микроскопирования с применением специальных окрасок можно убедиться, что клетки, расположенные вдоль гифы, различаются своим строением в связи с их различным физиологическим возрастом (Беккер, 1963). В литературе есть указания, что с равномерной скоростью могут расти не только мицелиальные, но и одноклеточные организмы, например дрожжи.

В отличие от рассмотренного случая, относительная скорость на рис. 71, схема В, сохраняет постоянное значение: за каждый промежуток времени биомасса клетки возрастает на $\frac{1}{8}$ своей величины, что показано пунктирными линиями. По мере увеличения растущей биомассы абсолютные величины приростов повышаются. Повышается, следовательно, и валовая скорость роста. Рост идет в ускоряющемся темпе, по закону геометрической прогрессии со знаменателем, равным $1 + \frac{1}{8} = 1,125$. Если обозначить величины биомассы за последовательные интервалы времени через m_0, m_1, m_2 и т. д., то получатся следующие соотношения:

$$\frac{m_1}{m_0} = \frac{m_2}{m_1} = \frac{m_3}{m_2} = \dots = 1,125.$$

Само собой разумеется, что удельная скорость роста (а значит, также знаменатель прогрессии) могут иметь и какую-то иную величину, чем на рис. 72, В. Рост с постоянной удельной скоростью в общей форме характеризуется так:

$$\begin{aligned} \mu &= c; \quad v = mc; \\ m_1 &= m_0 e^{\mu(t_1 - t_0)}. \end{aligned} \quad (7)$$

Здесь c — некоторый постоянный коэффициент, а $e = 2,714\dots$ — основание натуральных логарифмов.

Такой рост называют «экспоненциальным», поскольку независимая переменная (время) стоит в экспоненте (показателе степени). Уравнение роста (7) после логарифмирования превратится в уравнение прямой:

$$\log m_1 = \log m_0 + \mu(t_1 - t_0) \log e. \quad (8)$$

Откладывая на графике логарифмы биомассы, мы получим прямую наклонную линию (рис. 69).

Необходимо подчеркнуть, что не всякий ускоряющийся рост подчиняется закону геометрической прогрессии. Это бывает

только в том частном случае, когда удельная скорость роста сохраняет строго постоянное значение. При повышающейся, равно как и при слегка убывающей удельной скорости, рост также идет в ускоряющемся темпе, по изогнутой кверху кривой, однако формула геометрической прогрессии в этих случаях непригодна. Например, при переходе клетки от состояния физиологического покоя к активной жизнедеятельности (в частности, при прорастании бактериальных спор) удельная скорость роста постепенно увеличивается, в связи с чем кривая нарастания клеточной биомассы очень круто изгибается вверх.

Бактериальная клетка в физиологически активном состоянии растет всей массой своего тела (в этом состоит ее отличие от мицелиальных организмов). Поэтому можно было бы ожидать, что по мере увеличения размеров клетки ее приросты будут повышаться в геометрической прогрессии, согласно вышеуказанному экспоненциальному закону. Это в действительности и наблюдается у палочковидных бактерий, клетки которых увеличиваются только в длину, поперечник же их в процессе роста остается постоянным, в связи с чем соотношение между поверхностью и объемом клетки почти не меняется.

Иное наблюдается у шаровидных бактерий. На скорость их роста существенное влияние оказывает изменяющееся соотношение между поверхностью клетки, через которую последняя получает питательные вещества, и ее объемом. Поверхность возрастает пропорционально квадратной степени радиуса, а объем — пропорционально его кубу. Поэтому по мере увеличения поперечника растущей клетки соотношение между поверхностью и объемом падает. Это ведет к ухудшению условий обмена веществ и затуханию скорости роста. Иллюстрацией

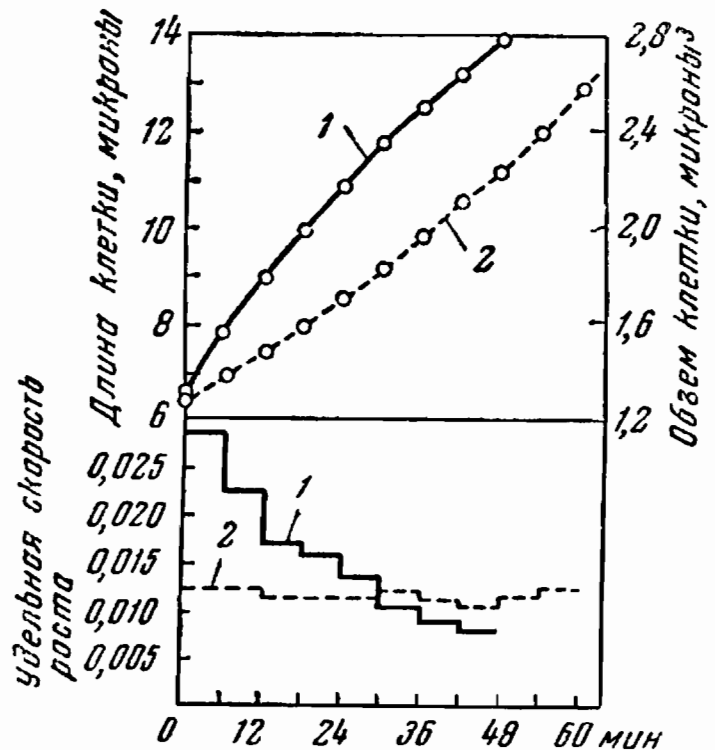


Рис. 72. Рост клеток палочковидных бактерий (*Bac. megaterium*) в линейных единицах и кокков (*Micrococcus*) в объемных единицах

1 — *Micrococcus*, средние величины из 58 серий наблюдений, 2 — *B. megaterium*, средние величины из 75 серий наблюдений. Удельная скорость роста вычислена за 1 мин. По данным И. И. Шмальгаузена, 1935

сказанного могут служить сравнительные данные И. И. Шмальгаузена (1935) о росте цилиндрических клеток *Vac. megaterium* и шаровидных клеток кокков (рис. 72).

Рост клеток протозоа и водорослей обычно имеет такой же затухающий характер, как и у кокковых бактерий. Но в данном случае решающую роль играет не столько соотношение между поверхностью и объемом, сколько цикл ядерных превращений. Сразу после обособления клетки происходит быстрое нарастание ее цитоплазмы. Затем наступает вторая фаза развития, в течение которой протекает деление клеточного ядра. В эту фазу рост клетки резко тормозится.

Все сказанное выше по поводу зависимости между удельной скоростью роста и характером ростовой кривой представлено в табл. 20. В случае постепенного падения удельной скорости

Таблица 20

Возможные соотношения между относительной и абсолютной скоростями роста

Относительная (удельная) скорость роста	Абсолютная (валовая) скорость роста	Характер роста
Быстро убывает	Уменьшается	Затухающий
Убывает обратно пропорционально увеличению биомассы ($\mu = \frac{c}{m}$)	Остается постоянной ($v = c$)	Равномерный (прямолинейный)
Убывает более медленно	Слегка увеличивается	Слегка ускоряющийся
Остается постоянной ($\mu = c$)	Увеличивается в геометрической прогрессии ($v = ct$)	Ускоряющийся в геометрической прогрессии (экспоненциальный)
Повышается	Увеличивается быстрее, чем в геометрической прогрессии	Резко ускоряющийся

роста ростовой процесс может иметь замедляющийся, равномерный или даже слегка ускоряющийся характер. При постоянной или повышающейся удельной скорости он имеет всегда только ускоряющийся характер.

Скорость размножения клеток. Скорость нарастания биомассы должна учитываться в работах по физиологии питания, а также при изучении круговорота веществ в природе, где синтезируемое микробами органическое вещество служит пищей для других организмов. Но при генетических исследованиях на первый план выступает иной показатель— это скорость размножения клеток. Достаточно сказать, что появление мутаций приурочено, по мнению генетиков, к моменту деления клеток; что сдвиги генетического состава микробной популяции

обусловлены различной скоростью размножения отдельных рас и биотипов; что ход адаптации микробной культуры к неблагоприятным факторам среды определяется числом клеточных поколений, развившихся при данных условиях.

О скорости размножения одноклеточных организмов судят по тому, как часто они делятся или почкуются. Отрезок времени, в течение которого обособившаяся молодая клетка вырастает до максимальной величины и приступает в свою очередь к делению (или, соответственно, почкованию) называется «продолжительностью генерации». Надо заметить, что сроки повторения актов деления и почкования довольно непостоянны. Как показывают прямые микроскопические наблюдения, они заметно различаются не только у соседних клеток, но и у потомков одной и той же клетки (рис. 69). Поэтому на практике обычно приходится иметь дело со средней продолжительностью генерации (g), о способе вычисления которой будет сказано несколько ниже.

Предположим, что вначале было N_0 клеток. За каждую генерацию численность их повышается в 2 раза, а за n генераций она возрастет в 2^n раз и достигнет величины N_1 :

$$N_1 = N_0 \cdot 2^n. \quad (9)$$

Прологарифмировав это уравнение и сделав надлежащие перестановки, получим формулу, необходимую для вычисления количества клеточных поколений, сменившихся за данный период времени $t_1 - t_0$:

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2} = 3,32 (\log N_1 - \log N_0). \quad (10)$$

Скорость размножения (v) характеризуется средним числом делений или почкований каждой клетки за единицу времени. С этой целью общее количество поколений (n) делят на время ($t_1 - t_0$):

$$v = \frac{n}{t_1 - t_0} = \frac{3,32 \cdot (\log N_1 - \log N_0)}{t_1 - t_0} \quad (11)$$

Коэффициент размножения (v) не всегда бывает целым числом. Когда, например, продолжительность генерации выходит за пределы 1 часа, он выражается дробью меньше единицы.

Если, как было сказано выше, за отрезок времени $t_1 - t_0$ сменяется n клеточных поколений, то продолжительность одного поколения (генерации) в среднем составляет:

$$g = \frac{t_1 - t_0}{n} = \frac{1}{v}.$$

Подставив сюда вместо v выражение (11), получим формулу для вычисления средней продолжительности генерации:

$$g = \frac{0,3 \cdot (t_1 - t_0)}{\log N_1 - \log N_0}. \quad (12)$$

В процессе своего индивидуального развития клетка значительно увеличивается в размерах, однако после каждого очередного деления или почкования она возвращается в исходное состояние. Благодаря этому размеры клеток регулярно колеблются вокруг некоторого среднего уровня, не выходя за пределы известных границ. В популяциях, где одновременно присутствуют клетки, находящиеся на разных ступенях индивидуального развития, средний вес одной клетки остается постоянным (конечно, лишь до тех пор, пока не изменится состав окружающей среды, что повлечет за собой измельчание или, наоборот, укрупнение клеток). Поэтому суммарный вес биомассы культуры бывает прямо пропорционален численности клеток:

$$m = \alpha \cdot N \quad (\text{где } \alpha \text{ — средний вес одной клетки}).$$

На этом основании величины N_1 и N_0 в уравнении (12) можно заменить, соответственно, на m_1 и m_0 (коэффициент α при этом сокращается):

$$g = \frac{0,3(t_1 - t_0)}{\log m_1 - \log m_0}. \quad (13)$$

Подобную же замену можно произвести в уравнении (11), характеризующем скорость размножения клеток:

$$v = \frac{3,32 \cdot (\log m_1 - \log m_0)}{t_1 - t_0}. \quad (14)$$

Таким образом, для вычисления продолжительности генерации и скорости размножения клеток необязательно определять их численность — иногда можно ограничиться измерением суммарной биомассы культуры.

Путем сопоставления приведенных формул (13) и (14) с уравнением удельной скорости роста (5), нетрудно установить, как связана последняя с продолжительностью генерации и скоростью размножения клеток.

$$g = \frac{0,693}{\mu}, \quad (15)$$

$$v = 1,44 \mu, \quad (16)$$

$$\mu = \frac{0,693}{g} = 0,693v. \quad (17)$$

О скорости роста микроорганизмов принято судить по продолжительности генерации. Указанный прием достаточно обоснован, поскольку удельная скорость роста и время генерации находятся между собой в обратно пропорциональной зависимости, как показывают формулы (15) и (17). Следует, однако,

предостеречь против излишнего увлечения понятием «продолжительность генерации». Это понятие безусловно приложимо только к одноклеточным организмам, размножающимся путем деления или почкования. По отношению же к мицелиальным организмам (например, актиномицетам) оно лишено реального смысла. Вопрос о том, за какой срок длина гиф удваивается, представляет не бóльший интерес, чем вопрос о времени их удлинения, скажем, в полтора или три раза.*

Кроме того, нужно учитывать, что удвоение биомассы на протяжении одной генерации вовсе не означает, что ее относительный прирост за это время равен единице. Расчеты, построенные на таком допущении, ведут к серьезным ошибкам. Скорость размножения только пропорциональна, но не равна относительной скорости роста (формулы 16 и 17). Если, например, клетка делится 1 раз за час ($v=1$), то $\mu=0,693$ и, следовательно, относительный прирост исходной биомассы за 1 час составляет только 0,693. Если клетка делится дважды в течение часа ($v=2$), то относительная скорость роста биомассы составляет 1,386.

Чтобы более наглядно представить себе сказанное, обратимся снова к рис. 71. На схемах А и В (рис. 71) относительная скорость роста совпадает: прирост за каждый интервал времени, поделенный на вес растущей биомассы, составляет одну и ту же величину. Если считать, что продолжительность каждого такого интервала равна 10 мин, то за 6 интервалов, т. е. за 1 час, относительный прирост выразится цифрой 0,693 (следовательно, $\mu=0,693$). Это в действительности видно из схемы А (рис. 71), где показан только прирост исходной биомассы.

На схеме В (рис. 71) прирост образуется не только за счет исходной биомассы, но и за счет той биомассы, которая дополнительно вырастает на протяжении опыта. Благодаря этому абсолютные величины приростов повышаются в геометрической прогрессии, по экспоненциальному закону. Суммарный прирост за 1 час, как можно видеть на рисунке, составляет единицу, величина биомассы повышается за этот срок вдвое. Этого и можно было ожидать на основании формулы экспоненциального роста (7): $\frac{m}{m_0} = e^{0,693 \cdot 1} = 2$.

Удвоение биомассы означает, что клетка в течение 1 часа закончила цикл своего индивидуального развития и готова снова приступить к делению. Таким образом, скорость ее размножения выражается коэффициентом 1. Между тем удельная скорость роста клетки составляет только 0,693, как и на схеме А (рис. 71). Излишек ($1-0,693=0,307$) произошел за счет биомассы, вновь образовавшейся на протяжении опыта. С течением времени разница между абсолютным и относительным прирос-

том все более увеличивается. Так, например, на протяжении двух часов клетки поделятся дважды, численность их возрастет в четыре раза, и, значит, из каждой исходной клетки образуются три новые ($4-1=3$). Но прирост единицы исходной биомассы за этот срок выразится значительно более скромной цифрой: $0,693 \cdot 2 = 1,386$.

Рост и развитие микробных культур

Иногда после высева в свежую среду микробные клетки некоторое время не приступают к размножению. Это может быть вызвано разными причинами. В частности, при посеве покоящихся спорами требуется известное время для их прорастания. Но и вегетативные клетки иногда не сразу начинают размножаться из-за неблагоприятных условий среды, например, слишком высокого окислительно-восстановительного потенциала или трудной усвояемости питательных веществ. Выделяя наружу восстановливающие вещества, микробы постепенно снижают потенциал среды до уровня, при котором их развитие становится возможным. Чтобы иметь возможность питаться высокомолекулярными веществами, подобными белкам и полисахаридам, клетка должна предварительно выделить в среду гидролитические ферменты (протеиназы, амилазу, пектиназу). Потребление некоторых органических соединений связано с биосинтезом адаптивных ферментов, на что также требуется известный срок.

Проходит несколько часов, пока высеянные клетки не приспособятся к имеющимся условиям среды или видоизменят их в пужную сторону. Этот период начальной задержки роста принято называть «лагфазой» (рис. 73). К концу его клетки начинают расти, причем скорость роста постепенно повышается. Необходимо заметить, что рост клеток начинается раньше, чем размножение. В связи с этим к концу лагфазы средняя величина клеток увеличивается.

После этого наступает период, когда культура растет с постоянной удельной скоростью. Через определенные сроки происходит удвоение численности клеток, равно как их суммарного веса. В предыдущем разделе было уже сказано, что промежуток времени, в течение которого биомасса возрастает вдвое, называется продолжительностью генерации. Скорость роста и размножения у отдельных клеток в культуре не совпадает. Поэтому продолжительность генерации представляет собой некоторую средневзвешенную величину.

В рассматриваемый период численность клеток и их суммарная биомасса возрастают в геометрической прогрессии, согласно экспоненциальному закону (формула 7). При этом рост культуры можно охарактеризовать любым из следующих урав-

нений (буквенные обозначения те же, что и в предыдущем разделе):

$$m_1 = m_0 e^{\mu(t_1 - t_0)}, \quad (18)$$

$$N_1 = N_0 e^{0,693v(t_1 - t_0)}, \quad (19)$$

$$N_1 = N_0 2^{v(t_1 - t_0)}. \quad (20)$$

Этот период роста культуры принято было называть «логарифмической фазой». В настоящее время его именуют «экспоненциальной фазой», что является более правильным, так как в

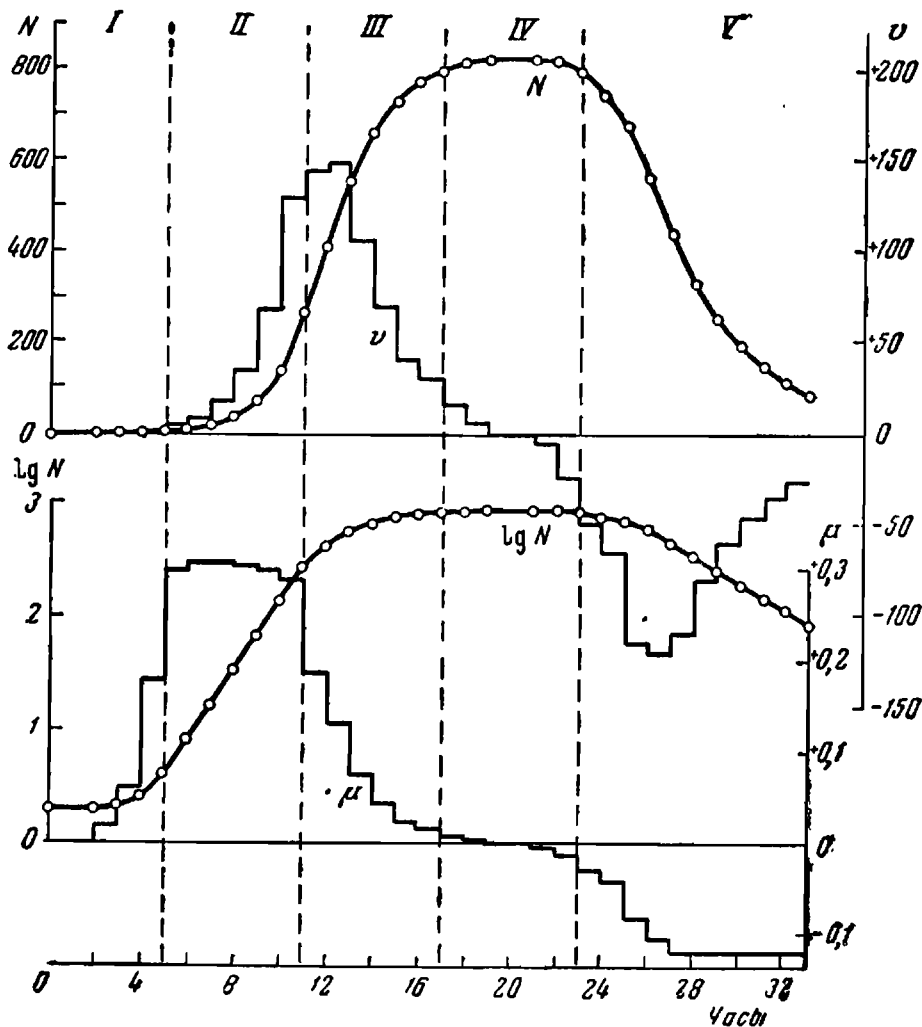


Рис. 73. Схема роста микробной культуры¹

N — численность клеток; $\lg N$ — то же в логарифмическом выражении; v — общая скорость роста культуры; μ — удельная скорость роста культуры.

I — лагфаза; II — экспоненциальная (логарифмическая) фаза; III — фаза замедления роста; IV — максимальная стационарная фаза; V — фаза отмирания

¹ Следует обратить внимание, что абсолютная скорость роста (v) достигает максимума в тот период, когда удельная скорость роста (μ) начинает резко уменьшаться, и что на протяжении этой же III-ей фазы роста культуры вырастает наибольшее количество клеток (около $2/3$ их общей численности).

приведенных уравнениях время стоит в экспоненте (показателе степени).

При графическом изображении экспоненциального роста культуры удобнее пользоваться полулогарифмической системой координат, поскольку за каждую генерацию логарифмы увеличиваются на одну и ту же цифру ($\log 2 = 0,3$), тогда как абсолютный прирост с каждым часом становится все больше (табл. 21).

Таблица 21

Увеличение числа клеток при экспоненциальном росте

Интервал времени	Число клеток	Прирост числа клеток	Логарифмы числа клеток	Увеличение логарифмов числа клеток
0	1	—	0	—
1	2	$2-1=1$	0,3	0,3
2	4	$4-2=2$	0,6	0,3
3	8	$8-4=4$	0,9	0,3
4	16	$16-8=8$	1,2	0,3

Сказанное, конечно, распространяется и на те случаи, когда рост культуры учитывается в весовых единицах.

При откладывании на графике логарифмов биомассы или численности клеток экспоненциальный рост выразится прямой наклонной линией. Это иллюстрируется данными для микрокультуры *Vac. megaterium* (рис. 69), а также схематическими кривыми на рис. 73.

Экспоненциальная фаза постепенно переходит в фазу замедления роста. Удельная скорость роста μ (равно как и скорость клеточного размножения ν) в этот период понемногу падает, пока, наконец, нарастание биомассы культуры вовсе не прекратится. Тогда наступает стационарная фаза роста культуры.

В течение стационарной фазы численность живых клеток держится на более или менее постоянном уровне. Это бывает связано или с превращением вегетативных клеток в неразмножающиеся формы (например, в споры), или же с тем, что между их отмиранием и размножением устанавливается подвижное равновесие. Когда численность живых особей перестала уже повышаться, общее число клеток может возрастать за счет накопления погибших, но не успевших еще лизироваться клеток.

После стационарной фазы количество живых клеток все более падает. Уменьшается и вес биомассы культуры из-за начавшегося автолиза. Наступает фаза отмирания культуры.

Процесс роста культуры сопровождается изменением морфологии клеток, их химического состава и физиологической активности. Во время лаг-фазы клетки обычно увеличиваются в

размерах и содержание РНК в них повышается (рис. 74, а) При цитологических окрасках они обнаруживают базофилию, т. е. повышенную восприимчивость к красителям, обладающим основными свойствами, — метиленовой сини, азуру, тионину и др. Базофилия сохраняется и в течение логарифмической фазы. В период замедления роста культуры (рис. 74, b — d) содержание РНК в клетках начинает уменьшаться. В связи с этим базофилия сменяется все более резко выраженной оксифилией. Клетки теперь слабо окрашиваются основными красками, но зато их протоплазма хорошо связывает кислые краски, например эозин, эритрозин и лихтерюн.

Одновременно со скоростью роста изменяется и физиологическая активность микробов. Быстро растущие клетки быстрее потребляют питательные вещества и образуют продукты обмена, чем клетки, рост которых начал замедляться. Первые из них более отзывчивы на воздействия среды: они легче синтезируют адаптивные ферменты и обладают меньшей устойчивостью к неблагоприятным внешним факторам: повышенной температуре, осмотическому давлению, ядовитым веществам и пр.

В процессе роста культуры происходят также изменения ферментного аппарата клеток. В связи с этим некоторые биохимические свойства клеток оказываются приуроченными к периоду быстрого роста, другие же, наоборот, к периоду его замедления и остановки.

Учитывая изменения свойств клеток, можно говорить о физиологическом возрасте культуры и периодах ее развития (Иерусалимский, 1949). Как известно, онтогенетическое развитие организмов принято разделять на четыре основных периода:

- 1) эмбриональный,
- 2) молодость,
- 3) зрелость,
- 4) старость.

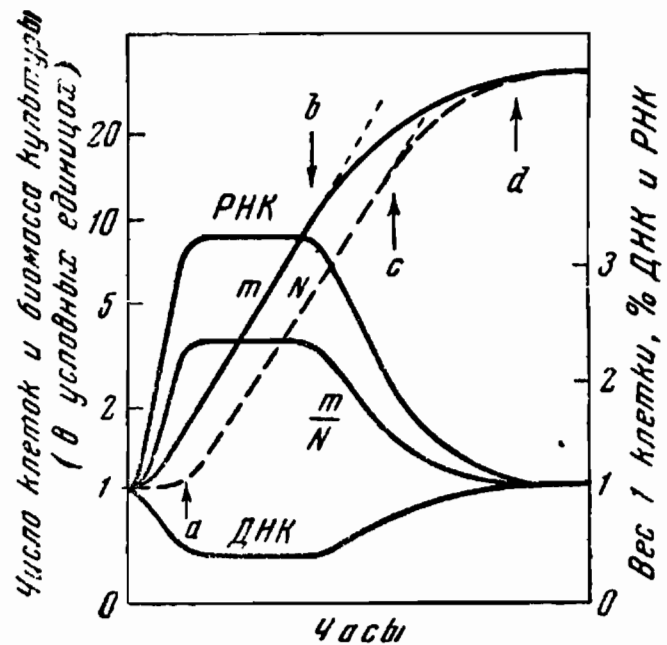


Рис. 74. Схематизированные кривые, характеризующие рост культуры и изменение свойств бактериальных клеток. Начальные значения всех величин приняты за единицу

m — нарастание суммарной биомассы культуры (в логарифмическом масштабе); *N* — увеличение численности клеток (в логарифмическом масштабе); $\frac{m}{N}$ — средний вес 1 клетки; РНК — %-ное содержание РНК; ДНК — %-ое содержание ДНК. По Herbert, 1961

Те же самые названия можно было бы условно применять и к микробным культурам, не забывая, конечно, что в данном случае речь идет о развитии популяции самостоятельных особей, а не о развитии одного индивидуума.

Остановимся на вопросе о взаимосвязи между фазами роста и периодами развития культуры.

Эмбриональный период соответствует лагфазе. Это — период приспособления клеток к имеющимся условиям среды. Выработав соответствующие адаптивные ферменты и настроившись на определенный тип обмена веществ, клетки приобретают возможность расти и размножаться на среде данного состава. Если исходные условия среды полностью соответствовали физиологическому состоянию засеянных клеток, последние приступают к размножению немедленно. Эмбриональный период развития культуры в этом случае отпадает.

Молодость культуры совпадает во времени с фазой экспоненциального роста. В этот период клетки обладают высокой физиологической активностью, быстро делятся, протоплазма их базофильна и содержание РНК в ней высокое.

Вслед за этим рост культуры начинает замедляться, пока не наступит стационарная фаза. Вправе ли мы говорить, что с этого момента культура всегда вступает в период своей зрелости? Имеющиеся материалы не дают основания для таких безоговорочных утверждений. В самом деле, показателем физиологической зрелости культуры служит начавшийся процесс спорообразования или же структурно-биохимическая перестройка вегетативных клеток, связанная с их переходом в покоящееся состояние (оксифилия протоплазмы, понижение в ней % РНК, накопление волютина, гликогена и других резервных отложений, резкие изменения обмена веществ и т. д.). Когда причиной остановки роста культуры является переход клеток в состояние физиологического покоя, стационарная фаза и период зрелости, действительно, совпадают во времени. Однако причины замедления роста культуры этим не исчерпываются. Рост и размножение вегетативных клеток могут прекратиться из-за создавшихся неблагоприятных условий среды: понижения рН, накопления вредных продуктов обмена, исчерпания запасов одного из питательных веществ, находившегося в минимуме. В таких случаях клетки перестают размножаться раньше, чем успеют превратиться в физиологически зрелые формы. Благодаря этому период зрелости культуры сдвигается на более позднее время. Он может и вовсе не наступить, если вегетативные клетки начнут дряхлеть и отмирать, так и не превратившись в покоящиеся формы. Период молодости культуры в этом случае сразу сменится периодом старости.

Возможность подобных сдвигов иллюстрируется схемой на рис. 66. В одном случае спорообразование началось еще до на-

ступления стационарной фазы роста культуры. Период старости культуры (показателем которого служит то, что в культуре остались лишь покоящиеся или отмирающие формы, а размножающиеся клетки полностью исчезли) начинается здесь во время фазы убывающей численности клеток.

В другом случае споруляция запаздывает, в связи с чем первые проспоры — признак физиологической зрелости культуры — появляются только в самом конце стационарной фазы роста. Период старости за рассматриваемый срок вовсе не успевает наступить — он сдвинулся на более поздние часы.

Таким образом, вторая культура развивается медленнее первой, хотя кривые роста у них совпадают. Мы видим, что между фазами роста культуры и морфо-физиологической изменчивостью клеток не существует постоянной связи. Именно поэтому целесообразно пользоваться особым понятием «периоды развития» для характеристики изменений, претерпеваемых микробными клетками в процессе роста культуры.

Проточные культуры

Причиной изменения темпа роста, морфологии и физиологии культуры является изменение состава среды под влиянием жизнедеятельности самих микроорганизмов. Чтобы избежать этих явлений и стабилизировать культуру в одном и том же состоянии, применяют проточные, непрерывно обновляемые среды (Непрерывное брожение и выращивание микроорганизмов, 1960; Иерусалимский, 1962).

Схема устройства одного из многочисленных аппаратов для непрерывного культивирования показана на рис. 75. Из запасного баллона питательная среда с определенной скоростью течет в сосуд для выращивания клеток (культиватор), где она тщательно перемешивается с культурой. Образующийся при этом избыток культуральной жидкости вместе со взвешенными в ней клетками вытекает наружу. Если скорость уноса клеток (или, иными словами, скорость разбавления культуры током свежей среды) равна скорости их размножения, численность клеток внутри культиватора держится на постоянном уровне. Условия среды в культиваторе и морфо-физиологическое состояние клеток тоже остаются постоянными. Происходят только изменения, связанные с развитием клеток в период между двумя делениями. Но отделив от себя дочернюю клетку, материнская клетка каждый раз возвращается в прежнее состояние. В таком стабильном состоянии культура может пребывать неограниченно долгое время.

В качестве примера можно упомянуть, что в нашей лаборатории культура ацетоно-бутиловых бактерий около 200 дней поддерживалась в состоянии непрерывного размножения, дав

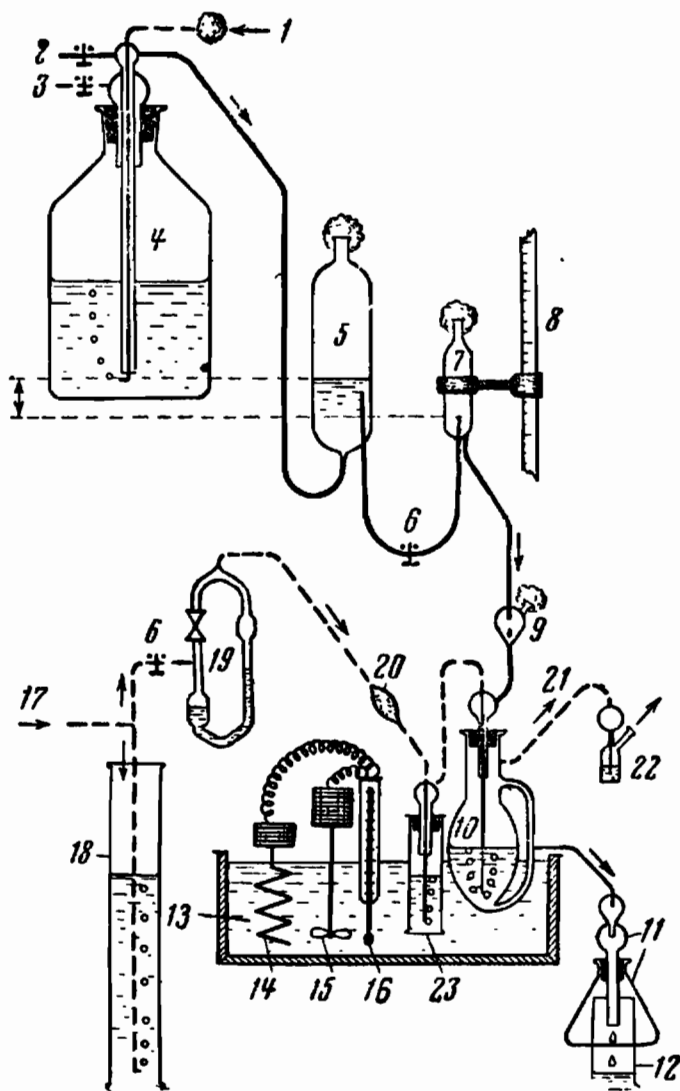


Рис. 75. Схема простой лабораторной установки для непрерывного культивирования бактерий

1 — вход воздуха взамен вытекающей среды; 2 — трубка для заполнения новой средой сосуда 4; 3 — трубка для выхода воздуха во время заполнения; 4 — промежуточный цилиндр; 5 — промежуточный цилиндр; 6 — зажимы; 7 — регулирующая воронка; 8 — штатив для передвижения воронки; 9 — счетчик капель; 10 — культиватор; 11 — предохранительный наконечник для выхода избытка культуральной жидкости; 12 — сборник; 13 — водяная баня; 14 — обогревающее устройство; 15 — мешалка; 16 — контактный термометр; 17 — вход сжатого воздуха; 18 — регулятор давления; 19 — реометр; 20 — ватный фильтр; 21 — выход воздуха; 22 — предохранительный затвор; 23 — сосуд для увлажнения и обогрева воздуха

люции и гражданской войны лаборатории плохо отапливались и пониженная температура замедляла размножение организмов.

Работая с другим видом парамеций, Вудреф (Woodruff, 1929) сохранял их в «вечно молодом» состоянии в течение 22 лет.

за это время более 4300 последовательных генераций (Пинаева, 1957). Когда после этого бактерии были переведены в условия непроточных сред, выяснилось, что все их признаки и особенности остались неизменными. Культура не потеряла свойства образовывать споры и осуществлять брожение. Любопытно, что ацетно-бутиловые бактерии принято считать очень «капризными». После нескольких пересевов в вегетативном состоянии они вырождаются, т. е. утрачивают способность давать нормальное брожение. Очевидно, вырождение культуры объясняется только тем, что при развитии на обычных непроточных средах создаются неблагоприятные условия, вредно действующие на клетки.

Бактериальные клетки не являются исключением. Метальников и Галаджиев (Галаджиев, 1932) поддерживали парамеций в состоянии непрерывного вегетативного размножения на протяжении 20 лет, получив 7883 клеточных поколения. И если в некоторые годы темп размножения клеток замедлялся, то причиной этого были не биологические, а скорее социально-экономические факторы: в годы первой мировой войны, револю-

За это время сменилось около 13 000 последовательных клеточных генераций.

В своих известных опытах Каррел (см. Paul, 1960) более 35 лет поддерживал культуру фибробластов, взятых из зародыша цыпленка. За столь длительный срок зародыш успел бы давно вырасти во взрослого петуха, одряхлеть и погибнуть естественной смертью. Между тем извлеченные из организма тканевые клетки оставались вечно юными, не развиваясь в специализированные органы и не старея.

Правда, в упомянутых опытах, как и в опытах с парамециями, проточные среды не применялись. Вместо этого производилась регулярная замена старой среды свежей и удалялся образовавшийся прирост клеток. Но в настоящее время тканевые культуры удается выращивать *in vitro* на проточных средах подобно клеткам микробов.

Скорость увеличения биомассы культуры на проточных средах характеризуется следующим уравнением:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D) \cdot x, \quad (21)$$

где x — концентрация клеточной биомассы в весовых единицах (или численность клеток в 1 мл); μ — удельная скорость роста, о которой говорилось выше, и D — коэффициент разбавления культуры током свежей среды: $D = \frac{F}{V}$, где F обозначает скорость потока среды в мл/час и V — объем жидкости в культиваторе в мл.

Если μ больше D , то $\frac{dx}{dt} > 0$. Это значит, что концентрация биомассы культуры постепенно повышается. При $\mu < D$ величина $\frac{dx}{dt}$ становится отрицательной и, следовательно, концентрация биомассы падает, что в конечном итоге может привести к вымыванию культуры из аппарата. Когда $\mu = D$, уравнение превращается в $0 \left(\frac{dx}{dt} = 0 \right)$. В этом случае численность клеток (или концентрация микробной биомассы) держится на постоянном уровне. Между приростом клеток и их уносом из культиватора устанавливается подвижное равновесие.

Как добиться такого равновесия и предотвратить вымывание клеток? Эта задача не столь сложна, как могло бы показаться, так как скорость размножения клеток сама собой уравновешивается со скоростью потока, заданной исследователем (конечно, в пределах биологических возможностей микробов). Скорость роста культуры определяется каким-либо лимитирующим фактором среды: низкой остаточной концентрацией одного из питательных веществ, накоплением в среде продуктов обмена,

падением рН и т. д. В свою очередь состав среды в культиваторе зависит от численности клеток: чем больше их там вырастет, тем сильнее изменится среда и ухудшатся условия развития культуры. Поэтому между концентрацией клеток и скоростью их роста существует обратная зависимость. Это и служит основой саморегуляции, свойственной проточным культурам.

При замедлении потока среды численность клеток должна возрастать, что в свою очередь ведет к замедлению скорости их роста, пока последняя не уравнивается со скоростью потока (точнее говоря — с коэффициентом разбавления). И наоборот, при ускорении потока среды численность клеток будет понижаться, в связи с чем скорость их роста соответственно увеличится.

Работы с проточными средами привели к пересмотру прежних взглядов на фазы роста культуры. Ранее предполагалось, что размножаться с постоянной скоростью способны только физиологически молодые клетки с повышенным содержанием РНК, какими они бывают во время экспоненциальной фазы. По окончании этой фазы клетки начинают стареть и базофилия их уменьшается, в связи с чем скорость роста неотвратимо понижается, пока не упадет до нуля. Оказалось, однако, что замедление роста микробов всецело связано с изменением условий среды. Пользуясь проточными средами надлежащего состава, можно задержать культуру на любой точке ростовой кривой (имея в виду восходящую ветвь этой кривой до начала стационарной фазы) и заставить клетки непрерывно размножаться с соответствующей скоростью по экспоненциальному закону. Это еще раз указывает на условность понятий «молодость» и «зрелость» культуры. Вправе ли мы, например, считать пониженную базофилию и уменьшенное содержание РНК признаком старения клеток, если в условиях проточных сред они могут неограниченно долго оставаться в таком состоянии, размножаясь с постоянной скоростью? Очевидно, понятие «размножающаяся вегетативная клетка» не является чем-то однозначным: как темп роста, так и морфо-физиологические особенности вегетативных клеток могут варьировать в широких пределах.

Особый интерес представляет взаимосвязь между содержанием в клетке нуклеиновых кислот и скоростью ее роста. По современным представлениям, синтез белков протоплазмы происходит в рибосомах, состоящих главным образом из РНК. Неудивительно, что быстро растущие клетки содержат в несколько раз больше РНК по сравнению с медленно растущими. Количество ДНК в каждой клетке меньше зависит от ее величины и скорости роста. Необходимо заметить, что быстро растущие клетки обладают более крупными размерами, в связи с чем процентное содержание ДНК в них оказывается пониженным. На рис. 76 приведены данные для непрерывной культуры азотобактера. У других бактерий отмечена такая же зависимость между

скоростью роста и величиной клеток, а также содержанием в них нуклеиновых кислот.

Рассмотренный выше способ проточного культивирования называют «гомогенно-непрерывным», так как состав среды и состояние клеток в культиваторе остаются все время одинаковыми. Существует много других вариантов метода проточных культур. В некоторых из них среда протекает через аппарат,

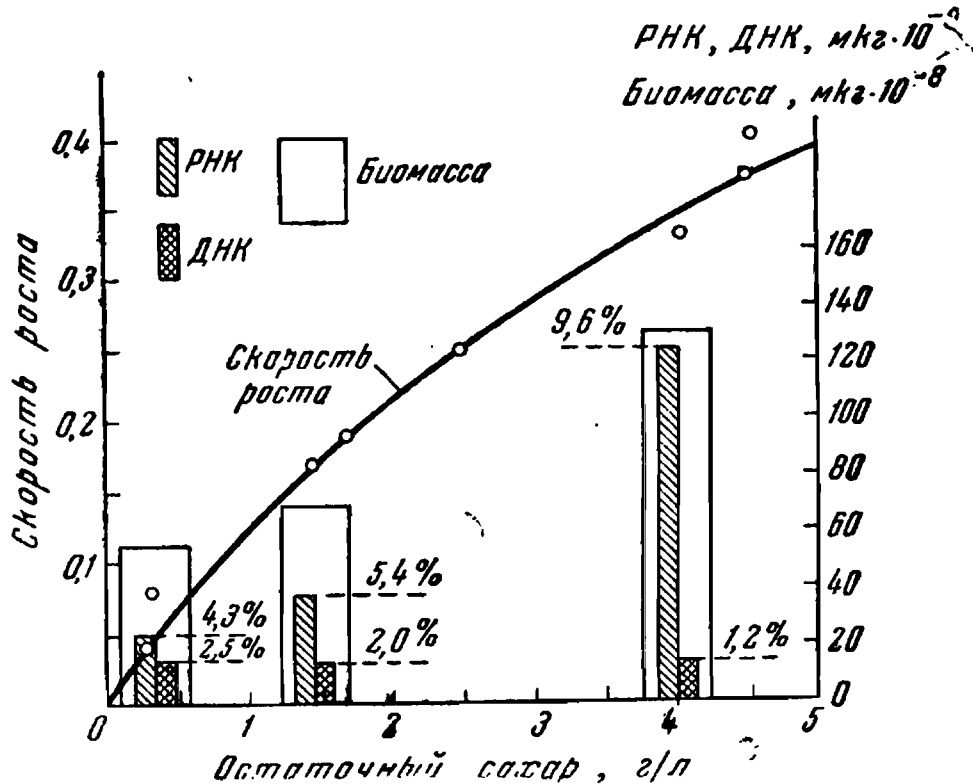


Рис. 76. Удельная скорость роста непрерывной культуры *Azotobacter vinelandii*, средний вес 1 клетки и содержание в ней РНК и ДНК в зависимости от остаточной концентрации сахара. Кривая скорости роста вычислена по формуле: $\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$, где величина $\mu_m = 0,9$ и величина $K_s = 6,5$ г/л. По данным Иерусалимского, Зайцевой и Хмель, 1962

клетки же удерживаются внутри него с помощью фильтров или какими-либо иными средствами, пока их численность не достигнет определенного уровня. Такого рода проточные методы нельзя считать непрерывными. Обычно их называют «проточно-циклическими».

В бродильной промышленности распространены методы «градиентно-непрерывного типа», где процесс ведется в вертикальной колонке, разделенной на секции, или же в батарее последовательно соединенных ферментеров (рис. 77). Батарейный способ непрерывного брожения широко применяется в спиртовой промышленности, а также при производстве пива и шампанских вин. С одного конца в батарею непрерывно поступает свежая среда, с другого конца вытекает готовый продукт. За время прохождения через аппаратуру среда постепенно изме-

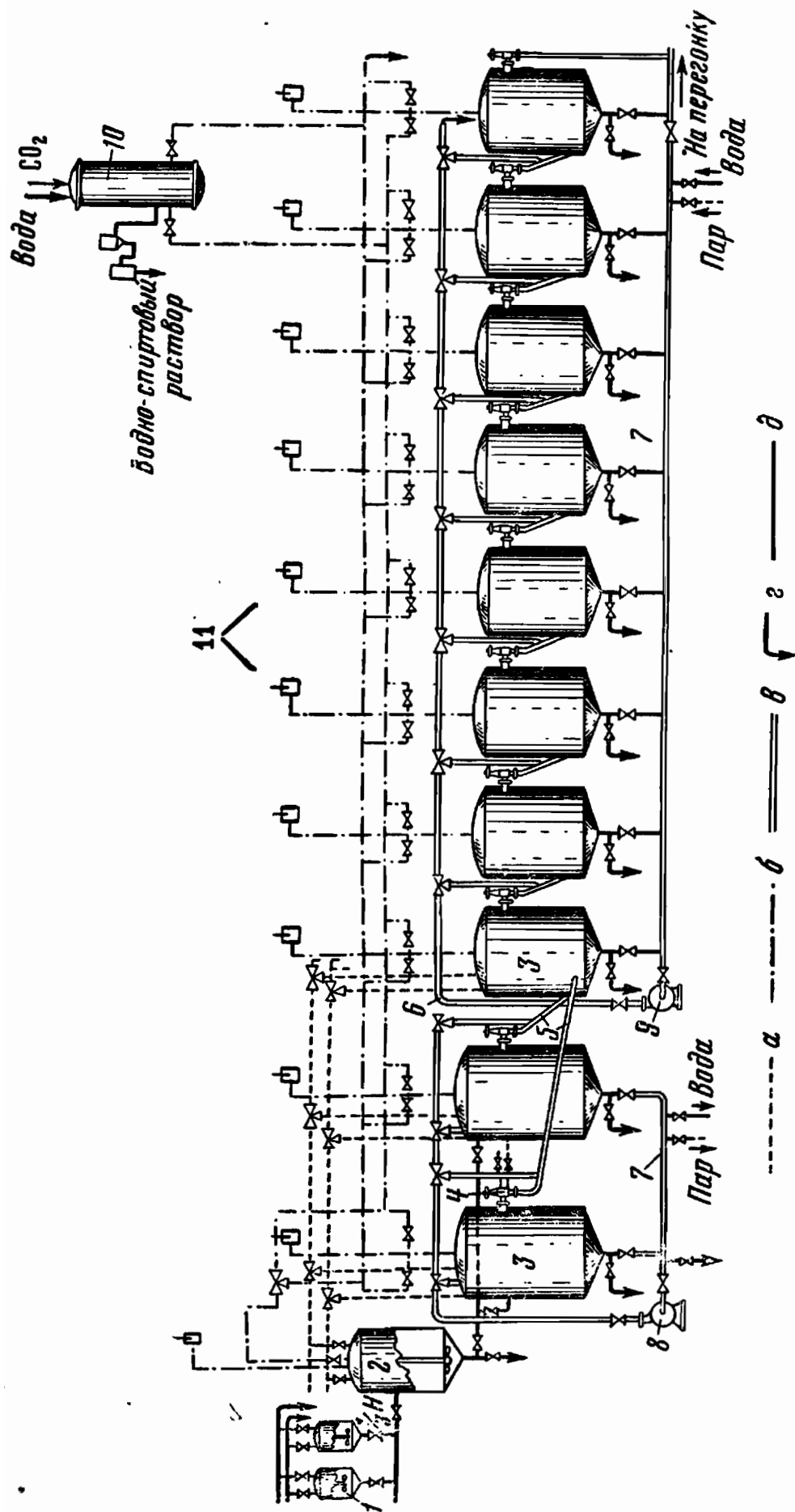


Рис. 77. Схема непрерывного спиртового брожения на крахмалистом сырье в батарее ферментеров
 1 — дрожжанки; 2 — взбраживатель; 3 — бродильные чаны; 4 — дисковые затворы; 5 — перегонная коммуникация; 6—7 — бражна
 коммуникация; 8—9 — насосы; 10 — спиртоловушка; 11 — гидравлические затворы
 а — сусловая коммуникация; б — углекислотно-воздушная коммуникация; в — бражная коммуникация; г — направление в ка-
 нализацию; д — стерильное сусло. По Яровенко, 1960

няется, а взвешенные в ней дрожжевые клетки стареют и даже отмирают к концу своего пути. Поэтому такого рода методы являются непрерывными только с технологической, но не с физиологической точки зрения.

По непрерывному способу производится и спиртовой уксус. Особенность этого способа (называемого «скорым» или «немецким») состоит в том, что основная масса бактерий обитает на поверхности стружек или другой твердой фазы, заполняющей аппарат. По стружкам сверху вниз стекает раствор спирта, который окисляется бактериями в уксусную кислоту.

Влияние внешних факторов на рост микроорганизмов

Рост микроорганизмов характеризуется двумя основными показателями: 1) удельной скоростью и 2) количеством выросшей биомассы («урожаем» культуры). Факторы среды могут по-разному влиять на эти показатели. Например, при умеренном повышении температуры рост культуры ускоряется, но конечный урожай биомассы обычно снижается. Наоборот, изменение концентрации углеводов и других питательных веществ мало влияет на скорость роста культуры (если только эта концентрация не слишком низка), но резко отзывается на величине выросшей биомассы.

Влияние среды на скорость роста. В случае культивирования микробов на непроточных средах удельная скорость роста остается постоянной только в течение довольно короткой экспоненциальной фазы. После ее окончания рост культуры начинает затухать в связи с постепенным изменением состава среды, пока вовсе не прекратится. Непостоянство условий среды мешает определению зависимости между дозировкой внешних факторов и скоростью роста микроорганизмов. Добиться более точных результатов можно путем культивирования микробов на проточных, непрерывно обновляемых средах. (Иерусалимский, 1962).

Рано или поздно в культиваторе наступает состояние равновесия. При этом удельная скорость роста культуры делается численно равной коэффициенту разбавления, что упрощает измерение ее величины. Величина удельной скорости роста, как уже было сказано выше, определяется тем или иным лимитирующим фактором среды: концентрацией одного из питательных веществ, накопившимися продуктами обмена, значением рН культуральной жидкости и пр. Состав культуральной жидкости непостоянен, он зависит от скорости потока. Поэтому содержание лимитирующих факторов должно быть определено путем специальных анализов. Достаточно затем сопоставить данные этих анализов с удельной скоростью роста и интересующая нас зависимость будет найдена.

В 1950 г. Моно (Monod) и независимо от него Новик и Сцилярд (Novick, Scillard, 1950) показали, что между остаточной концентрацией питательного вещества, находящегося в минимуме, и удельной скоростью роста микроорганизмов существует зависимость, которую можно выразить уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_m + S}. \quad (22)$$

В этом уравнении μ_m — предел, к которому стремится μ по мере повышения остаточной концентрации лимитирующего рост вещества S ; K_m — константа, численно равная той концентрации вещества, при которой скорость роста достигает половины предельной:

$$\mu = \frac{\mu_m}{2}.$$

Приведенное уравнение широко используется в энзимологии для характеристики связи между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции. Его применение к целой микробной клетке оправдано в тех случаях, когда «узким местом», от которого зависит скорость роста клетки, является определенная энзиматическая реакция, где участвует данное питательное вещество.

При графическом изображении мы получим гиперболическую кривую, асимптотически приближающуюся к предельной скорости роста μ_m . Примером могут служить данные о зависимости между остаточной концентрацией сахарозы и скоростью роста непрерывной культуры азотобактера (рис. 76).

В других случаях главным фактором, определяющим удельную скорость роста культуры, являются продукты брожения. Накапливаясь в среде, они тормозят последний этап бродильного процесса, а тем самым и всю цепь реакций, которая ведет от сбраживаемого вещества к конечным продуктам. Нашей лабораторией было установлено, что зависимость между продуктами брожения и удельной скоростью роста микробов подчиняется уравнению неконкурентного торможения энзиматических реакций:

$$\mu = \frac{\mu_0 K_p}{K_p + P}, \quad (23)$$

где μ_0 — удельная скорость роста культуры на данной среде при полном отсутствии в ней тормозящих рост продуктов; P — фактическая концентрация этих продуктов; K — константа, численно равная концентрации продуктов, при которой скорости роста замедляется вдвое: $\mu = \frac{\mu_0}{2}$.

На рис. 78 в качестве примера показано влияние продуктов (ацетат+пропионат) на скорость роста непрерывной культуры пропионовокислых бактерий при постоянном рН (около 6,9).

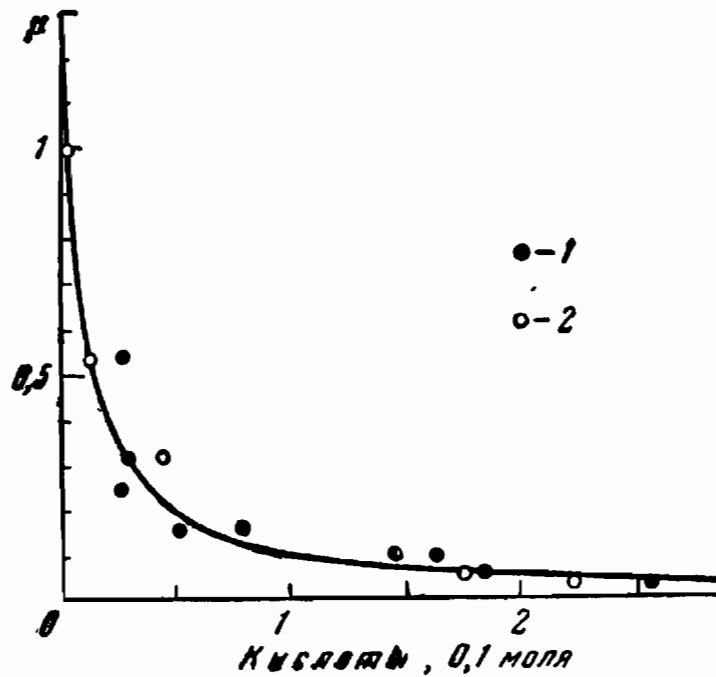


Рис. 78. Зависимость между концентрацией продуктов обмена (ацетат+пропионат) и удельной скоростью роста непрерывной культуры *Propionibacterium shermanii* 1 — концентрация продуктов, найденная путем прямых анализов; 2 — концентрация продуктов, вычисленная по потребленному лактату. Кривая рассчитана по формуле: $\mu = \frac{\mu_0 K_p}{K_p + P}$ (где $\mu_0 = 1,26$ и $K_p = 0,09$ моля) на основании экспериментальных данных М. Н. Нероновой

Что касается рН, то зависимость между его величиной и скоростью роста клетки выражается одновершинной кривой, которую нельзя выразить каким-либо математическим уравнением (рис. 79).

Физиологическая активность и экономический коэффициент. Физиологическая активность измеряется количеством питательных веществ, потребляемых единицей микробной биомассы за единицу времени

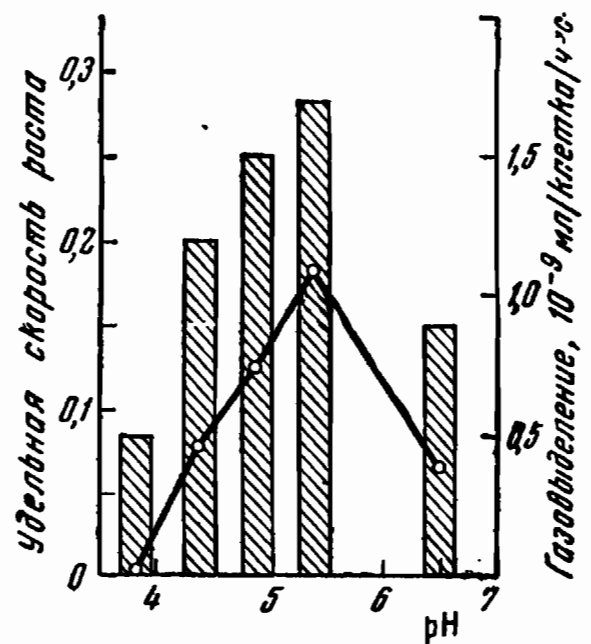


Рис. 79. Влияние рН среды на удельную скорость роста (кривая) и газовыделение (колонки) культуры ацето-бутиловых бактерий. По Иерусалимскому, 1942

(или же количеством образующихся продуктов). В случае работы с возбудителями брожений этот показатель обычно называют «бродильной активностью», а при работе с аэробами — «дыхательной активностью». Последнюю определяют по скорости поглощения кислорода или выделения углекислоты в аппарате Варбурга.

Некоторые микроорганизмы являются продуцентами антибиотиков, витаминов и других физиологически активных веществ. В этих случаях важно бывает оценить их «биосинтетическую активность», т. е. скорость синтеза интересующих нас продуктов в пересчете на единицу микробной биомассы.

Физиологическая активность (q) характеризуется следующими уравнениями:

$$q = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{m}, \quad (24)$$

$$q = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{m}. \quad (25)$$

В этих уравнениях m обозначает вес микробной биомассы, t — время, S — количество потребленных веществ и P — количество образовавшихся продуктов. Соотношения дифференциалов $\frac{dS}{dt}$ и $\frac{dP}{dt}$ выражают скорость потребления питательных веществ и, соответственно, скорость образования продуктов.

Средняя физиологическая активность за какой-то конкретный отрезок времени $t_1—t_0$ вычисляется с помощью следующих формул:

$$q = \frac{S}{(t_1 - t_0) \cdot m_{\text{ср}}}, \quad (26)$$

$$q = \frac{P}{(t_1 - t_0) \cdot m_{\text{ср}}}. \quad (27)$$

где $m_{\text{ср}}$ обозначает среднюю величину микробной биомассы за данный период времени.

Если за время опыта вес микробной биомассы повысится сравнительно мало (не более чем в 2—3 раза), можно пользоваться средним арифметическим из начальной и конечной величин биомассы:

$$m_{\text{ср}} = \frac{m_0 + m_1}{2}. \quad (28)$$

Если же на протяжении опыта культура росла с постоянной скоростью (по экспоненциальному закону) и биомасса ее значительно увеличилась, среднюю величину биомассы вычисляют по следующей формуле:

$$m_{\text{ср}} = \frac{m_1 - m_0}{2,3 (\log m_1 - \log m_0)}. \quad (29)$$

Необходимо подчеркнуть, что физиологическая активность очень непостоянна: она зависит от ряда условий и прежде всего — от скорости роста микроорганизмов. Как известно (гл. 3), организм использует питательные вещества по двум основным назначениям. Часть их служит непосредственно строительным материалом для растущей биомассы или же источником энергии, обеспечивающей ход этих строительно-ростовых процессов. Вторая часть питательных веществ разлагается и окисляется, доставляя энергию на основной обмен, т. е. на поддержание жизнеспособности организма независимо от роста. Материальные и энергетические затраты на нужды биосинтеза варьируют в широких пределах, в связи с изменением темпа роста микробов. Напротив, затраты на основной обмен остаются более или менее постоянными до тех пор, пока клетка не утратит жизнеспособности и не начнет отмирать. Суммарная физиологическая активность (q) складывается из двух названных величин:

$$q = a\mu + b. \quad (30)$$

В этом уравнении μ — удельная скорость роста; a — трофический коэффициент, т. е. затраты питательного вещества на

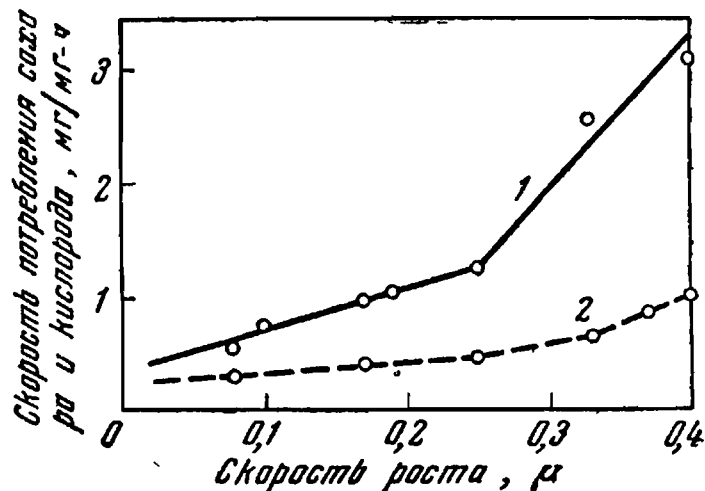


Рис. 80. Связь между удельной скоростью роста и физиологической активностью непрерывной культуры *Azotobacter vinelandii*

1 — интенсивность потребления сахара; 2 — интенсивность поглощения кислорода. По данным Иерусалимского, Зайцевой и Хмель, 1962

образование единицы биомассы; b — коэффициент основного обмена, т. е. расход питательных веществ на поддержание жизни единицы биомассы в течение 1 часа.

При большой скорости роста первый член уравнения во много раз превосходит второй. По мере замедления роста величина его падает. В неразмножающейся культуре член $a\mu=0$, а поэтому $q=b$. В этом случае физиологическая деятельность

микроорганизмов сокращается до того минимума, который необходим для поддержания их жизнеспособности.

Приведем некоторые примеры связи физиологической активности микроорганизмов со скоростью их роста. На рис. 79 показано влияние рН на удельную скорость роста и бродильную активность ацетоно-бутиловых бактерий. Параллельно с замедлением роста понижается и бродильная активность, о которой в данном случае судят по скорости выделения газа. При наиболее низких значениях рН, полностью останавливающих рост бактерий, последние еще проявляют небольшую активность, соответствующую основному обмену.

На рис. 80 приведены данные о физиологической активности клеток азотобактера в условиях непрерывного культивирования. Чем быстрее растут клетки, тем интенсивнее они разлагают сахар и поглощают кислород. Следует обратить внимание, что при ускорении роста соотношение между потреблением кислорода и сахара смещается в сторону последнего, что говорит о более продуктивном использовании его на ассимилятивные нужды. И наоборот, при очень медленном росте большая часть сахара окисляется до углекислоты, так как в этом случае он используется главным образом в качестве источника энергии для основного обмена.

Прирост биомассы (ее «выход») по отношению к потребленному питательному субстрату называют «экономическим коэффициентом» $Y = \frac{dm}{dS}$. Он представляет собой частное от деления скорости роста на физиологическую активность микробов:

$$Y = \frac{\mu}{q} = \frac{1}{a + b/\mu} . \quad (31)$$

Экономический коэффициент очень изменчив, так как зависит от скорости роста. По мере замедления роста и уменьшения μ величина члена $\frac{b}{\mu}$ в знаменателе уравнения (31) возрастает, в связи с чем значение экономического коэффициента уменьшается. Когда рост полностью прекращается и $\mu=0$, дробь $\frac{b}{\mu}$ становится бесконечно большой величиной. При этом условии экономический коэффициент падает до нуля ($Y=0$).

Установить точную зависимость между экономическим коэффициентом и скоростью роста можно лишь в тех случаях, когда последняя держится на постоянном уровне, как это бывает, например, при непрерывном культивировании. При работе же с обычными непроточными культурами, скорость роста которых постепенно убывает, приходится довольствоваться средней величиной экономического коэффициента за весь период развития культуры.

Микробная биомасса достигает своего максимума (M) во время стационарной фазы. Вычтя из нее вес посевного материала (m_0), мы найдем прирост («урожай») биомассы: $M - m_0$. Поделив урожай на количество потребленных питательных веществ, определяют выход биомассы или, другими словами, — средний экономический коэффициент ($Y_{ср}$):

$$Y_{ср} = \frac{M - m_0}{S_0 - S} \quad (32)$$

В этом уравнении S_0 обозначает концентрацию питательного вещества в исходной среде и S — его остаточную концентрацию.

Выход биомассы к потребленному субстрату при непрерывном культивировании вычисляют по следующей формуле:

$$Y = \frac{X}{S_0 - S} \quad (33)$$

Здесь S_0 обозначает концентрацию питательного вещества в поступающей среде и S — его концентрацию в жидкости, выходящей из культиватора наружу. X — содержание микробной биомассы в 1 мл вытекающей наружу жидкости. Так как подаваемая в культиватор среда не содержит клеток, то величина X означает вместе с тем и урожай выросшей биомассы.

Как уже было сказано выше, величина экономического коэффициента весьма непостоянна. Она зависит не только от скорости роста, но и от характера обмена веществ микроорганизмов, химического состава питательной среды, рН, степени аэрации и других условий, которые в процессе развития культуры заметно изменяются. Аэробные организмы более продуктивно используют энергию субстрата. В связи с этим выход биомассы у них может достигать 30—50% по отношению к потребленным углеводам. Анаэробы разлагают питательные вещества не до конца и тратят их более расточительно. Поэтому экономический коэффициент у анаэробов бывает значительно ниже, не превышая в лучшем случае 10—20%.

Влияние питательной среды на урожай биомассы. Микробная биомасса синтезируется не из одного, а из многих питательных веществ, поэтому между составом питательной среды и величиной урожая существует довольно сложная зависимость. Как правило величина выросшей биомассы определяется концентрацией того из питательных веществ, которое находится в относительном минимуме. Если содержание этого вещества в среде будет повышено, роль фактора, лимитирующего величину урожая культуры, перейдет к другому питательному ингредиенту. В этом и состоит «закон минимума» (закон ограничивающих факторов), сформулированный еще в прошлом столетии Ю. Либихом и другими исследователями.

В качестве примера рассмотрим данные Шопфера (Schopfer, 1937) для гриба из рода *Phycomyces*. Этому организму необходим тиамин. В среде, содержащей 2,5 мг аспарагина в качестве источника азота, урожай мицелия возрастает вместе с увеличением дозы тиамина, пока не достигнет своего максимума при 0,05 мг этого витамина. При дальнейшем увеличении дозы тиамина урожай уже не повышается, так как теперь лимитирующим фактором становится аспарагин. Но если количество последнего будет увеличено до 12,5 мг, то и дозу тиамина удастся повысить еще в 4 раза, вызвав этим четырехкратное увеличение веса грибного мицелия. Подобная же картина наблюдается при дальнейшем увеличении содержания аспарагина, а вслед за ним тиамина (табл. 22).

Т а б л и ц а 22

Максимальный урожай мицелия *Phycomyces* в зависимости от дозировки аспарагина и тиамина на 25 мл питательной среды (по Schopfer, 1937)

Аспарагин, мг	Оптимальная доза тиамина, мг	Вес мицелия, вырастающего при оптимальной дозе тиамина, мг	Аспарагин, мг	Оптимальная доза тиамина, мг	Вес мицелия, вырастающего при оптимальной дозе тиамина, мг
2,5	0,05	10	25	0,60	90
12,5	0,20	40	100	1,00	190

По данным таблицы 22, нетрудно заметить, что урожай биомассы более или менее пропорционален концентрации тиамина: на каждый мг тиамина приходится 150—200 мг выросшего мицелия. Что касается аспарагина, то пропорция сохраняется лишь при низких концентрациях последнего (2,5—25 мг). При дальнейшем увеличении количества аспарагина от 25 до 100 мг, т. е. в 4 раза, вес мицелия увеличивается только в 2,1 раза.

Это представляет собой довольно типичное явление: при малых дозах лимитирующего питательного вещества биомасса обычно увеличивается пропорционально его количеству, при повышенных концентрациях этого вещества прирост биомассы начинает отставать. Иногда отставание роста наблюдается при всех дозировках питательного ингредиента. Такого рода зависимость между концентрацией биотина и урожаем клеток была нами обнаружена у *B. idosus* и *B. acetoethylicus* (табл. 23). При десятикратном повышении количества биотина численность бактериальных клеток возрастала только в 1,4—3,5 раза.

Отсутствие пропорциональности между концентрацией питательных веществ и урожаем микробной биомассы может зависеть от разных причин. Иногда причина заключается в угнетающем действии продуктов обмена, содержание которых в среде возрастает вместе с повышением концентрации питательных ве-

Влияние концентрации биотина на урожай бактериальных клеток

Биотин, мкг/л	<i>B. idosus</i>		<i>B. acetoethylcus</i>	
	максимальная численность клеток, $10^8/мл$	соотношение	максимальная численность клеток, $10^8/мл$	соотношение
0,001	29		—	
0,01	103	3,5:1	82	—
0,1	249	2,4:1	185	2,3:1
1,0	756	3,0:1	447	2,4:1
10,0	1048	1,4:1	703	1,6:1

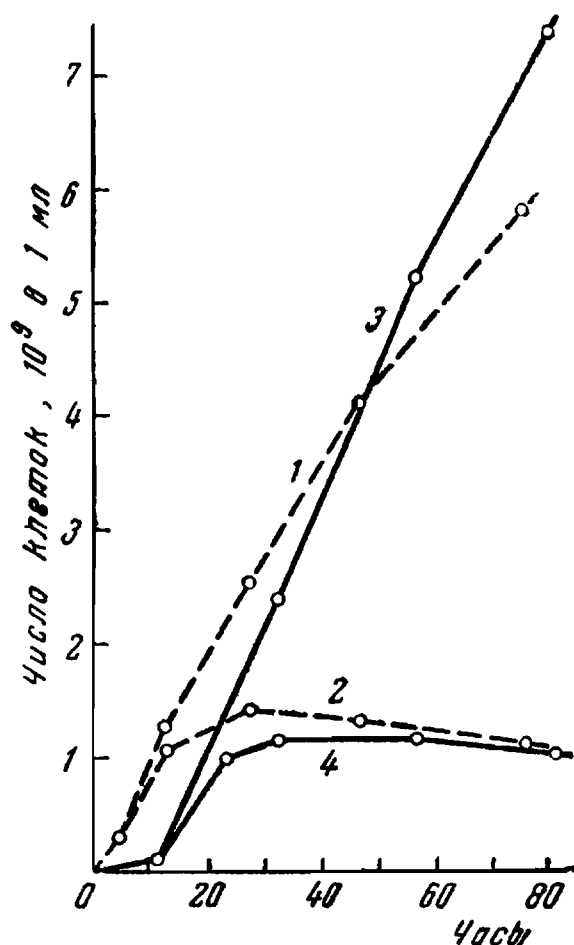
ществ. Вполне понятно, что при таком условии урожай биомассы должен отставать от увеличения количества питательного вещества.

Кроме того, уплотнение клеточной популяции само по себе ведет к ухудшению условий питания, а следовательно, и к торможению роста культуры. Необходимо еще раз напомнить, что питательные вещества поступают к микробной клетке путем диффузии, идущей медленнее скорости их поглощения клеткой. Естественно, что расположенным поодиночке клеткам достается больше питания, чем клеткам, соединенным в цепочки, хлопья или комочки. В результате постоянного «недоедания» рост последних прекращается. Среда, отфильтрованная от культуры, размножение которой приостановилось, может быть вторично использована для выращивания небольшого количества вновь засеянных клеток. Подобные опыты не раз описывались в литературе.

Принимая во внимание эти данные, Байль (Bail, 1924) выдвинул своеобразную теорию предельной численности клеток («концентрации М»), которая,

Рис. 81. Рост двух культур маслянокислых бактерий в коллоидных гильзах, погруженных в проточную среду

1, 3 — общая численность клеток; 2, 4 — численность живых клеток (Иерусалимский, 1959б)



якобы, не может быть превышена. Он полагал, что каждой клетке необходимо определенное «жизненное пространство». Бактерии могут размножаться и после достижения предельной численности. Однако часть клеток при этом отмирает, так что количество живых особей остается все время постоянным. Более «слабым» расам бактерий требуется большее жизненное пространство, более «сильные» довольствуются меньшим пространством. Поэтому в смешанных популяциях «сильные» расы вытесняют «слабые».

С трактовкой автора трудно согласиться. Дело, конечно, не в геометрическом пространстве, как таковом, а в затрудненном притоке питательных веществ и оттоке продуктов обмена при чрезмерном уплотнении бактериальной популяции. Но фактические данные, на которые ссылается автор, имеют место в действительности. В качестве примера на рис. 81 показаны кривые роста двух культур маслянокислых бактерий внутри коллоидных гильз, погруженных в постоянно обновляемую питательную среду. При таких условиях общая численность клеток достигает необычайной величины, которую не удастся получить при обычном способе культивирования. Однако из-за переуплотнения популяции часть клеток вымирает и поэтому количество жизнеспособных бактерий держится на значительно более низком уровне, пока, наконец, не начнет снижаться.

Когда в среде содержатся два однотипных питательных вещества, различающихся по своей усвояемости (например, два разных углевода), может наблюдаться явление вторичного роста, называемое «диауксией» (рис. 82). Сначала бактерии по-

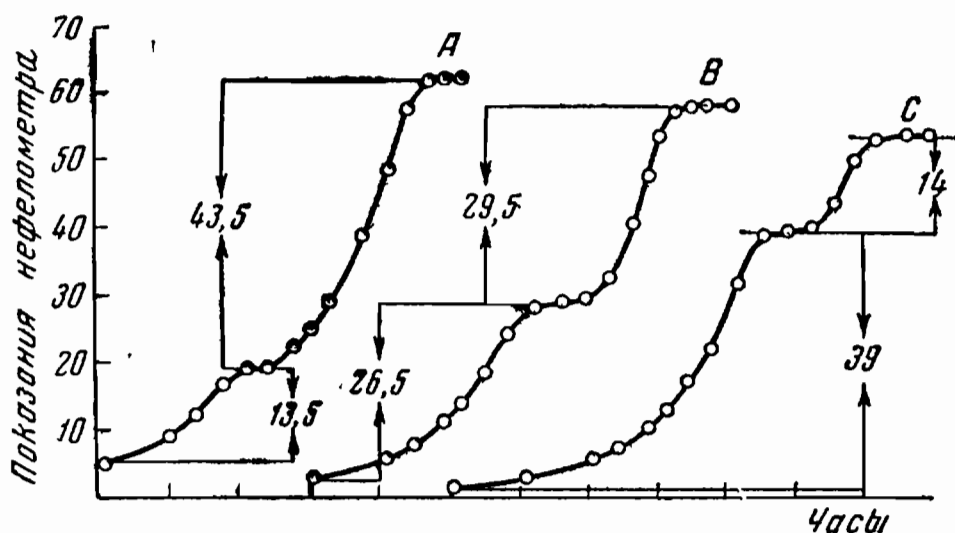


Рис 82. Ступенчатый рост («диауксия») культуры кишечной палочки, связанный с переходом ее от питания глюкозой к питанию сорбитом. Цифры — прирост биомассы (в показаниях нефелометра).

Содержание источников углерода, *мкг/мл* А — глюкозы 50, сорбита 150. В — глюкозы 100, сорбита 100, С — глюкозы 150, сорбита 50 По Мопод 1942

требляют одно питательное вещество и рост их прекращается. Через некоторое время, выработав адаптивный фермент, необходимый для потребления второго вещества, культура возобновляет свой рост.

Наличие прямой зависимости между концентрацией лимитирующих питательных веществ и урожаем биомассы послужило предпосылкой для разработки микробиологических методов определения аминокислот и витаминов (гл. 5).

Влияние условий среды на развитие микроорганизмов

Индивидуальное развитие клетки. О существующих различиях между ростом и развитием было уже сказано в начале этой главы. Если рост выражается в увеличении живой массы организма, то под развитием следует подразумевать протекающие в организме морфологические и физиологические изменения. Ряд структурно-биохимических превращений происходит и в течение индивидуального развития клетки — с момента ее возникновения и до расчленения на две дочерние, причем в каждом клеточном поколении этот цикл изменений повторяется заново (рис. 70).

Индивидуальное развитие вегетативных клеток представляет собой довольно пеструю картину. Важнейшее место в нем принадлежит циклу деления ядра. В клетках высших животных и растений, а также у большинства одноклеточных водорослей и протистов ядра в процессе своего деления претерпевают ряд сложных превращений, называемых «митозом» или «кариокинезом». Только синезеленые водоросли, актиномицеты и бактерии обладают примитивными аналогами ядер, которые делятся амитотически.

Наблюдаются большие различия и в отношении судьбы других клеточных органоидов — жгутиков, ресничек, воротничков, вибрирующих перепонок, панцирей, хромoplastов и пр. У простейших, например, отмечаются два типа клеточного деления. При «метазойном» типе клетка перед делением утрачивает дифференцировки; они создаются заново после обособления клеток. При «протозойном» типе органоиды удваиваются заранее и во время деления поровну распределяются между клетками; последним остается только вырасти до своих нормальных размеров.

Клетки водорослей и истинных бактерий делятся за счет вращения поперечной перегородки, что можно хорошо видеть под электронным микроскопом. Клетки амёб, миксобактерий и микобактерий размножаются путем перешнуровывания, а клетки жгутиковых и спирохет — продольным делением. Большинство дрожжевых организмов размножается почкованием. Почкова-

ние встречается и у актиномицетов, а также у своеобразной группы бактерий — *Caulobacteriales*.

У простейших существует так называемое «синтомическое» деление, при котором ядро многократно делится, а клетка разрастается в крупное плазмодиальное образование. В дальнейшем это многоядерное тело распадается сразу на большое число мелких клеток. Нечто подобное наблюдается у грибов-фиксациентов и актиномицетов. Они образуют многоядерные гифы, которые затем расчленяются на отдельные клетки (оидии, бластоспоры).

Этот беглый и неполный перечень разных случаев индивидуального развития клеток достаточен для того, чтобы судить, насколько разнообразны типы развития клеток.

Жизненные циклы. Наряду с циклами клеточного деления существуют большие жизненные циклы или онтогенезы (Иерусалимский, 1951). Они выражаются в превращении вегетативных клеток в половые гаметы, покоящиеся споры, конидии, подвижные гонидии и прочие формы, завершающие нормальный жизненный цикл. При подходящих условиях эти формы прорастают в вегетативные клетки и онтогенез повторяется заново. Образование упомянутых форм следует считать полезным биологическим приспособлением, позволяющим организму сохранять жизнь в обстановке, неблагоприятной для дальнейшего вегетативного роста и размножения. В одних случаях организм переживает трудное время в виде покоящихся спор или зигот, устойчивых к неблагоприятным условиям; в других случаях он перемещается в новые места обитания, превращаясь в подвижные формы (зооспоры, гонидии) или же разносимые ветром воздушные споры и конидии.

Кроме того, образование половых клеток имеет еще и другое, не менее важное значение: половой процесс способствует перераспределению признаков родителей и образованию более удачных их комбинаций.

Несмотря на все свое биологическое значение, половой процесс не является чем-то обязательным для низших организмов. У многих аспергилловых грибов довольно трудно добиться образования половых органов и скрещивания. Что касается актиномицетов, синезеленых водорослей и бактерий, то у них скрещивание вовсе отсутствует. Следует заметить, что за последние годы генетики увлекаются вопросом о перераспределении (рекомбинации) признаков у бактерий. Сделано много наблюдений, согласно которым при совместном выращивании двух близких рас бактерий появляются клетки, сочетающие в себе свойства обеих рас. Полагают, что бактериальные клетки соединяются между собой и обмениваются кусками хромосом, в которых локализованы соответствующие гены. Однако биологическое значение этого явления остается еще недостаточно ясным.

Оно встречается далеко не у всех видов бактерий (чаще всего у представителей штамма *Escherichia coli* K-12) и происходит лишь у единичных клеток из числа имеющих в популяции. И если даже все, что теперь пишут о гибридизации бактерий, будет безупречно доказано, все-таки это явление нельзя признать за типичное половое скрещивание. Слишком много своеобразных особенностей присуще ему.

Вернемся к более изученным, давно известным жизненным циклам. Как было сказано выше, они не являются чем-то неотвратимым. Поддерживая постоянно благоприятные для роста условия (например с помощью метода проточных культур), можно заставить клетки размножаться вегетативным путем в течение неограниченно долгого времени, на протяжении многих тысяч клеточных генераций. Толчком к превращению клеток в половые или покоящиеся споры служит изменение условий питания, препятствующее их дальнейшему вегетативному росту. Но было бы ошибкой полагать, что для этого достаточно поместить вегетативную клетку в любые неблагоприятные условия. Таким путем легко вызвать ее гибель, но не добиться нормального развития, так как развитие приурочено ко вполне определенному изменению окружающих условий.

В частности, споруляция у дрожжей и бактерий наступает под влиянием недостатка источников углерода или азота, тогда как температура, рН, аэрация и другие факторы среды не должны в это время выходить за пределы оптимума. Гансен еще в прошлом веке установил, что аскоспоры образуются молодыми, хорошо питавшимися дрожжевыми клетками после того, как они попадут в условия голодания. Для получения аскоспор он рекомендовал переносить дрожжевые клетки из питательной среды на поверхность гипсового блочка, погруженного наполовину в воду. По общеизвестному способу Городковой дрожжи выращиваются на агаре с большим количеством органических форм азота (мясная вода, пептон и пр.) и острым недостатком сахара (0,25%). После потребления всего сахара дрожжи приступают к спорообразованию. В дальнейшем был предложен ряд других методов получения аскоспор, основанных на том же принципе перехода от обильного питания к голоданию. Замечено, что стимулирующее влияние оказывают также небольшие концентрации ацетата (0,14%), а в некоторых случаях и спирт.

Причиной спорообразования у некоторых бактерий является исчезновение источников азота, у других — источников углерода. Спорообразование может еще более усиливаться под влиянием небольших количеств продуктов обмена. Такое действие оказывают, например, на ацетоно-бутиловые бактерии 0,03—0,05% бутилового спирта.

Влияние условий среды на спорообразование *Cl. saccharobutyricum*
(по Иерусалимскому и Рукиной, 1956)

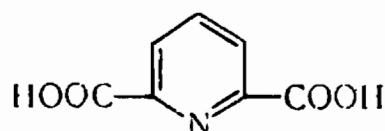
Состав и последовательность сред*	Общее число клеток в отдельных опытах $10^8/мл$	Среднее количество преспор, % к общему числу клеток	Среднее количество зрелых спор	
			% к числу преспор	% к общему числу клеток
П — —	32—62	16	18	3
П Г —	9—12	74	24	18
П Г Вода	8—10	76	52	34
П ГК Вода	10—13	74	74	55

* П — пептоно-глюкозная среда; Г — безазотистая фосфатно-глюкозная среда; ГК — та же среда с добавлением уксусной и масляной кислот (по 0,2%).

В табл. 24 приведены данные нашей лаборатории об условиях спорообразования у маслянокислых бактерий. Культура выращивалась внутри коллодийных гильз, погруженных в проточные среды того или иного состава, причем по мере надобности эти среды можно было заменять другими.

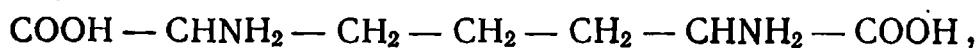
Выяснилось, что для интенсификации спорообразования требуется последовательная смена трех определенных сред. Чтобы приобрести способность к споруляции, маслянокислые бактерии должны развиваться на полноценной питательной среде (П). Для лучшего образования предспоровых форм им необходима среда, лишенная азотного питания (Г). Перевод клеток в условия полного голодания (на водопроводную воду) способствует формированию зрелых спор. Эта заключительная фаза споруляции стимулируется присутствием уксусной и масляной кислот во время предыдущей фазы.

Таким образом, процесс споруляции связан с определенным изменением физиологических потребностей бактерий. Споры отличаются от вегетативных клеток и по своему химическому составу. Они содержат повышенное количество кальция, а поэтому при его недостатке в среде спорообразование тормозится. В спорах обнаруживается от 5 до 15% (к сухому весу) дипиколиновой кислоты, которая в вегетативных клетках отсутствует.



Дипиколиновая (пиридин-2,6-дикарбоновая) кислота.

Чрезвычайно увеличивается в них также содержание α , ϵ -диаминопимелиновой кислоты:



соединенной в виде высокомолекулярных пептидов с другими аминокислотами. Комплексы, которые образуются дипиколиновой кислотой и кальцием с веществами протоплазмы, равно как и уменьшенная влажность, обуславливают пониженную физиологическую активность и повышенную термоустойчивость спор.

При выращивании различных спорообразующих бактерий в особых проточных микрокамерах под контролем микроскопа подтвердилось, что толчком к спорообразованию служит исчезновение из среды источников углерода или азота (Иерусалимский, Рукина, 1959). Когда часть клеток в популяции дойдет уже до состояния проспоров, перевод культуры в условия полного голодания способствует их превращению в зрелые споры, тогда как вегетативные клетки при этом вымирают. И, наоборот, после возвращения смешанной популяции в условия обильного питания, уцелевшие вегетативные клетки возобновляют размножение, в то время как проспоровы, утратившие способность размножаться и лишенные возможности превратиться в споры, погибают. Тем самым подтверждается односторонняя направленность и необратимость процессов развития.

Цикл развития бацилл начинается с прорастания споры и заканчивается образованием подобных же спор. Многие бактерии спор не образуют, но и у них имеется нечто вроде аналогов спор: это — вегетативные клетки с замедленным обменом веществ и повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям.

Наряду с простыми циклами развития, существуют сложные жизненные циклы, состоящие не менее чем из двух разных онтогенезов, чередующихся друг с другом. Сложным циклом развития обладает, например, малярийный плазмодий. Он проходит цикл бесполого размножения в крови человека, а половое размножение — в теле комара. У плесневых грибов онтогенез одного типа завершается копуляцией и образованием зигот, другой же онтогенез заканчивается образованием бесполой репродуктивной формы (конидий, спор, зооспор и пр.), причем этот цикл бесполого размножения может повториться несколько раз, пока снова не наступит половое воспроизведение.

Каждая фаза сложного жизненного цикла приурочена к определенной среде обитания. Поэтому наиболее сложная картина развития наблюдается у патогенных организмов, регулярно меняющих хозяев или же переходящих от сапрофитного образа жизни к паразитарному. Например, паразиты злаков — спорыньевые грибы — из растений попадают в почву и зимуют там в виде склероциев. Весной они прорастают и образуются

коспоры, которые разносятся ветром и снова заражают растения. Другие фитопатогенные организмы — ржавчинные грибы — также обладают разнообразными типами спороношения, образуя пикниды, эцидии, базидии, уредоспоры и телейтоспоры.

Прохождение каждой фазы сложного жизненного цикла связано с изменением условий среды в тех местообитаниях, где эта фаза протекает. В частности, образование воздушных спор у актиномицетов и конидий у плесневых грибов обуславливается подсыханием субстрата, на поверхности которого они развиваются, что влечет за собой затрудненный приток питательных веществ. Такие условия можно воспроизвести искусственно, повышая в среде осмотическое давление и понижая концентрацию питательных веществ, в результате чего гриб образует конидии в погруженной культуре, хотя обычно они появляются только на воздушном мицелии.

Ход развития зеленых водорослей, обитающих в мелких водоемах (конъюгация, формирование зооспор и гамет), приурочен к изменениям условий среды, происходящим на протяжении суток: чередованию освещения и темноты, понижению днем концентрации растворенной углекислоты и азотистых веществ и пр.

Зная зависимость между условиями среды и процессом развития, можно им сознательно управлять. Впервые это было показано Клебсом (1905) более 50 лет тому назад в отношении грибов и водорослей. Создавая надлежащие условия среды, ему удавалось добиться, чтобы эти организмы либо оставались в состоянии вегетативного роста, либо образовывали бесполое формы, либо же, наконец, осуществляли половой процесс. Теория стадийности развития высших растений, согласно которой каждая стадия развития связана с определенным комплексом внешних условий (влажности, температуры, освещения), была разработана в 30-х годах Т. Д. Лысенко (1948). Эта теория имеет общебиологическое значение, с необходимыми поправками на физиологические особенности каждого организма.

Фазы брожений и ферментаций. Говоря о фазах роста микробной культуры, мы упоминали также и о периодах ее развития, которые характеризуются определенным изменением строения, химического состава и физиологической деятельности клеток. Знание возрастной морфо-физиологической изменчивости микробных культур представляет большой практический интерес, поскольку при лабораторных исследованиях и в микробиологических производствах обычно приходится иметь дело не с отдельными микробными особями, а с целыми популяциями, состоящими из многих миллиардов таких особей.

В. Н. Шапошниковым (1939, 1960) было открыто и обстоятельно изучено явление двухфазности бродильных процессов. Первая фаза соответствует периоду молодости культуры, вторая — периоду зрелости. В течение первой фазы происходит

быстрый рост и размножение клеток; причем образуются более окисленные продукты брожения. Вторая фаза начинается с момента замедления роста культуры. Характер бродильного процесса в это время резко изменяется. Вместо окисленных продуктов начинают образовываться более восстановленные соединения. Например, первая фаза ацетоно-бутилового брожения характеризуется преимущественным образованием масляной и уксусной кислот, тогда как во время второй фазы в среде накапливаются нейтральные продукты (бутиловый спирт и ацетон). При этом кислотность среды падает, так как ранее образовавшиеся кислоты перерабатываются в нейтральные соединения (рис. 83). Изменяется и состав выделяющихся газов: соотношение между водородом и углекислотой смещается в сторону последней. Подобный же сдвиг в соотношении кислых и нейтральных продуктов наблюдается при ацетоно-этиловом и бутиленгликолевом брожениях.

Во время первой фазы других бродильных процессов преобладает уксусная кислота, а при наступлении второй фазы усиливается образование более высокомолекулярных кислот: у

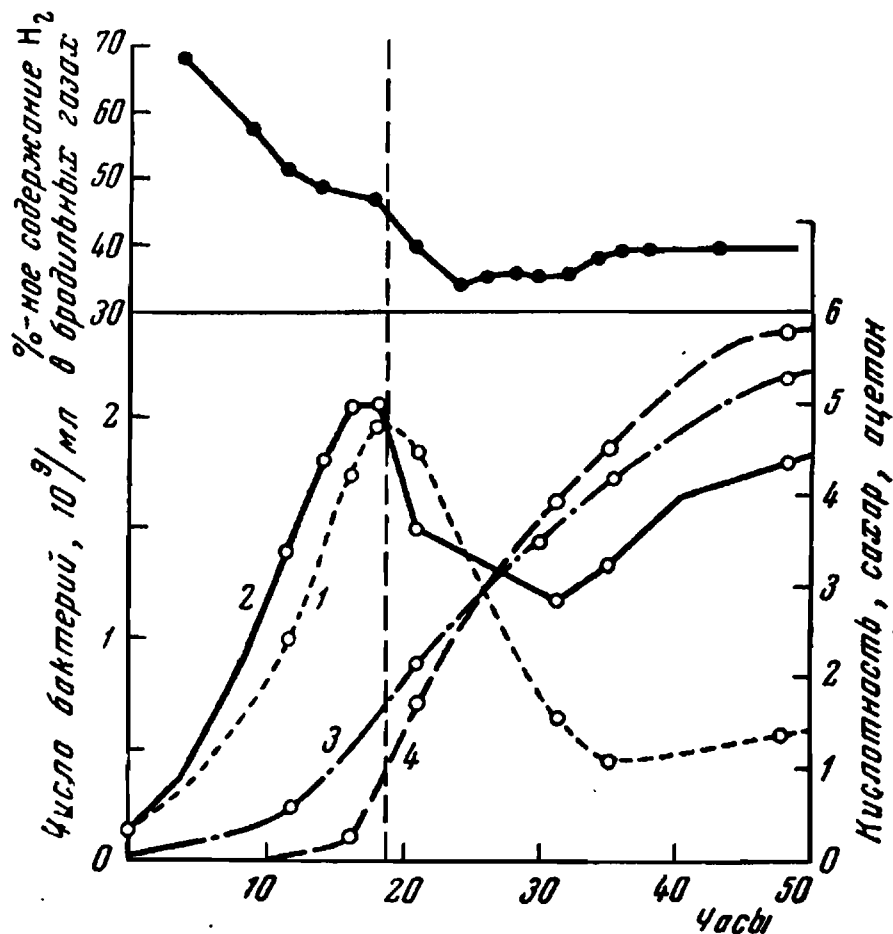


Рис. 83. Ход развития культуры ацетоно-бутиловых бактерий. Первая и вторая фазы брожения разграничены вертикальной пунктирной линией

1 — число бактерий; 2 — кислотность, мл 0,1 н. NaOH на 10 мл среды; 3 — количество сброженного сахара, г/100 мл; 4 — накопление ацетона, г/л. По Бехтеревой и Иерусалимскому, 1936

гетероферментативных молочнокислых бактерий — молочной кислоты, у пропионовокислых — пропионовой, у маслянокислых — масляной.

При спиртовом и гомоферментативном молочнокислом брожении изменения состава продуктов не наблюдаются — эти брожения имеют однофазный характер.

Двухфазность наблюдается также при процессах биосинтеза антибиотиков или, как их часто называют, — процессах ферментации (Woodruff, 1961). В течение первой фазы происходит быстрый рост грибного или актиномицетного мицелия, но антибиотики образуются лишь в небольших количествах. Они накапливаются главным образом с того момента, когда рост культуры начинает затухать. Можно различать еще третью фазу ферментации, которая выражается в постепенном отмирании мицелия и частичном разрушении ранее накопившихся антибиотиков.

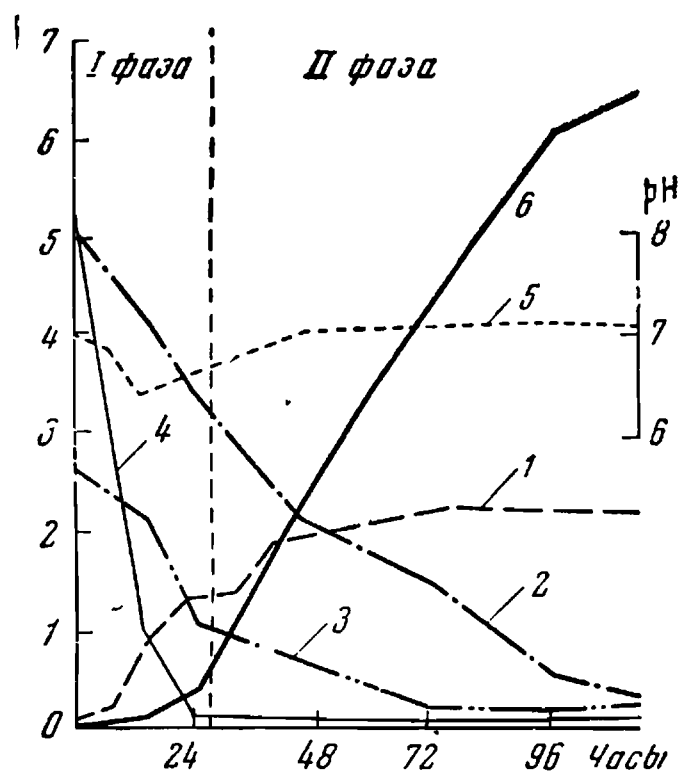


Рис 84. Ход развития культуры *Actinomyces rimosus*

1 — сухой вес мицелия, 2 — остаточная концентрация углеводов, 3 — содержание в среде аммонийного азота; 4 — содержание в среде минерального фосфора; 5 — значение pH, 6 — накопление окситетрациклина. Величина одной единицы измерения на оси ординат для окситетрациклина — 0,3 г/л, для мицелия 3 г/л; для углеводов — 5 г/л, для аммонийного азота — 0,4 г/л; для фосфора — 10 мг/л. Вторая фаза наступает после потребления основной массы фосфатов По Зайцевой и Орловой, 1959

Эта фаза соответствует периоду старости культуры. Двухфазный характер имеют, например, процессы образования пенициллина, стрептомицина, хлортетрациклина (ауреомицина), тетраамицина и ряда других антибиотиков (рис. 84). Но у некоторых актиномицетов (например, *Act. lavendulae*) на определенных средах антибиотики образуются более или менее равномерно в течение всего развития культуры и, следовательно, двухфазность здесь отсутствует (Бехтерева, Кошелева и Хржановская, 1959).

Двухфазность отмечается и при биосинтезе рибофлавина культурой *Eremothecium ashbyii* (рис. 85). Во время первой фазы (до 5-го дня) указанный витамин накапливается главным образом внутри клеток. После этого в культуре появляются отмирающие клетки, суммарная дыхательная активность мицелия падает и витамин начинает выде-

ляться в среду. Особенно усиливается его выделение с 10-го дня, когда между ростом и отмиранием устанавливается равновесие и общий вес мицелия перестает повышаться.

Практически ценные продукты накапливаются главным образом во время второй фазы. Поэтому для производственных целей очень важно знать условия, способствующие переходу

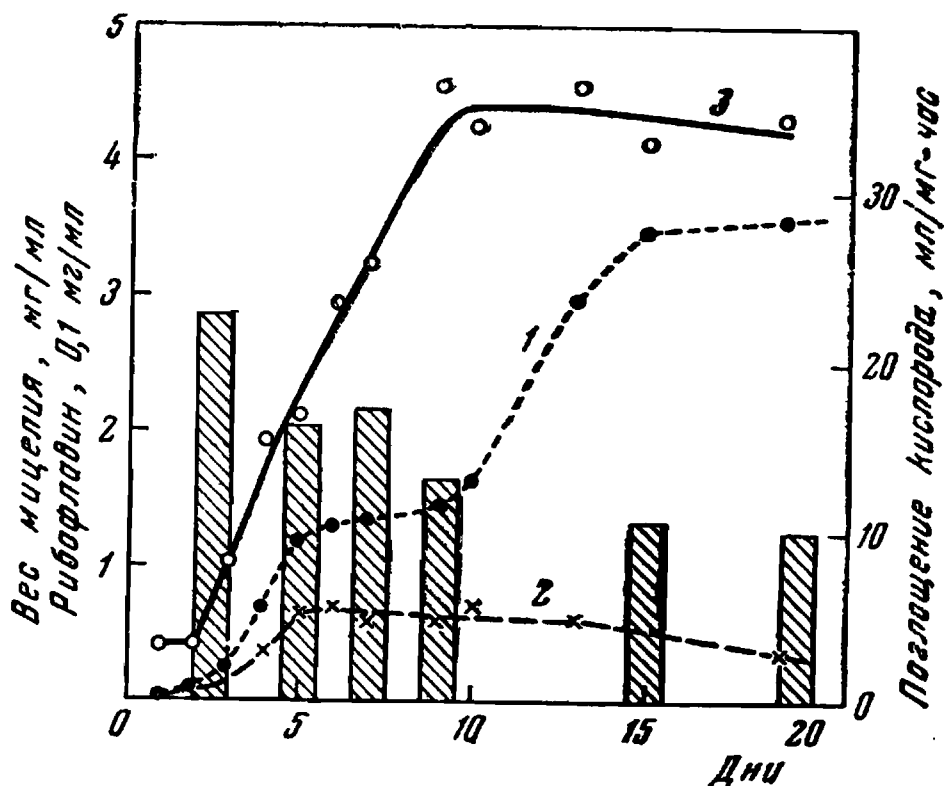


Рис. 85. Ход развития культуры *Erenothecium ashbyii*

1 — общее количество образовавшегося рибофлавина; 2 — рибофлавин в мицелии; 3 — сухой вес мицелия. Колонки показывают интенсивность поглощения кислорода. График составлен по данным Диканской (1954, табл. 1 и 4)

процесса во вторую фазу. При отсутствии необходимых условий вторая фаза может вовсе не наступить. Например, культура грибов-пенициллов нормально растет и развивается, но не синтезирует пенициллин, если рН среды держится на слишком низком уровне (ниже 6,0—6,5). При избытке легко усвояемых азотистых веществ ацетобутиловые бактерии не образуют ацетона; культура перестает развиваться из-за сильного подкисления среды раньше, чем наступит вторая фаза брожения.

Причины изменения характера жизнедеятельности культуры в процессе ее развития могут быть весьма различными. Иногда после потребления запасов исходного субстрата микробы начинают окислять продукты собственного обмена, накопившиеся в среде. При избытке спирта уксуснокислые бактерии образуют уксусную кислоту, когда же спирт израсходуется, они начинают ее окислять до углекислоты. Так же поступают аспер-

гилловые грибы с образованной ими самими лимонной кислотой, после того как в среде иссякнут запасы углеводов. Пленчатые дрожжи из рода *Hansenula* при избытке сахара накапливают спирт и летучие кислоты, а израсходовав его, принимаются за окисление этих продуктов (рис. 86).

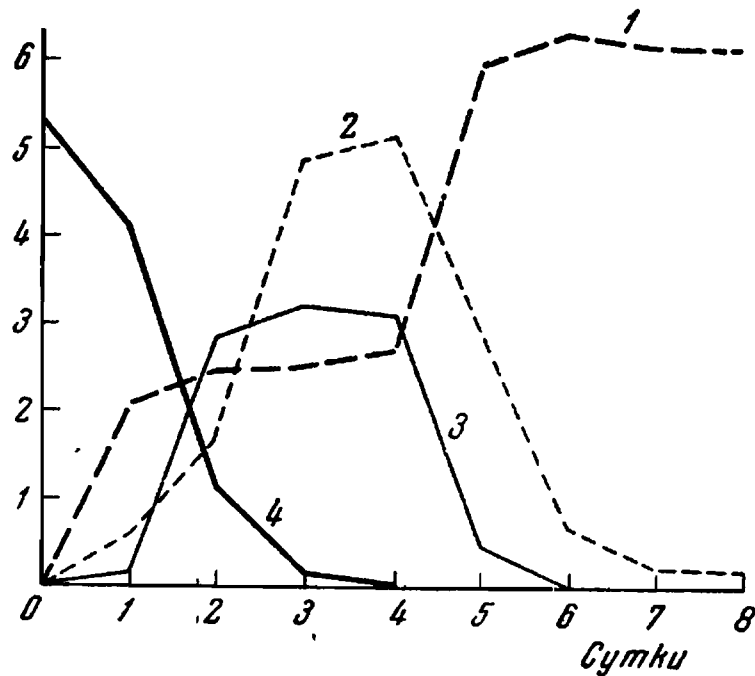


Рис. 86. Ход развития культуры дрожжей *Hansenula anomala*

1 — вес биомассы культуры, г/л; 2 — летучие кислоты, г/л; 3 — летучие средние эфиры, г/л, 4 — глюкоза, г/100 мл. По Герасимовой, 1958

В других случаях наступление второй фазы обуславливается подкислением среды. Например, во время первой фазы ацетоно-этилового брожения, когда потреблено не более 10—15 г/л углеводов, выход образовавшегося ацетона к сброженным углеводам не превышает 5%. Лишь после того, как будет сброжено 50—60 г/л углеводов, выход ацетона возрастет до 11—14%. Но если мы внесем в исходную среду ацетатный буфер с рН 5,5—6,0, то ацетон будет образовываться с полной интенсивностью с самого начала процесса. Таким образом, брожение начнется сразу со второй фазы.

В перечисленных выше случаях бродильный процесс меняет свое направление только потому, что изменяются условия среды. Если при этом вторая фаза брожения и совпадает во времени с периодом зрелости культуры, то она не связана с ним причинной зависимостью.

Но часто сдвиги обмена веществ, характерные для второй фазы брожения, зависят от возрастной физиологической изменчивости клеток. Следует напомнить, что метаболизм складывается из сопряженных окислительно-восстановительных реак-

ций, в итоге которых часть промежуточных продуктов окисляется и выделяется наружу, а отщепившийся от них водород идет на восстановление других промежуточных соединений, служащих строительным материалом для веществ протоплазмы. Когда по каким-либо причинам рост клеток замедляется и биосинтетические процессы ослабевают, остается неиспользованный водород, который в этом случае связывается с продуктами

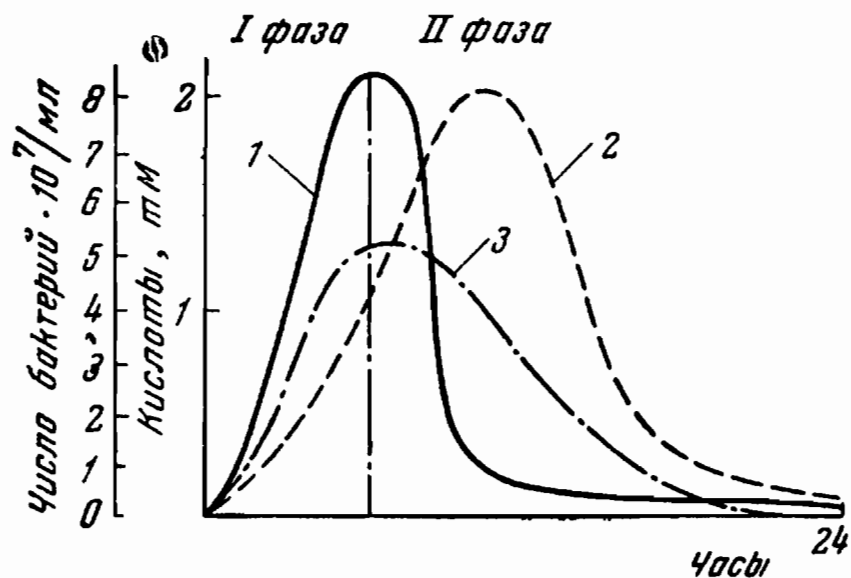


Рис. 87. Гетероферментативное молочнокислое брожение. Скорости образования:

1 — уксусной, 2 — молочной кислоты, 3 — скорость размножения бактерий. По Шапошникову, 1960

обмена, выделяемыми в среду. В результате этого среди продуктов обмена появляются более восстановленные химические соединения, которые в период быстрого роста отсутствовали. В качестве примера на рис. 87 приведены данные для гетероферментативных молочнокислых бактерий. Кривые образования уксусной кислоты и скорости роста бактерий идут параллельно. Но молочная кислота — соединение, более восстановленное, чем уксусная, — начинает интенсивно образовываться только во время второй фазы брожения, когда рост культуры ослабевает.

Близкая картина наблюдается при пропионовокислом и маслянокислом брожениях.

Биосинтез многих антибиотиков связан с диссимилятивными процессами, развертывающимися в грибном или актиномицетном мицелии во время замедления его роста. В подобных случаях вторая фаза антибиотической ферментации может наступить только в период физиологической зрелости культуры, когда рост последней затухает.

Однако обратная зависимость не всегда имеет место. При отсутствии необходимых для этого условий антибиотики не об-

разуются, несмотря на нормальное развитие мицелия. Очевидно, физиологические процессы, обуславливающие прохождение цикла развития отличаются от тех, которые ведут к биосинтезу антибиотиков. Таким образом, понятие «физиологическое созревание мицелия» может иметь разный смысл.

Подобно этому вторая фаза ацетоно-бутилового брожения определяется, с одной стороны, условиями среды и, с другой стороны, физиологическим состоянием клеток. Для наступления второй фазы этого брожения, которая характеризуется образованием ацетона и потреблением накопившихся ранее кислот, необходимо подкисление среды. В присутствии мела или других нейтрализующих средств вторая фаза резко подавляется. Влияние рН на жизнедеятельность физиологически зрелой культуры *Cl. acetobutylicum* было показано на рис. 79.

Способность осуществлять вторую фазу брожения возникает у этих бактерий не сразу. При прочих равных условиях, молодая, быстро растущая культура (через 4 часа после посева) образует в 6—14 раз меньше ацетона, чем физиологически зрелая культура, возраст которой достиг 18—28 часов (см. табл. 25).

Таблица 25

Интенсивность образования ацетона молодой и зрелой культурой *Cl. acetobutylicum* (Иерусалимский, 1942)

Возраст культуры, часы	Соотношение между образовавшимся ацетоном (мг) и выделенным газом (мл) в острых опытах при рН					
	4	4,5	5	5,5	6	6,5
4	0,08	0,06	0,04	0,03	0,025	0,015
18—28	0,51	0,44	0,36	0,30	0,25	0,21

Напрашивается вывод о том, что способность осуществлять вторую фазу брожения связана с определенным изменением ферментного аппарата («энзиматической конституции») клеток в процессе их роста и развития. И действительно, по данным Дэвиса (Davies, 1942), физиологически зрелые клетки *Cl. acetobutylicum* содержат повышенные количества фермента, декарбоксилирующего ацетоуксусную кислоту с образованием ацетона. Ацетоуксусная кислота в свою очередь образуется путем конденсации молекул уксусной кислоты, чем и объясняется потребление последней:



Приобретение бактериями указанной способности зависит от условий среды, при которых они развиваются в период своей

молодости. В частности, избыток легко усвояемого азотного питания усиливает рост, но задерживает физиологическое созревание бактерий. Поэтому при близких значениях рН и одинаковых количествах сброженных углеводов «перекормленная» культура образует меньше ацетона, чем культура, выращенная в условиях азотного голодания (рис. 88).

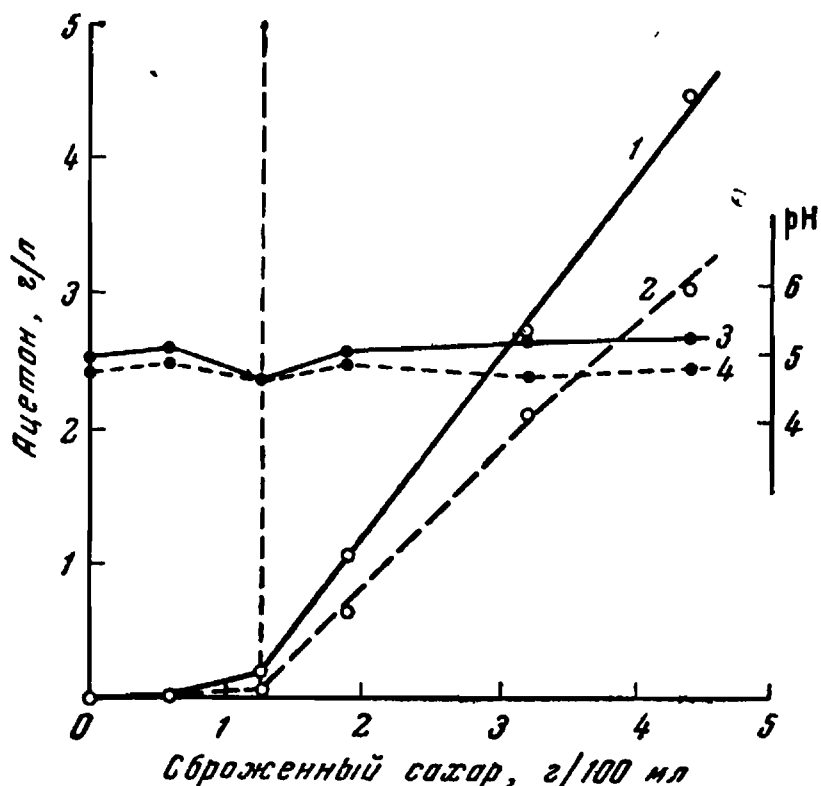


Рис. 88. Влияние азотного питания на образование ацетона культурой *Cl. acetobutylicum* на синтетической среде. Пунктир — граница между I и II фазами брожения

Выход ацетона: 1 — среда с 0,25% триптического гидролизата в качестве источника азота; 2 — среда с 1% того же источника азота. рН, 3 — среда с 25% триптического гидролизата, 4 — среда с 1% того же источника азота
По Иерусалимскому, 1946

* * *

В качестве важнейшего вывода из всего вышеизложенного, необходимо указать на то мощное влияние, которое оказывают условия питания на рост, развитие и биохимическую деятельность микробных клеток. Главный метод микробиологии — это выращивание клеток в виде чистых культур при точно контролируемых условиях среды. Область применения этого метода все более расширяется. Наряду с обычными микробиологическими объектами — бактериями, актиномицетами и дрожжами — по такому способу стали теперь выращиваться протисты, водоросли, грибы и даже тканевые клетки высших животных и растений. Применение проточных и сменных сред, использование приборов, автоматически регулирующих параметры процес-

сов, равно как и другие достижения исследовательской техники, позволяют в настоящее время более точно и надежно устанавливать зависимость между конкретными условиями среды и теми или иными сторонами жизнедеятельности клеток. Такого рода физиологический анализ дает нам в руки ключ к управлению их ростом, развитием и обменом веществ. Поддерживая надлежащие условия культивирования, мы можем регулировать ход бродильных и ферментационных процессов, накапливать микробную биомассу с заданными свойствами, выращивать тканевые клетки высших организмов в качестве материала для получения гормонов, алкалоидов или белка. Зная физиологические потребности микроорганизмов, можно в известной степени воздействовать и на ход микробиологических процессов в естественной обстановке — в почве, залежах нефти, организме высших животных и растений.

Таково значение физиологии микробов — науки о закономерностях жизненных процессов у микроорганизмов и об управлении этими процессами на пользу человека, науки, которая уже перерастает свои рамки, передавая некоторые общие принципы другим биологическим наукам, интересующимся культивированием тканевых клеток более сложных организмов.

ЛИТЕРАТУРА

- Энгельс Ф. Диалектика природы М, Госполитиздат, 1953а
Энгельс Ф. Анти-Дюринг. М, Госполитиздат, 1953б
Адаптация у микроорганизмов. Сб. докладов. М., ИЛ., 1956.
Анатомия бактерий. Сб. статей. М., Медгиз, 1960.
Беккер З. Э. Физиология грибов и их практическое использование. М., Изд-во МГУ, 1963
Белозерский А. Н. Нуклеиновые кислоты. М., Изд-во «Знание», 1961.
Белозерский А. Н. и Спирин А. С. Состав нуклеиновых кислот и систематика.—Известия АН СССР, серия биол., 50, 1960
Бехтерева М. Н. и Иерусалимский Н. Д. Динамика и баланс ацетоно-бутилового брожения.—Микробиология, 5, № 6, 1936
Бехтерева М. Н., Кошелева Н. А. и Хржановская В. Э. Физиологические особенности *Act. lavendulae* в связи с условиями культивирования.—Труды Ин-та микробиологии АН СССР, № 6, 1959.
Вагнер Р. и Митчелл Г. Генетика и обмен веществ. М., ИЛ., 1958.
Виноградский С. Н. Микробиология почвы. М., Изд-во АН СССР, 1952.
Возникновение жизни на земле.—Труды Междунар. симпозиума. М., Изд-во АН СССР, 1959.
Вуллс Д. Учение об антиметаболитах. М., ИЛ, 1954.
Галаджиев М. А. К проблеме бессмертия простейших.—Известия АН СССР, VII серия, 1932.
Герасимова Н. М. Образование продуктов углеводного обмена дрожжами рода *Hansenula*.—Микробиология, 27, № 6, 1958
Губарев Е. М. Основные процессы обмена веществ у микробов. М., Медгиз, 1961.
Диканская Э. М. Образование рибофлавина микроскопическим грибом *Eremothecium ashbyii*.—Труды Ин-та микробиологии АН СССР, № 3, 1954.
Живая клетка. Сб статей. М., ИЛ, 1962.
Зайцева З. М. и Орлова Н. В. Изучение условий образования окситетрациклина (террамицина) культурой *Act. rimosus* ЛС-Т-118.—Микробиология, 28, № 2, 1959.
Зайцева Г. Н., Хмель И. А. и Белозерский А. Н. Биохимические изменения в синхронной культуре *Azotobacter vinelandii*.—Докл. АН СССР, 141, № 3, 1961.
Иерусалимский Н. Д. Исследования по физиологии обмена веществ *Cl. acetobutylicum*. Сообщ. II.—Микробиология, 11, № 5—6, 1942
Иерусалимский Н. Д. О физиологических стадиях в развитии бактерий.—Микробиология, 15, № 5, 1946
Иерусалимский Н. Д. Азотное и витаминное питание микробов. М., Изд-во АН СССР, 1949.
Иерусалимский Н. Д. Проблема онтогенеза бактерий и пути к ее разрешению.—Труды Ин-та микробиологии АН СССР, № 1, 1951.
Иерусалимский Н. Д. Исследования по повышению ядоустойчивости некоторых спорообразующих бактерий. В сб.: «Наследственность и изменчивость растений, животных и микроорганизмов». 1, М., Изд-во АН СССР, 1959а.

- Иерусалимский Н. Д. О закономерностях роста и развития микроорганизмов.— Труды Ин-та микробиологии АН СССР, № 6, 1959.
- Иерусалимский Н. Д. Применение метода непрерывных культур для физиологического исследования клеток микробов и других организмов.— Известия АН СССР, серия биол., № 3, 1962.
- Иерусалимский Н. Д., Гришанкова Е. В. и Шевченко Л. А. Изменение физиологических потребностей *Vac. idosus* под влиянием стрептомицина.— Микробиология, 31, № 6, 1962.
- Иерусалимский Н. Д., Зайцева Г. Н. и Хмель И. А. Изучение физиологии *Azotobacter vinelandii* в условиях проточной культуры.— Микробиология, 31, № 3, 1962.
- Иерусалимский Н. Д. и Рукина Е. А. Исследование условий спорообразования у маслянокислых бактерий с помощью коллодийных гильз.— Микробиология, 25, № 6, 1956.
- Иерусалимский Н. Д. и Рукина Е. А. Изучение условий спорообразования у бактерий методом проточных микрокультур.— Микробиология, 28, № 6, 1959.
- Иерусалимский Н. Д. и Шафоростова Л. Д. Изменения биосинтеза витамина В₁₂ и ПАБК у *Vac megaterium* под влиянием адаптации к норсульфазолу.— Докл. АН СССР, 142, № 5, 1962.
- Имшенецкий А. А. Микробиология целлюлозы. М., Изд-во АН СССР, 1953.
- Исаченко Б. Л. Избранные труды, т. I и II. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1951.
- Клебс Г. Произвольное изменение растительных форм. М., 1905.
- Клюйвер А. и Ван-Ниль К. Вклад микробов в биологию. М., ИЛ, 1959.
- Костычев С. П. Новые течения в микробиологии и учении о брожениях.— Успехи биол химии, вып. 8, 1930.
- Красильников Н. А. Антагонизм микробов и антибиотические вещества. М., Изд-во «Советская наука», 1958.
- Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М., Изд-во «Высшая школа», 1961.
- Кудрявцев В. И. К проблеме вида у микроорганизмов.— Труды Ин-та микробиологии АН СССР, № 1, 1951.
- Кузнецов С. И., Иванов М. В. и Ляликова Н. Н. Введение в геологическую микробиологию. М., Изд-во АН СССР, 1962.
- Лысенко Т. Д. Теоретические основы яровизации. В сб.: «Агробиология», М., ОГИЗ — Сельхозгиз, 1948.
- Мейсель М. Н. Функциональная морфология дрожжевых организмов. Изд-во АН СССР, 1950.
- Мейсель М. Н. О биологическом действии ионизирующих излучений на микроорганизмы. В сб.: «Действие облучения на организм». М., Изд-во АН СССР, 1955.
- Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот. Сб. статей. М., ИЛ, 1954.
- Мишустин Е. Н. Микроорганизмы и плодородие почвы. М., Изд-во АН СССР, 1956.
- Надсон Г. А. Экспериментальная изменчивость наследственных свойств микроорганизмов. М., Изд-во АН СССР, 1935.
- Надсон Г. А. и Филиппов Г. С. О влиянии рентгеновских лучей на половой процесс и образование мутантов у низших грибов.— Вестник рентгенологии и радиологии, 3, № 6, 1925.
- Непрерывное брожение и выращивание микроорганизмов. Труды совещания. М., Пищепромиздат, 1960.
- Одинцова Е. Н. Микробиологические методы определения витаминов. М., Изд-во АН СССР, 1959.
- Омелянский В. Л. Избранные труды, т. I и II. М., Изд-во АН СССР, 1953.
- Онтогенез вирусов. Сб. статей. М., ИЛ, 1956.
- Опарин А. И. Возникновение жизни на Земле. М., Изд-во АН СССР, 1957.

- Орлова Н. В. Образование ацетона и 2,3-бутиленгликоля культурой *Aerobacter aerogenes* — Микробиология, 19, № 4, 1950
- Пастер Л. Исследования о брожениях. ОГИЗ — Сельхозгиз. М.—Л., 1937.
- Пинаева Г. В. Приспособительная изменчивость ацетон-бутиловых бактерий в условиях непрерывного размножения.— Известия АН СССР, серия биол., 4, 1957.
- Работнова И. Л. Роль физико-химических условий (рН и гН₂) в жизнедеятельности микроорганизмов. М., Изд-во АН СССР, 1957.
- Рубан Е. Л. Физиология и биохимия нитрифицирующих микроорганизмов. М., Изд-во АН СССР, 1961.
- Сеченов И. М. Растительные акты в животной жизни — Медиц. вестник, № 26, 1861.
- Скорородов Л. Я. Материалы по истории медицинской микробиологии в дореволюционной России М., Медгиз, 1948
- Смит О. Л. Витамин В₁₂. М., ИЛ, 1962.
- Таусон В. О. Основные положения растительной биоэнергетики. М.—Л., Изд-во АН СССР, 1950.
- Тимирязев К. А. Луи Пастер — Избранные сочинения, т. II. М., Сельхозгиз, 1948.
- Тимирязев К. А. Основные задачи физиологии растений. Там же.
- Шапошников В. Н. Задачи микробиологии в интенсификации бродильных производств.— Микробиология, 8, № 3—4, 1939
- Шапошников В. Н. Техническая микробиология. М., Изд-во «Советская наука», 1948.
- Шапошников В. Н. Физиология обмена веществ микроорганизмов в связи с эволюцией функций. М., Изд-во АН СССР, 1960.
- Шмальгаузен И. И. Определение основных понятий и методика исследования роста. В сб.: «Рост животных». М.—Л., Изд-во биол. и мед. лит-ры, 1935
- Яровенко В. Л. Поточный метод брожения при производстве спирта из крахмалистого сырья. В сб.: «Непрерывное брожение и выращивание микроорганизмов». М., 1960.
- Vail O. Untersuchungen über die M-Konzentration von Bakterien und Bakteriophagen.— Arch. Hyg., 94, 1924.
- Bradley D. E. and Williams D. J. An electron microscope study of the spores of some species of the genus *Bacillus* using carbon replicas — J. Gen., Microbiol., 17, 1957.
- Buchner E., Buchner H. und Hahn M. Die Zymasegärung. Untersuchungen über den Inhalt der Hefezellen und die biologische Seite des Gärungsproblems. München, 1903.
- Chapman G. B. Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria.— J. Bacteriol., 71, 1956.
- Chapman G. B. and Hillier J. Electron microscopy of ultra-thin sections of bacteria.— J. Bacteriol., 66, 1953.
- Clifton C. E. Introduction to bacterial physiology. Mc. Graw-Hill Book Co, N. Y.—London, 1957.
- Davies R. Studies on the acetone-butyl alcohol fermentation.— Biochem. J., 36, N 7—9, 1942.
- Davis B. D. Studies of nutritionally deficient bacterial mutants isolated by means of penicillin.— Experientia, 6, 1950.
- Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Chemotherapie.— Ber. Deutsch. chem. Ges., 42, 1909.
- Gale E. F. Enzymes concerned in the primary utilization of amino-acids by bacteria.— Bacteriol. Rev., 4, 1940.
- Gale E. F. Enzymic activities of bacteria.— Bacteriol. Rev., 7, N 3, 1943.
- Hawker L. E., Linton A. H., Folkes B. F. and Carlile M. J. An introduction to the biology of microorganisms. London, 1960
- Herbert D. The chemical composition of microorganisms as a function of their environment — Sympos. Soc. gen Microbiol., XI Cambridge, 1961.

- Karström A. Enzymatische Adaptation bei Microorganismen.—*Ergebn. Enzymforsch.*, 7, 1930.
- Kögl F., Tönnis B. Über das Bios-Problem. Darstellung von krystallisierten Biotin aus Eigelb.—*Z. phys. Chem.*, 242, 1936.
- Kohn H. J., Harris J. S. Methionine made an essential growth factor by cultivation of *E. coli* in the presence of methionine and sulfanilamide.—*J. Bacteriol.*, 44, N 6, 1942.
- Lwoff A., Lwoff M. Studies on codehydrogenases.—*Proc. Roy. Soc., Ser. B.* 122, 1937a.
- Lwoff A., Lwoff M. Rôle physiologique de l'hémine pour *Haem. influenzae Pfeiffer*.—*Ann. Inst. Pasteur*, 59, 1937b.
- Microbial Genetics. X Symposium Soc. gen. Microbiol., Cambridge Univ. Press, London, 1960.
- Mitchell H. K., Snell E. E., Williams R. J. The concentration of «folic acid».—*J. Amer. Chem. Soc.*, 63, 1941.
- Monod J. Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Paris, 1942.
- Monod J. La technique de culture continue, théorie et applications.—*Ann. Inst. Pasteur*, 79, 1950.
- Monod J. and Cohn M. La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique).—*Advances Enzymol.*, 13, 1952.
- Moses V. The metabolic significance of the acid cycle in the growth of the fungus *Zygorrhynchus moelleri*.—*J. gen. Microbiol.*, 16, 1957.
- Novick A. and Scillard L. Experiments with the Chemostat on spontaneous mutations of bacteria.—*Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, 36, 1950.
- Paul J. Cell and tissue culture. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 1960.
- Rahn O. On the nature of adaptive enzymes.—*Growth*, 2, N 4, 1938.
- Schopfer W. H. Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme acellulaire (*Phys. blakesleanus*).—*Protoplasma*, 28, N 3, 1937.
- Schopfer W. H. Aneurine et hétérotrophie chez les microorganismes.—*Arch. Microbiol.*, 9, 1938.
- Wildiers E. Nouvelle substance indispensable au développement de la levure.—*Cellule*, 18, 1901.
- Williams R. J., Lyman C. M., Goodyear G. H., Truesdail J. H., Holaday D. «Pantothenic acid», a growth determinant of universal biological occurrence.—*J. Amer. Chem. Soc.*, 55, 1933.
- Woodruff H. B. Antibiotic production as an expression of environment.—XI Sympos. Soc. gen. Microbiol., Cambridge, 1961.
- Woodruff L. L. Thirteen thousands generations of *Paramecium*.—*Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 26, 1929.
- Woods D. D. The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide.—*Brit. J. Exp. Pathol.*, 21, 1940.
- Zwartouw H. T., Westwood J. C. N. and Appleyard G. Purification of pox viruses by density gradient centrifugation.—*J. Gen. Microbiol.*, 29, 1962.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава 1. <i>Введение</i>	7
Значение микробов в природе и производственной практике	7
Дискуссии о самопроизвольном зарождении	11
Дискуссии о ферментах	19
Строение клеток	25
Признаки и особенности живого	32
Глава 2. <i>Химический состав клеток</i>	41
Химические элементы	41
Органические вещества	44
Белки	47
Нуклеиновые кислоты	55
Липиды и липоиды	60
Коферменты (коэнзимы)	64
Глава 3. <i>Обмен веществ</i>	73
Различные стороны обмена веществ	73
Продукты энергетического обмена	89
Продукты биосинтеза и диссимиляции	97
Глава 4. <i>Питание</i>	101
Основные группы питательных веществ	101
Углеродное питание	103
Азотное питание	108
Обязательные аминокислоты	112
Понятие о ростовых веществах	115
Витамины и витаминоподобные вещества	121
Глава 5. <i>Пути и способы исследования потребностей микроорганизмов</i>	133
Зольные элементы	133
Источники углерода	135
Источники азота	136
Ростовые вещества	140
Аминограммы и ауксограммы микроорганизмов	142
Микробиологические методы определения аминокислот и витаминов	145

Глава 6. Влияние среды на жизнедеятельность микроорганизмов	
Эволюционная приспособленность микроорганизмов к среде обитания	149
Адаптивно-физиологическая изменчивость	157
Нарушения обмена веществ под влиянием ядов	168
Наследственная изменчивость	177
Глава 7. Рост и развитие	182
Общие понятия	182
Измерение роста клеток и клеточных популяций	189
Закономерности роста и размножения клеток	195
Рост и развитие микробных культур	204
Проточные культуры	209
Влияние внешних факторов на рост микроорганизмов	215
Влияние условий среды на развитие микроорганизмов	225
Литература	239

Н. Д. Иерусалимский

Основы физиологии микробов

Утверждено к печати Институтом микробиологии Академии наук СССР

Редактор *Е. Л. Рубан*. Редактор Издательства *Е. И. Авдусина*

Художник *М. Л. Компанец*

Технические редакторы *А. А. Киселева* и *Т. В. Полякова*

Сдано в набор 1/VIII 1963 г. Подписано к печати 19/XI—1963 г. Формат 60×90^{1/16}
Печ. л. 16,25 Уч.-изд. л. 14,9. Тираж 3400 Т-13613 Изд. № 2000 Тип. зак. № 5811

Цена 1 р 19 к.

Издательство Академии наук СССР. Москва, К-62 Подсосенский пер., 21
2-я типография Издательства АН СССР Москва Г-99, Шубинский пер., 10

ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
43	13 св.	$\begin{array}{l} \text{HO} \diagdown \\ \text{HO} \diagup = \\ \text{HO} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{HO} \diagdown \\ \text{HO} \diagup \text{P}=\text{O} \\ \text{HO} \end{array}$
61	4 св.	$\begin{array}{c} \text{СНОН} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{СН} \quad \text{СНОН} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{НОСН} \quad \text{СНОН} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{СНОН} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{СНОН} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{НОСН} \quad \text{СНОН} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{НОСН} \quad \text{СНОН} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{СНОН} \end{array}$
62	Подпись под формулой	Витамин	Витамин D ₂
91	12 сн.	водород	кислород
176	15 сн.	NH	NH
229	1 сн.	$-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2$	$-\text{NH}-\overset{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$
		образуются	образуют ас-

Н. Д. Иерусалимский.